



INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA
Universidade Técnica de Lisboa

**MICROPROPAGAÇÃO DE CASTANHEIRO:
ESTUDO DAS FASES DE ENRAIZAMENTO E
ACLIMATIZAÇÃO**

DOUTORAMENTO EM ENGENHARIA AGRONÓMICA

ORIENTADOR: Doutora Sara Barros Queiróz Amâncio

PRESIDENTE: Reitor da Universidade Técnica de Lisboa

VOGAIS: Doutor António Ballester

Doutora Maria Amélia Botelho de Paulo Martins Campos Loução

Doutor João Manuel Dias dos Santos Pereira

Doutora Maria Manuela Coelho Cabral Ferreira Chaves

Doutora Sara Barros Queiróz Amâncio

JOSÉ CARLOS DIAS DUARTE GONÇALVES

L i s b o a

1 9 9 8

À Teresa, Inês e Mariana

A minha Mãe
À memória de meu Pai

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Sara Amâncio, orientadora científica deste trabalho, desejo expressar o meu mais sincero e reconhecido agradecimento pela amizade, disponibilidade, apoio e incentivo constantes durante a execução do mesmo. Agradeço-lhe ainda as sugestões, comentários e análise crítica prestados durante a sua redacção.

Aos Doutores Ana Maria Vieitez e António Ballester, do Instituto de Investigações Agrobiológicas da Galiza, Santiago de Compostela, Espanha, agradeço toda a amizade e apoio que ao longo destes anos me têm dispensado, bem como a disponibilização de equipamentos e meios para a execução de partes experimentais deste trabalho. Uma palavra de apreço também para todos os restantes amigos desta Instituição que sempre comigo colaboraram.

À Professora Catedrática Wanda Viegas, Presidente do Departamento de Botânica e Engenharia Biológica e Professor Catedrático João Santos Pereira, Presidente do Departamento de Engenharia Florestal do Instituto Superior de Agronomia, agradeço as condições logísticas, materiais e de utilização de equipamentos, sem as quais este trabalho não teria sido possível.

À Professora Catedrática Manuela Chaves, do Departamento de Botânica e Engenharia Biológica do Instituto Superior de Agronomia, agradeço as sugestões e revisão crítica de algumas partes do trabalho.

Aos Eng^{os} João Paulo Rebordão e José Graça, Dr. Tiago Faria, Doutores Leonor Osório e Júlio Osório agradeço a ajuda prestada nos ensinamentos de muitas das técnicas laboratoriais utilizadas na realização destes ensaios, bem como na interpretação de alguns resultados.

À Eng^a Técnica Graça Diogo e Eng^a Teresa Coelho, do Laboratório de Biologia Vegetal da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, agradeço todo o empenho demonstrado na manutenção das culturas, realização prática de partes experimentais, bem como a sua amizade para comigo.

Às Eng^{as} Luisa Carvalho e Clélia Neves, da Secção de Fisiologia Vegetal do Instituto Superior de Agronomia, agradeço a ajuda prestada na realização prática de partes do trabalho experimental.

Aos funcionários da Secção de Fisiologia Vegetal do Instituto Superior de Agronomia agradeço a colaboração prestada.

Ao Sr. José Nunes, do Instituto Superior Técnico, agradeço a colaboração na microscopia electrónica de varrimento.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica desejo agradecer o apoio financeiro concedido, através do Projecto PBIC/AGR/1461/92; ao Ministério da Educação e Cultura através do Programa PRODEP, Medida 2, Acção 5.2, pelo apoio financeiro que permitiu a minha dispensa de serviço docente, durante grande parte das actividades experimentais deste trabalho.

À Escola Superior Agrária de Castelo Branco por ter possibilitado a criação de condições que permitiram a realização de significativa parte experimental deste trabalho.

À Teresa, minha esposa, pela leitura e revisão ortográfica do texto.

Por último, os meus agradecimentos a todos quantos, aqui não mencionados, de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

Bem hajam

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- A* - Taxa fotossintética medida por assimilação de CO₂ ou liberação de O₂ dependente do CO₂
- A_{max}* - Taxa de liberação de O₂ dependente do CO₂ em condições de luz e CO₂ saturantes
- AIA* - Ácido indol-3-acético
- AIAsp* - Ácido indol-3-acetil-aspartico
- AIB* - Ácido indol-3-butírico
- AIBsp* - Ácido indol-3-butiril-aspartico
- ANA* - Ácido α-naftaleno acético
- BAP* - 6-Benzilaminopurina
- BHT* - Butylated hydroxytoluene
- Cap.* - Capítulo
- C_i* - Concentração de CO₂ nos espaços intercelulares
- C_o* - Concentração de CO₂ no exterior
- Cl_a* - Concentração de clorofila a nas folhas
- Cl_b* - Concentração de clorofila b nas folhas
- Cl_{total}* - Concentração de clorofila total nas folhas
- DMSO* - Dimetilsufóxido
- E* - Taxa de transpiração
- e.p.* - erro-padrão
- EDTA* - Tetra-acetato de etilenodiamina
- FAA* - Fixador (formaldeído 35%:ácido acético glacial:etanol:água, 10:5:50:35, v:v)
- f1* - Primeira folha com desenvolvimento na fase de aclimatização (folha um)
- f2* - Segunda folha com desenvolvimento na fase de aclimatização (folha dois)
- f3* - Terceira folha com desenvolvimento na fase de aclimatização (folha três)
- fC* - Folha desenvolvida em condições de campo em plantas de castanheiro micropropagadas (folha de campo)
- fD0* - Folhas desenvolvidas durante a fase de multiplicação e existentes no dia zero de aclimatização (folhas do dia zero)
- Fig.* - Figura
- fN* - Folhas desenvolvidas durante a fase de aclimatização (folhas novas)
- fP* - folhas desenvolvidas durante a fase de multiplicação e existentes no final da fase de aclimatização (folhas persistentes)
- fT* - Total de folhas que a planta possuía no final da fase de aclimatização (folhas totais)
- g* - Força gravitacional
- G* - Condutância estomática
- GD* - Meio de cultura de Greshoff e Doy (1972)
- HPLC* - Cromatografia líquida de alta performance
- HR* - Humidade relativa
- IRGA* - Analisador de gás por infravermelho
- LAR* - Razão de área foliar
- LWR* - Razão de peso foliar
- MEV* - Microscopia electrónica de varrimento
- MO* - Microscopia óptica
- MS* - Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962)
- n* - Número de amostras
- NAR* - Taxa de assimilação líquida

NAD ⁺ - Nicotina-adenina dinucleótido oxidado	PVPP - Polivinilpirrolidina
NADH - Nicotina-adenina dinucleótido reduzido	R - Taxa de respiração no escuro
NADP ⁺ - Nicotina-adenina dinucleótido fosfato oxidado	r ² - Coeficiente de correlação
NADPH - Nicotina-adenina dinucleótido fosfato reduzido	RGR - Taxa de crescimento relativo
P - Probabilidade estatística	Rubisco - Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase
PAS - Corante (ácido periódico e reagente de Schiff)	RWC - Conteúdo relativo em água
pf - Peso fresco	SLA - Área foliar específica
P _{fi} - Peso fresco inicial	Tab. - Tabela
P _{ft} - Peso fresco no tempo <i>t</i>	v.v - Volume:volume
6P-GDH - Glucose 6-fosfato desidrogenase	φ - Rendimento quântico aparente
6P-GI - Glucose 6-fosfato isomerase	I _o - Ponto de compensação para a luz
PPFD - Densidade de fluxo fotónico fotossinteticamente activo	θ - Convexidade da curva de resposta da taxa de fotossíntese à intensidade luminosa
P _s - Peso seco	λ - Comprimento de onda da radiação

RESUMO

Este trabalho teve como objectivos definir um tratamento de rizogénese e avaliar os efeitos da disponibilidade luminosa durante a aclimatização, no sentido de maximizar a sobrevivência e desempenho das microplantas após o transplante.

Estudaram-se dois métodos de indução rizogénica associados a dois métodos de expressão e desenvolvimento radicular. O estudo anatómico revelou que as raízes formadas *ex vitro* apresentavam um sistema vascular mais organizado e melhores conexões vasculares, o que permitiu uma elevada taxa de sobrevivência na aclimatização. A relação entre concentrações de auxinas e actividade peroxidásica no processo de indução radicular são discutidas, bem como o papel das diferentes auxinas endógenas e exógenas.

A análise de crescimento, anatomia foliar, controlo na perda de água, fotossíntese e metabolismo do carbono foram investigados em plantas de castanheiro micropropagadas com raízes *in vitro* e *ex vitro* e aclimatizadas sob dois níveis de irradiância. O nível de irradiância mais elevado, combinado com as plantas com raízes *ex vitro*, permitiu um crescimento mais vigoroso, expresso pelo incremento na biomassa total, taxa de crescimento relativo, taxa líquida de assimilação e área foliar. A aclimatização provocou modificação nas características foliares e as novas folhas formadas apresentaram mesófilo mais diferenciado, mais tecidos vasculares e de suporte nas nervuras principais, reduzida frequência estomática e melhor controlo na perda de água.

A concentração de pigmentos fotossintéticos foi mais elevada nas plantas aclimatizadas sob menor irradiância, mas com uma razão clorofila a/b menor quando comparadas com as plantas aclimatizadas sob maior irradiância. Estas, apresentaram acréscimos na taxa de fotossíntese aparente e capacidade fotossintética, melhor rendimento quântico e mais baixo ponto de compensação para a luz. As concentrações de hidratos de carbono solúveis, amido e proteínas foram mais elevadas nas plantas enraizadas *ex vitro* e aclimatizadas sob maior irradiância, o que revela uma normal capacidade fotoautotrófica para posterior crescimento no campo.

Palavras chave: aclimatização; castanheiro; fotossíntese; luz; micropropagação; rizogénese.

ABSTRACT

This study aimed to optimize chestnut micropropagation by determining a root induction treatment and light effects during acclimatization, to maximize overall survival after transfer to soil.

Two root inductive methods were followed by two expressive root media. Both rooting percentage and acclimatization survival were affected by root expression conditions. The anatomical study revealed that *ex vitro* produced roots had a more organized vascular systems and best vascular connections with shoot, which improved survival during acclimatization stage. The relationships between auxin and peroxidase activity were discussed as well as the involvement of the different endogenous and exogenous applied auxins in the root inductive process.

Growth analysis, leaf anatomy, water control, photosynthesis and carbon metabolism were followed during the acclimatization of micropropagated chestnut with *in vitro*- and *ex vitro*-roots and under two irradiance levels. Higher irradiance level combined with *ex vitro*-rooted plantlets were associated to a vigorous growth expressed by an increase on total dry weight, relative growth rate, net assimilation rate and leaf area. Leaf characteristics were modified during acclimatization and the new leaves formed had a more differentiated mesophyll cells, more vascular and support tissues in midrib veins, a reduced stomatal frequency and a reduced water loss.

Pigment content was higher in plantlets acclimatized at lower irradiance level but chlorophyll a/b was significantly lower when compared to plantlets acclimatized under higher irradiance. These ones, showed a significant increase in net photosynthesis and photosynthetic capacity, higher light saturated photosynthetic capacity, higher quantum yield and lower light compensation point. Soluble sugars, starch and proteins were higher in *ex vitro*-rooted plantlets acclimatized under higher irradiance, what reveals a quite normal photoautotrophic ability for further field growth.

Key words: acclimatization; chestnut; photosynthesis; light; micropropagation; rooting.

Índice

<i>Agradecimentos</i>	vii
<i>Simbolos e abreviaturas</i>	ix
<i>Resumo e palavras chave</i>	xi
<i>Abstract and key-words</i>	xii
<i>Índice</i>	xiii

I. INTRODUÇÃO

1. ASPECTOS GERAIS DA MULTIPLICAÇÃO DE PLANTAS POR SISTEMAS <i>IN VITRO</i>	3
2. CARACTERIZAÇÃO DAS FASES DE ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO	10
2.1. <i>Aspectos biológicos da rizogénese e sistemas de indução</i>	10
2.2. <i>Características morfo-fisiológicas das microplantas</i>	19
2.3. <i>Factores que condicionam a fase de aclimatização</i>	23
3. A MICROPROPAGAÇÃO NO CASTANHEIRO	25
3.1. <i>Importância da espécie</i>	25
3.2. <i>Sistemas de multiplicação</i>	26
4. OBJECTIVOS DO TRABALHO	28

II. MATERIAL E MÉTODOS DE CULTURA

1. MATERIAL VEGETAL	33
2. CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTURA PARA ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO	33

3. FASE DE ENRAIZAMENTO	37
3.1. <i>Ensaio de enraizamento</i>	38
3.2. <i>Indicadores anatómicos e bioquímicos</i>	41
4. FASE DE ACLIMATIZAÇÃO	42
4.1. <i>Tratamentos de aclimatização</i>	44
5. DELINEAMENTO E TRATAMENTO ESTATÍSTICO	45

III. ENRAIZAMENTO: SOBREVIVÊNCIA E MORFOLOGIA RADICULAR, ALTERAÇÕES ANATÓMICAS E BIOQUÍMICAS

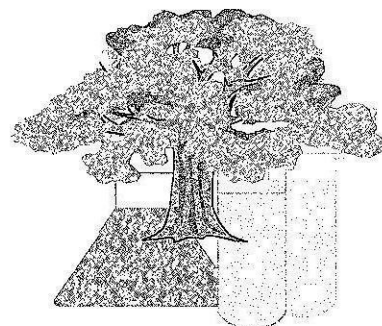
1. INTRODUÇÃO	49
2. MATERIAL E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	53
2.1. <i>Enraizamento in vitro e ex vitro</i>	53
2.2. <i>Estudo anatómico do enraizamento</i>	55
2.3. <i>Indicadores bioquímicos</i>	55
2.3.1. <i>Determinação da actividade peroxidásica</i>	55
2.3.2. <i>Determinação das concentrações de AIA, AIAsp e AIB</i>	57
2.4. <i>Quantificação e tratamento estatístico dos dados</i>	59
3. RESULTADOS	61
3.1. <i>Enraizamento e sobrevivência</i>	61
3.2. <i>Morfologia e anatomia radicular</i>	63
3.3. <i>Alterações anatómicas durante a rizogénese</i>	65
3.4. <i>Indicadores bioquímicos</i>	69
3.4.1. <i>Actividade peroxidásica</i>	70
3.4.2. <i>Variação nas concentrações de AIA, AIAsp e AIB</i>	74
4. DISCUSSÃO	78
4.1. <i>Condições de enraizamento e sobrevivência</i>	78
4.2. <i>Aspectos anatómicos da rizogénese</i>	83
4.3. <i>Actividade peroxidásica e concentração de AIA, AIAsp e AIB</i>	85

IV. ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE CASTANHEIRO MICROPROPAGADAS

1. INTRODUÇÃO	95
2. MATERIAL E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	101
2.1. <i>Parâmetros de crescimento</i>	101
2.2. <i>Histologia e anatomia foliar</i>	103
2.3. <i>Variação do conteúdo relativo em água</i>	106
2.4. <i>Quantificação de clorofilas</i>	107
2.5. <i>Fotossíntese</i>	108
2.5.1. Taxa de fotossíntese aparente	108
2.5.2. Curvas de resposta à luz, capacidade fotossintética, rendimento quântico e ponto de compensação para a luz	109
2.6. <i>Parâmetros bioquímicos</i>	113
2.6.1. Hidratos de carbono solúveis e amido	114
2.6.2. Proteína solúvel total	116
2.7. <i>Quantificação e tratamento estatístico dos dados</i>	117
3. RESULTADOS	118
3.1. <i>Análise de crescimento</i>	118
3.1.1. Crescimento relativo, biomassa total e razão parte aérea / raiz	118
3.1.2. Biomassa foliar, radicular e razão de peso foliar	121
3.1.3. Área foliar, número de folhas formadas e área foliar específica	125
3.1.4. Taxa de crescimento relativo, taxa líquida de assimilação e razão de área foliar	129
3.2. <i>Histologia e anatomia foliar</i>	132
3.2.1. <i>Análise qualitativa</i>	132
3.2.1.1. Observações histológicas	132
3.2.1.2. Estomas	138
3.2.2. <i>Indicadores quantitativos</i>	142
3.2.2.1. Espessura da folha, nervura central e número de células	142

3.2.2.2. Estrutura interna e frequência estomática	145
3.3. <i>Variação da perda de água</i>	149
3.4. <i>Clorofilas</i>	153
3.5. <i>Fotossíntese</i>	158
3.5.1. Taxa de fotossíntese aparente, transpiração e condutância estomática	158
3.5.2. Curvas de resposta à luz e capacidade fotossintética	161
3.5.3. Rendimento quântico	166
3.5.4. Ponto de compensação para a luz	167
3.6. <i>Parâmetros bioquímicos</i>	169
3.6.1. Hidratos de carbono solúveis e amido	169
3.6.2. Proteína solúvel total	174
4. DISCUSSÃO	177
4.1. <i>Análise de crescimento</i>	177
4.2. <i>Histologia e anatomia foliar</i>	182
4.3. <i>Controlo da perda de água</i>	186
4.4. <i>Clorofilas e fotossíntese</i>	189
4.5. <i>Parâmetros bioquímicos</i>	197
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS	203
<hr/>	
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	213
<hr/>	
VII. ANEXOS	235
<hr/>	

INTRODUÇÃO



1. ASPECTOS GERAIS DA MULTIPLICAÇÃO DE PLANTAS POR SISTEMAS

IN VITRO

A cultura de tecidos vegetais de espécies lenhosas teve o seu início nos anos 30 (Gautheret, 1934, 1940). Nas décadas que se seguiram, os sistemas de organogénese foram sendo desenvolvidos sempre orientados para uma diferenciação faseada entre estruturas aéreas e estruturas radiculares. Foi preciso esperar até 1968 para que fossem obtidas as primeiras plantas completas a partir da cultura de *callus* de choupo triplóide, *Populus tremuloides* (Winton, 1968). Posteriormente, tem vindo a ser demonstrado que é possível a cultura de diversos tipos de explantes¹, obtidos a partir das mais variadas espécies, com diferenciação de órgãos e posterior regeneração da plântula completa em condições *in vitro* (Debergh & Zimmerman, 1991; Bonga & Von Aderkas, 1992; Ahuja, 1993). No entanto isto não significa que todas as espécies vegetais, e em particular as lenhosas, sejam susceptíveis de serem regeneradas *in vitro*, continuando muitas delas a comportarem-se como recalcitrantes (Greenwood, 1986).

Os factores que condicionam o comportamento das espécies lenhosas quando submetidas a condições *in vitro* são, fundamentalmente, o genótipo e o estado de maturação em que a planta se encontra quando dela se extrai o material vegetativo para iniciar um sistema de propagação *in vitro*. Em geral, os explantes juvenis, tais como embriões, cotilédones, hipocótilos ou gomos obtidos a partir de plantas seminais na sua fase inicial de desenvolvimento, isto é, antes de atingirem o estado adulto, apresentam capacidades de respostas regenerativas muito superiores aos explantes obtidos a partir de plantas adultas. A micropropagação dos explantes obtidos a partir de plantas juvenis seminais, apesar da sua grande utilidade para avaliar e desenvolver estudos sobre diferenciação histológica tem, contudo, a grande desvantagem do facto de ser imprevisível caracterizar a performance que a planta irá ter quando atingir a maturidade. O desenvolvimento de técnicas que permitam a utilização de marcadores bioquímicos (isoenzimas) ou moleculares (RFLP e/ou RAPD) durante a fase juvenil, e que se

¹ Não existindo até à data uma palavra portuguesa que permita a tradução do termo inglês "explant", ao longo deste trabalho assumiu-se a sua tradução livre para a palavra explante, plural explantes, com o significado em tudo idêntico ao definido pela IAPTC (1985) para o termo original em inglês.

encontrem correlacionados com características fenotípicas que essas plantas apresentam no estado adulto, deverá, num futuro próximo, permitir a utilização de material juvenil, tomando assim o processo de regeneração mais simples e produtivo.

A regeneração de plantas pode ser feita a partir de culturas de *calli*, órgãos, células e protoplastos (Fig. 1.1). Contudo, até à data, tem sido a utilização de órgãos (embriões, cotilédones ou gomos) o tipo de explantes mais vulgarizado, com maior ou menor sucesso, para a micropropagação de um grande número de espécies lenhosas (Bonga & Durzan, 1987; Bonga & Von Aderkas, 1992; Ahuja, 1993). Este facto explica-se pela quase total garantia de fidelidade clonal que se consegue com a utilização deste tipo de material vegetativo (George & Sherrington, 1984).

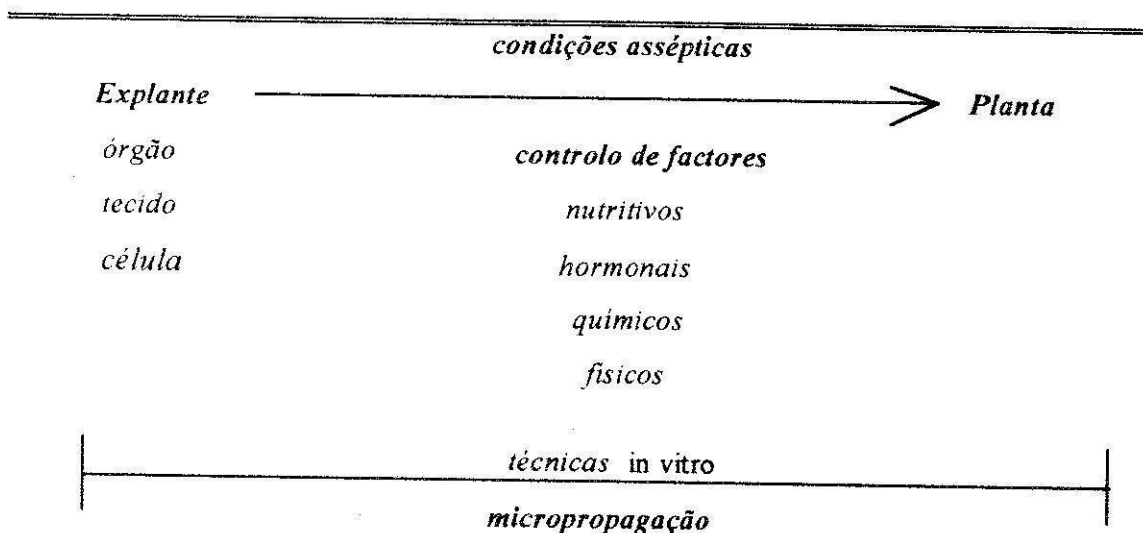


Figura 1.1. Diagrama dos factores envolvidos num sistema de micropropagação.

Muitas são já as espécies lenhosas cuja regeneração completa foi possível de obter *in vitro* (Ahuja, 1993). Contudo, o desenvolvimento destas técnicas por forma a que permitam a sua aplicação em termos comerciais, apenas tem sido possível para um número muito limitado dessas espécies (Ahuja, 1993).

A micropropagação pode hoje ser desenvolvida a partir de sistemas de alongamento de gomos apicais e/ou axilares, organogénese e por embriogénese somática. O primeiro e o segundo envolvem a diferenciação de rebentos caulinares e respectivo sistema radicular em fases distintas de acordo com os postulados clássicos das diferentes

fases da micropropagação (Murashige, 1974; Debergh & Maene, 1981). A diferença reside no facto do alongamento axilar consistir no promover do desenvolvimento de um meristema já previamente definido para originar uma estrutura caulinar e o segundo, obrigar a uma formação de novo desta estrutura caulinar a partir de tecidos que não estavam previamente determinados para tal, isto é, formação de rebentos caulinares adventícios (George & Sherrington, 1984). O alongamento axilar é, até à data, o sistema mais utilizado para a propagação clonal das mais variadas espécies lenhosas, independentemente das maiores ou menores taxas de multiplicação que se conseguem obter; a grande estabilidade genética que este tipo de material apresenta nas sucessivas fases de multiplicação, uma vez que não há passagem por qualquer fase de desdiferenciação histológica é uma das principais razões para tal. A formação e desenvolvimento dos rebentos caulinares, de origem axilar ou adventícia, é induzida com base na utilização de meios suplementados com citocininas e, posteriormente, os rebentos são induzidos a diferenciar um sistema radicular por acção de substâncias auxínicas, originando assim uma planta completa, que será posteriormente submetida a um processo de aclimatização, a fim de poder ser transferida para condições ambientais naturais (Fig. 1.2). Estes processos de regeneração *in vitro* são, no entanto, fortemente influenciados pelo genótipo, estado fisiológico e idade do explante, condições do ambiente *in vitro*, em especial os regimes de luz e temperatura, e ainda pela formulação dos meios de cultura, em especial concentrações hormonais.

A micropropagação via embriogénese somática envolve a formação de embriões *in vitro* a partir de células somáticas com competência embriogénica. Em contraste com a organogénese, referida anteriormente, estes sistemas permitem a obtenção de plântulas com um único passo, que envolve o desenvolvimento em simultâneo de um pólo apical e de um pólo radicular, tal como acontece nos embriões de origem zigótica. No entanto, isto não significa que estes sistemas não necessitem da utilização de diferentes formulações nutritivas no decorrer do processo. De facto tal é indispensável para que as diferentes fases de maturação do embrião somático possam ocorrer. A utilização deste poderoso sistema de micropropagação encontra-se, contudo, ainda em fase de desenvolvimento com muitos problemas básicos a necessitarem de investigação. Para além da dificuldade na iniciação de embriões somáticos a partir de muitos genótipos, continuam ainda a persistir muitos

problemas durante o processo de maturação e conversão dos embriões somáticos, bem como o posterior desenvolvimento da plântula. Após a resolução destes problemas a utilização da embriogénese somática deverá ser, num futuro próximo, o meio mais rentável para a produção em massa de plantas clonadas (Cervelli & Senaratna, 1995). Basta referir que o sistema pode ser desenvolvido com a utilização de meios líquidos e, como tal, possível a utilização de bioreactores para produção em larga escala (Leathers *et al.*, 1995). Para além deste facto, os embriões somáticos poderão ser encapsulados, tornando-se assim em sementes sintéticas as quais poderão ser conservadas e plantadas, tal como é feito para as sementes zigóticas (Sakamoto *et al.*, 1995).

De entre as vantagens que a micropropagação oferece, comparativamente aos processos de multiplicação vegetativa tradicionais, podemos destacar a maior rapidez do processo, a possibilidade de multiplicar espécies difíceis ou mesmo impossíveis de propagar *in vivo*, o facto do espaço necessário para a cultura e armazenamento ser muito reduzido, a ausência de agentes patogénicos contaminantes, a eliminação do efeito de sazonalidade e a possibilidade de obtenção de plantas com o seu próprio sistema radicular (George & Sherrington, 1984; Pierik, 1987). Também para o melhorador é todo um campo de potenciais aplicações, permitindo o estabelecimento de bancos de genes que rompem com as limitações dos tradicionais bancos de germoplasma. Também a utilização destes sistemas tem vindo a permitir significativos avanços nas áreas da manipulação genética e obtenção de plantas transformadas (Lindsey e Jones, 1989).

No entanto, as dificuldades também são uma constante na aplicação destes sistemas. Assim, e como anteriormente se referiu, muitas espécies têm fraca capacidade de regeneração, em especial quando o estabelecimento é feito a partir de explantes de material vegetal adulto; as taxas de multiplicação nem sempre são as desejadas por forma a tornarem o processo rentável; a indução de um sistema radicular adventício funcional nem sempre é conseguida; a adaptação das plantas obtidas *in vitro* às condições ambientais naturais é susceptível de provocar elevadas taxas de mortalidade; a possibilidade de ocorrerem alterações genéticas deve ser sempre considerada em consequência do elevado número de subculturas; por fim, o processo em si pode ser oneroso (Pierik, 1987; Bonga & Von Aderkas, 1992).

Foram os trabalhos de Murashige (1974), posteriormente adaptados e modificados por Debergh & Maene (1981), que estabeleceram os princípios gerais de um sistema de micropropagação, tendo sido definidas cinco fases (Fig. 1.2):

- Fase 0. Selecção da planta mãe e preparação do explante. Envolve toda a fase de manipulações do material vegetal, desde a recolha até ao estabelecimento *in vitro*. Nesta fase incluem-se os pré-tratamentos do material vegetal e desinfeccção, tornando-se fundamental o controlo de factores como a idade e o estado fisiológico e sanitário da planta mãe, idade e posição do tecido ou órgão na planta, constituição genética, entre outros.
- Fase 1. Estabelecimento de uma cultura asséptica. Inclui o isolamento do explante e a sua colocação em condições assépticas no meio de cultura. Nesta fase é determinante a escolha do tipo de explante e método de desinfeccção utilizado.
- Fase 2. Multiplicação das culturas. De acordo com a metodologia utilizada, o principal objectivo é conseguir propagar sem perda de estabilidade genética. Os factores mais importantes para o sucesso são a formulação dos meios de cultura e as condições físicas do ambiente de crescimento.
- Fase 3. Alongamento e enraizamento dos rebentos. Inclui a formação de raízes adventícias, quer *in vitro* quer *ex vitro*, podendo haver necessidade de uma fase prévia de alongamento dos rebentos obtidos na fase de multiplicação.
- Fase 4. Aclimatização das plantas. Torna-se necessário proceder à adaptação das plantas desenvolvidas em heterotrofia para sobreviverem em condições autotróficas. São então determinantes alguns factores físicos, tais como luz, humidade e temperatura, que devem ser gradualmente alterados a fim de permitir à planta a sua gradual autosuficiência fotossintética.

As plantas lenhosas são, em geral, um grupo de plantas difícil de micropropagar. Alguns dos factores que para isso contribuem são a forte influência genotípica inter e intra-específica no tipo de respostas regenerativas, a contaminação das culturas por agentes patogénicos endógenos, a inibição do crescimento por fenóis e polifenóis libertados pelos explantes e, não menos importante, a dificuldade no estabelecimento de explantes provenientes de material com características fisiológicas adultas.

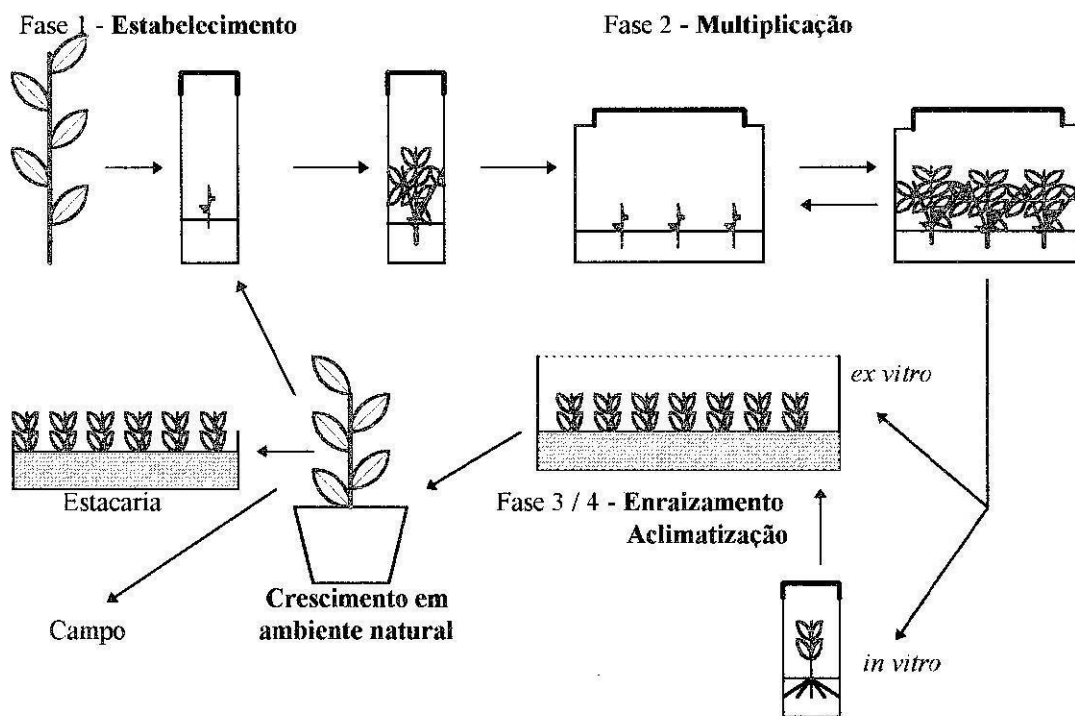


Figura 1.2. Representação de um sistema de micropropagação por rebentamento axilar. São referidos os dois sistemas alternativos de enraizamento, in vitro e ex vitro. No segundo caso, a expressão e desenvolvimento radicular ocorre em condições autotróficas, podendo considerar-se as plantas em pré-aclimatização. A utilização das plantas micropropagadas pode direccionar-se para a sua colocação no campo, para o estabelecimento de novas culturas ou para a sua utilização como pés-mães para estacaria.

Como consequência da forte influência genotípica, torna-se necessário desenvolver protocolos específicos para cada uma das espécies que se pretende clonar, assistindo-se muitas vezes a uma forte variação intra-específica, de clone para clone.

Também a contaminação das culturas, logo na fase de estabelecimento, ou posteriormente durante a fase de multiplicação, é um grave problema (Cassels, 1991; Leifert & Waites, 1994). Tal facto, pode ser consequência de processos de desinfecção

deficientes. Todavia, a contaminação pode ainda resultar de actividades bacterianas endógenas dos próprios tecidos e, se assim for, estas não são possíveis de eliminar pelos métodos de desinfecção superficiais. Quando tal acontece, há que ter em conta aspectos de sanidade da planta mãe que fornece os explantes e utilizar sistemas de estabelecimento que possam diminuir esses riscos ou ainda, quando a importância do material o justificar, a utilização de antibióticos (Danby *et al.*, 1994).

O terceiro factor, inibição do crescimento por libertação de substâncias de natureza fenólica para o meio de cultura, não é possível de evitar. No entanto, torna-se possível minimizar os seus efeitos, por exemplo através da colocação prévia dos explantes em soluções anti-oxidantes, ou pela adição ao meio de cultura de substâncias com capacidade de absorção de fenóis, tais como, o carvão activo ou a polivinilpirrolidina (Compton & Preece, 1986).

Por último, o estabelecimento de material vegetal de características adultas é, sem dúvida, o factor que maiores problemas tem levantado aos investigadores, em particular em géneros como *Junglans*, *Castanea* e *Quercus*, entre outros. Assim, já que a clonagem deste material é feita a partir de indivíduos cujas características fenotípicas se manifestam na fase adulta, e esta é atingida muito tardiamente, torna-se necessário utilizar ou desenvolver metodologias que permitam a obtenção de material vegetal com características juvenis, ou então, utilizar técnicas de rejuvenescimento (Dumas, 1986; Franclet *et al.*, 1987; Bonga & Von Aderkas, 1992). No primeiro caso, é sabido que, em muitas espécies, o material proveniente dos ramos inferiores, em especial próximos da base do tronco, apresenta características mais juvenis, bem como os rebentos ortotrópicos que se originam da base. Quanto ao segundo caso, pode-se actuar quer ao nível da planta mãe, antes de retirar o explante, quer já após o estabelecimento *in vitro*. A nível da planta mãe, as metodologias mais utilizadas até ao momento têm sido a aplicação de citocininas, por forma a desencadear o processo de formação de rebentos epicórmicos; a aplicação de enxertias em série; a utilização de rebentos de touça e a execução de podas severas (Greenwood, 1986). Ainda dentro deste âmbito, rejuvenescimento do material vegetal a partir da planta mãe, é de referir a utilização de metodologias de estiolamento ao nível dos ramos da copa, como alternativa à inexistência de outro material com características juvenis (Ballester *et al.*, 1989). Nos tratamentos *in vitro*, o tipo e dimensões do explante

primário, o tipo e concentração de reguladores de crescimento presentes no meio de cultura, a frequência e a duração dos ciclos de subcultura e o fotoperíodo, entre outros, são factores com papel importante na indução de rejuvenescimento (Franclét *et al.*, 1987; Pierik, 1990).

Apesar das dificuldades e limitações que acabámos de referir, que surgem nas fases de estabelecimento e multiplicação, tem sido possível desenvolver protocolos que permitem, para muitas espécies já investigadas, utilizar estas metodologias com rendimentos que tornam o processo economicamente viável, nomeadamente em castanheiro (Vieitez *et al.*, 1983, 1986). No entanto as fases de enraizamento e aclimatização continuam ainda a ser, para a grande maioria das espécies, as fases determinantes no êxito de um sistema de multiplicação vegetativo de plantas utilizando os sistemas *in vitro* (Debergh & Read, 1991; Preece & Sutter, 1991). Os factores que condicionam o sucesso destas fases são muitos e vão desde factores endógenos, inerentes ao próprio material vegetal, até a todo um conjunto de factores exógenos físicos e químicos e que são responsáveis pelas transformações que as estruturas vegetais regeneradas *in vitro* sofrem até à obtenção da planta autotrófica completa, isto é, em condições de poder continuar o seu desenvolvimento vegetativo no campo.

Face a terem sido objecto de estudo neste trabalho apresentam-se em seguida alguns dos aspectos que condicionam as referidas fases de enraizamento e aclimatização, por forma a se ficar com uma ideia da maior ou menor complexidade que se estabelece na interacção dos factores envolvidos.

2. CARACTERIZAÇÃO DAS FASES DE ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO

2.1. Aspectos biológicos da rizogénese e sistemas de indução

O processo de formação de um sistema radicular adventício tem sido dividido em várias fases com base em observações histológicas (Lovell & White, 1986), bioquímicas e moleculares (Hand, 1994). Estas diferentes fases podem também ser identificadas em termos fisiológicos através das alterações que se registam após a adição de hormonas.

Estas alterações são relativamente bem conhecidas no caso da formação de raízes adventícias. Assim, é sabido, desde há muitos anos, que a presença de auxinas é requisito quase obrigatório para a grande maioria das espécies, pelo menos durante a fase inicial do processo, podendo nas fases posteriores ser dispensável ou até inibitória, enquanto que a inibição do enraizamento por parte das citocininas ocorre especificamente no período inicial do processo de rizogénese (Boollmark & Eliasson, 1986).

Este processo de formação de raízes adventícias varia entre espécies, entre cultivares e mesmo entre clones, com a idade e com a natureza do órgão. Muitas espécies enraízam rápida e facilmente quando os rebentos são obtidos a partir de material juvenil, tornando-se o processo relativamente complicado quando os rebentos são provenientes de material adulto (Davies *et al.*, 1982; Sanchez & Vieitez, 1991). É referido por certos autores que o processo de rizogénese pode ser dividido em várias fases, mas a definição e a natureza dessas fases, bem como a própria terminologia a usar não é de todo consensual (Argles, 1959; Lovell & White, 1986). Contudo, é pacífica a aceitação de, pelo menos, três fases, a fase de indução, a fase de iniciação e a fase de expressão ou desenvolvimento radicular (Gaspar & Coumans, 1987; Druart *et al.*, 1982; Moncousin, 1991). Descrições feitas para diferentes espécies sobre a diversidade de acontecimentos que ocorrem durante este processo, sugerem que muitas serão as situações particulares, identificadas em termos anatómicos e bioquímicos, mas que nem sempre estão presentes em todas as espécies. Neste sentido o processo de enraizamento tem sido descrito como podendo ser subdividido em 6 sucessivas e independentes fases: indução (período que precede a visualização de qualquer alteração citológica); proeminência nuclear; primeiras divisões transversais e longitudinais do periciclo ou de células cambiais; divisões celulares continuadas mas sem aumento significativo de volume originando campos morfogenéticos radiculares (conjuntos de células que não apresentam polaridade); aumento do volume dos conjuntos celulares por expansão celular e consequente identificação dos meristemas radiculares; crescimento interno do primórdio radicular e progressiva expansão em direcção ao exterior (Gaspar & Coumans, 1987; Berthon *et al.*, 1990; Moncousin, 1991).

Todo este processo depende, assim, da competência ou capacidade de certas células em captar e responder a um estímulo específico, que deverá envolver complexas interacções quer ao nível bioquímico quer ao nível da expressão génica. Há hoje

consistentes evidências que demonstram o papel crucial que as auxinas desempenham na formação de raízes adventícias, embora não possam ser consideradas como as substâncias exclusivas no controlo deste processo (Gaspar & Coumans, 1987; Blakesley *et al.*, 1991; Moncousin, 1991; Haissig *et al.*, 1992; Blakesley, 1994).

O primeiro passo a desencadear para iniciar um processo de rizogénese adventícia consiste em provocar a diferenciação de um potencial local de iniciação radicular. Para isso, torna-se necessário induzir e activar células, o que obrigatoriamente envolve divisão celular. Estas divisões celulares podem ocorrer nas células de floema, parênquima e câmbio, ou suas derivadas, sendo as células designadas por iniciais do primórdio. Contudo, o futuro primórdio pode, eventualmente, não ser determinado já nesta fase. O passo seguinte traduz-se no aumento do número de células e sua organização. Quando se atinge um número de cerca de 1500 células assiste-se, então, à presença de uma estrutura organizada, o primórdio radicular (Lovell & White, 1986).

Assim, as células que foram inicialmente activadas podem ser ou não as que irão originar o futuro primórdio, daí que devam ser chamadas de iniciais potenciais. Os primeiros acontecimentos, comuns à grande maioria das espécies referenciadas, são caracterizados pelo aparecimento de células com um núcleo centralizado e proeminente e com um pequeno vacúolo (Vieitez & Vieitez, 1983; San-José *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1992; Apter *et al.*, 1993a; De Klerk *et al.*, 1995), o qual tem capacidade de divisão, podendo assim originar as células iniciais do futuro ápice radicular. Nesta fase precoce não há, aparentemente, uma organização definida e a massa celular não está já necessariamente ‘determinada’, podendo, eventualmente, não evoluir para raiz. Posteriormente, estas células, designadas por ‘iniciais’, muitas vezes em conjunto com algumas células que as envolvem, evoluem para a formação de uma massa de tecido meristemático no qual se começa a assistir a alguma diferenciação. A partir deste momento pode então afirmar-se que houve ‘determinação’ podendo passar a referir-se esta massa celular como primórdio. Assiste-se, então, progressivamente, à diferenciação de tecidos vasculares, bem como à sua conexão com os tecidos vasculares existentes no caule do rebento o que permite o gradual aparecimento de uma raiz funcional. A sequência de acontecimentos que ocorrem após a formação das iniciais do primórdio é relativamente semelhante para a maioria das espécies, apesar do processo poder diferir nalguns pormenores.

A título de síntese, apresenta-se na Figura 1.3 um diagrama onde se pretendem mostrar as diferentes vias alternativas, sob o ponto de vista anatómico, que o processo de formação de raízes adventícias pode assumir.

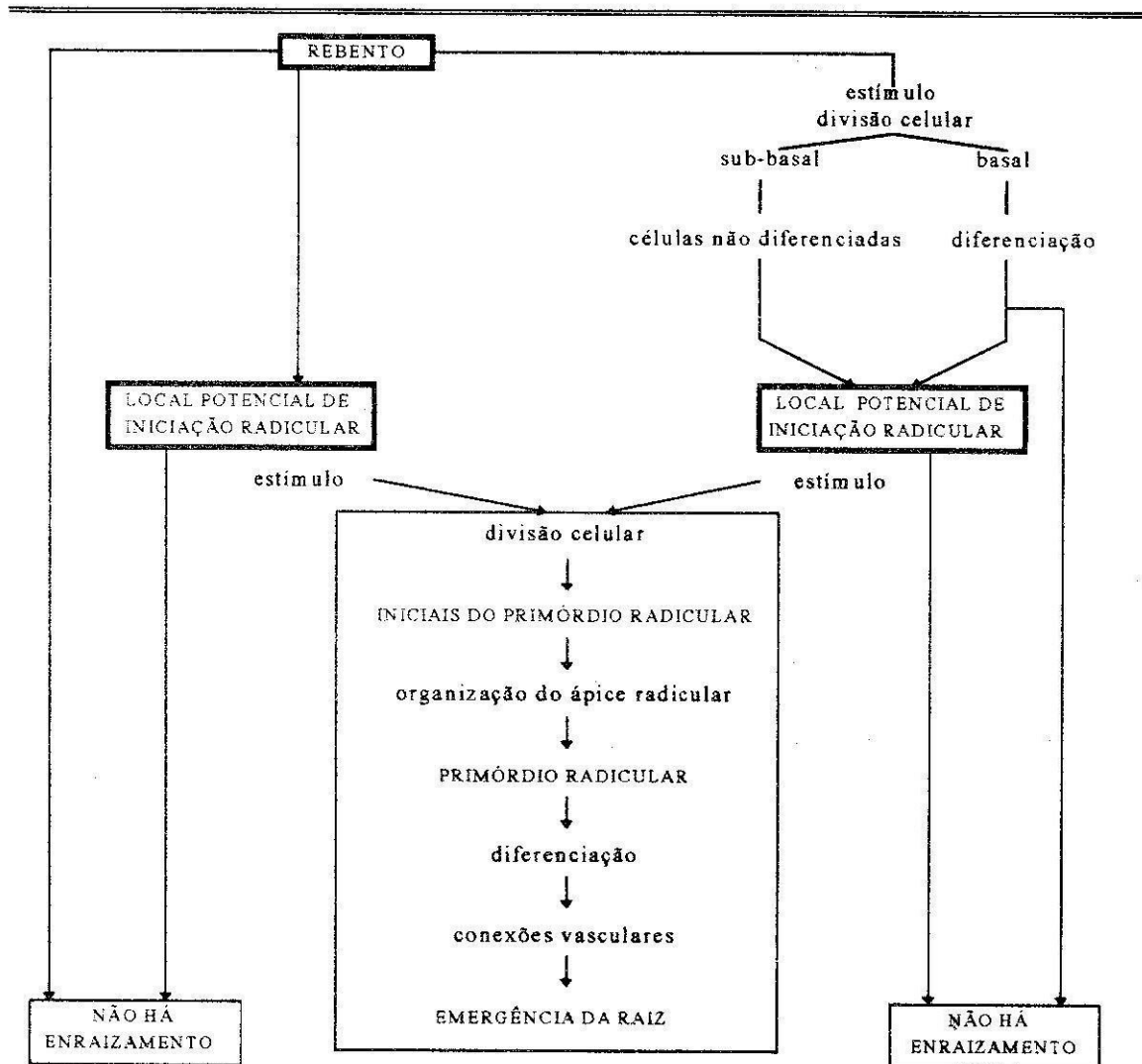


Figura 1.3. Diagrama que sintetiza as principais sequências de acontecimentos da rizogénese desde a activação inicial até à emergência radicular (Adaptado de Lovell & White, 1986).

Tal como atrás referimos, as auxinas são, sem dúvida, o grupo de substâncias químicas cuja correlação com os processos de formação de raízes adventícias está mais consistentemente referenciado. Não há, contudo, evidências directas sobre o modo de acção de auxinas ou seus co-factores na regulação deste processo. Muitos dos

investigadores têm correlacionado alterações qualitativas e quantitativas em determinada substância, grupo de substâncias, actividades enzimáticas ou alterações dos seus padrões isoenzimáticos, com o aparecimento de raízes adventícias nas plantas em estudo. Como resultado dessas correlações, apesar das evidências que as suportam serem muitas vezes contraditórias (Haissig, 1986), muitas têm vindo a ser propostas como possíveis indicadores bioquímicos. As dificuldades na validação dos resultados surgem na quantificação de alterações que na maior parte das vezes se localizam num pequeno número de células, bem como na capacidade de isolar os factores chave a partir de um complexo conjunto de interacções bioquímicas.

De entre os potenciais indicadores bioquímicos possíveis de correlacionar com o controlo do processo de rizogénese, são de destacar as poliaminas e os flavonóides, por um lado e as peroxidases e a polifenol oxidase por outro (Lovell & White, 1986).

As poliaminas são substâncias de baixo peso molecular, de natureza alifática e nitrogenada, sendo a forma de amina em que o azoto se encontra determinante para as suas funções. A sua participação em diferentes vias metabólicas tem vindo progressivamente a ser demonstrada (Galston & Kaur-Sawhney, 1987). Apesar de terem sido identificadas correlações entre a acumulação de poliaminas e as fases iniciais da formação de raízes adventícias em algumas espécies, incluindo, *Phaseolus* (Jarvis *et al.*, 1983), *Malus* (Wang & Faust, 1986), *Prunus avium* (Biondi *et al.*, 1990) e *Junglans* (Heloir *et al.*, 1996), o seu papel neste processo não deverá ser de agente regulador primário do enraizamento (Sankhala & Upadhyaya, 1988). Autores como Tiburcio *et al.* (1989), Biondi *et al.* (1990) e Geneve & Kester (1991), trabalhando com diferentes espécies *in vitro*, associaram um incremento nos níveis de putrescina com o aumento na actividade mitótica durante o processo de desenvolvimento do primórdio radicular após a fase de indução. Também especial atenção tem sido dada na especificidade dos inibidores enzimáticos que normalmente se utilizam no estudo do metabolismo das poliaminas, permitindo assim elucidar alguns dos aspectos relacionados com as suas formas livres ou conjugadas (Burtin *et al.*, 1989). No entanto, estudos com poliaminas livres ou conjugadas durante o enraizamento têm dado resultados contraditórios, pelo que não tem sido possível delinear um padrão de comportamento destas substâncias minimamente aceitável (Torrighiani *et al.*, 1989; Altamura *et al.*, 1991).

Os flavonóides são outra classe de compostos fenólicos considerados como potenciais indicadores bioquímicos da rizogénese. Neste grupo de substâncias incluem-se as antocianinas, os pigmentos vermelhos que se encontram vulgarmente nas plantas. Vários têm sido os estudos que associam níveis endógenos elevados destes pigmentos com uma maior facilidade de enraizamento (Vazquez & Gesto, 1986; Murray & Hackett, 1991; Vidal *et al.*, 1994). Curir *et al.* (1990) admitem que os flavonóides poderão actuar por inibição da actividade da AIA-oxidase ou então pela sua grande afinidade como substrato para as oxidases e peroxidases. No entanto os estudos destas substâncias têm também estado associados com a problemática do potencial rizogénico de material vegetal juvenil e adulto de espécies lenhosas (Vazquez e Gesto, 1986; Vidal *et al.*, 1994). O processo de maturação pode modificar os níveis endógenos de precursores de antocianinas, que por sua vez serão essenciais para o enraizamento (Haissig, 1986; Murray & Hackett, 1991).

Muitos têm sido os estudos a propor uma correlação directa entre a actividade enzimática das peroxidases e os mecanismos de rizogénese (Gaspar *et al.*, 1985, 1992, 1994). Por um lado têm sido observados diferentes tipos de isoenzimas peroxidásicas associadas com o enraizamento e, por outro lado, também as diferenças nas actividades enzimáticas entre espécies difíceis e fáceis de enraizar, sugerem que elas poderão constituir-se como indicadores rizogénicos potenciais (Molnar & LaCroix, 1972; Quoirin *et al.*, 1974). Contudo, as peroxidases vegetais são encontradas em múltiplas formas (isoenzimas) e para além de participarem no processo rizogénico, estão também envolvidas na iniciação floral (Gaspar, 1981), abscisão, lenhificação da parede celular e respostas a ferimentos (Gaspar *et al.*, 1985, 1986), bem como associadas com o metabolismo oxidativo das auxinas (Pressey, 1990). Em consequência desta multiplicidade de funções, torna-se difícil encontrar actividades específicas das peroxidases na rizogénese. Foi também sugerido que a redução dos níveis de AIA poderia induzir alterações fisiológicas nas células vizinhas, as quais poderiam reagir como uma resposta a uma lesão e, como consequência, desencadear um possível processo de indução de rizogénese (Pressey, 1990). Gaspar *et al.* (1985) propuseram um modelo em duas fases em que, na primeira, como resposta a uma lesão ou stress, se daria uma rápida activação das peroxidases básicas que, afectando o metabolismo auxínico, levaria à indução de raízes; a segunda, seria uma activação tardia das peroxidases acídicas que levariam à lenhificação durante a

expressão e desenvolvimento radicular. Os níveis de auxina parecem também acompanhar as flutuações das peroxidases básicas. Contudo, o papel fisiológico das auxinas livres, assim como o dos produtos da sua oxidação ou conjugados, está ainda longe de ser bem compreendido, o que complica a interpretação dos estudos nesta área.

A polifenol oxidase é uma enzima com capacidade de catalisar a hidroxilação de compostos fenólicos *in vitro*. Esta enzima tem sido associada com a capacidade de rizogénese em algumas espécies. Al Barazi & Schwabe (1984) sugerem uma correlação directa com a capacidade de rizogénese em *Pistacia vera*, e Bassuk *et al.* (1981) referem que produtos de oxidação fenólica estimulam o enraizamento em estacas de macieira. A polifenol oxidase poderá, assim, ter uma acção indirecta na formação de raízes adventícias talvez como produtora de co-factores de enraizamento. Mas a pouca informação ainda disponível acerca das correlações entre esta enzima e os processos de rizogénese levam os investigadores a questionar ainda a sua possível utilização como indicador rizogénico, pelo que se torna necessário dispor de mais informação acerca do modo de acção da polifenol oxidase e papel dos produtos resultantes da sua acção enzimática sobre o estímulo rizogénico, em especial a sua relação com as auxinas e seu metabolismo.

Os sistemas de culturas *in vitro* podem dar um extraordinário contributo na compreensão de muitas das questões que ainda se levantam na explicação do processo de formação de raízes adventícias. Estes sistemas permitem, teoricamente, a utilização de material vegetal em condições fisiológicas mais sincronizadas, logo de maior facilidade de estudo. Torna-se também possível comparar genótipos de espécies lenhosas, consideradas de difícil enraizamento, que após serem submetidos a condições *in vitro* readquirem competência rizogénica, mecanismo este conhecido por rejuvenescimento *in vitro*. Importante é também a possível comparação do comportamento rizogénico entre material vegetal proveniente de um mesmo genótipo mas de origem distinta, por exemplo, a comparação entre material proveniente da copa da árvore, geralmente de difícil ou mesmo impossível enraizamento, e material proveniente de rebentos epicórmicos, geralmente de enraizamento mais fácil.

Vários têm vindo a ser os métodos ou técnicas desenvolvidos para permitir o processo de rizogénese de rebentos regenerados *in vitro*. Um esquema das possíveis

combinações entre esses métodos, associados com as três possíveis fases da formação de raízes adventícias, indução, expressão e desenvolvimento está representado na Figura 1.4.

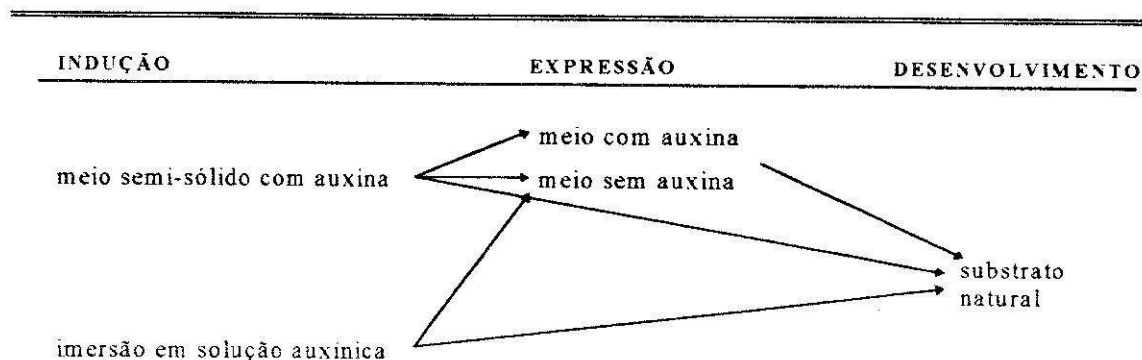


Figura 1.4. Diferentes processos possíveis de utilizar para desencadear um processo de rizogênese em rebentos regenerados in vitro (explicação no texto).

Para muitas espécies tem sido utilizado o enraizamento *in vitro* (Fig. 1.4), em que todo o processo decorre em condições assépticas, desde a indução, que pode ser feita com a presença de uma auxina no meio de cultura, ou por imersão basal dos rebentos em soluções concentradas de auxina, até ao final da expressão radicular. A vantagem dos sistemas de enraizamento *in vitro* reside na garantia de se tratar de material vegetal asséptico e, como tal, sem ter necessidade de ser submetido a períodos de quarentena em questões de exportação. Contudo este processo de enraizamento implica elevados custos em mão de obra e energia (Debergh & Read, 1991). Um outro problema associado ao enraizamento *in vitro* tem a ver com a dificuldade em remover os restos de agar, muitas vezes responsável pelo ataque de fungos e podridões quando as plântulas são colocadas em substrato natural para o seu processo de desenvolvimento radicular e aclimatização (McCown, 1988). Outro aspecto a ter em conta, e determinante em muitas espécies, é que se registam muitas vezes deficiências anatómicas e histológicas nas raízes de formação *in vitro* comparativamente com as raízes formadas *ex vitro* (McClelland *et al.*, 1990), o que provoca dificuldades de funcionamento ao nível dos tecidos condutores (Grout & Aston, 1977a; Sutter *et al.*, 1988). As principais consequências destas anomalias reflectem-se com maior acuidade na fase de aclimatização, onde a sobrevivência das plantas é, muitas vezes, drasticamente reduzida. No entanto, este aspecto é variável com as

espécies. Por exemplo, foi demonstrado que existe uma conexão vascular completa entre o caule e o sistema radicular em microplantas de macieira (Hicks, 1987; Sutter & Luza, 1993) e de jasmim (Apter *et al.*, 1993a), bem como funcionalidade fisiológica (Apter *et al.*, 1993b). Idênticos resultados foram referidos em *Pseudotsuga menziesii* por Mohammed & Vidaver (1990, 1991).

Como se referiu já neste capítulo, são muitos os factores que condicionam o enraizamento *in vitro*. Dentro dos factores físicos podem referir-se o stress hídrico, temperatura e luz. Dos factores químicos é referida a importância que elementos químicos como o boro, o cálcio e o manganésio podem ter. Algumas substâncias fenólicas podem também estimular o processo rizogénico (Bassuk *et al.*, 1981; Caboni *et al.*, 1992). A sacarose é outro dos componentes do meio que pode interferir, embora com respostas genótipo dependentes (Driver & Suttle, 1987; Horgan & Holland, 1989). Interações positivas foram também referidas entre a acção da vitamina D e auxinas que podem assim actuar sinergisticamente na estimulação da rizogénese (Pythoud & Buchala, 1989). Como já foi referido, o grupo das poliaminas, em especial a putrescina, tem sido referido como um possível promotor deste processo. Também o pH do meio pode influenciar o maior ou menor desempenho rizogénico dos tecidos (Tiburcio *et al.*, 1989). Factor de extrema importância, e que será objecto de estudo neste trabalho, são as auxinas, sendo o ácido indol-3-butírico (AIB) e o ácido α -naftaleno acético (ANA) geralmente considerados mais eficazes que o ácido 3-indol acético (AIA) (Gaspar & Coumans, 1987), muito por causa da instabilidade deste último.

Um novo sistema para desencadear o processo de rizogénese em espécies consideradas recalcitrantes é a sua cultura em companhia com a *Agrobacterium rhizogenes* (Sutter & Luza, 1993). Por exemplo, em rebentos de *Malus domestica*, que haviam perdido a sua capacidade rizogénica após 2 anos em cultura, foi possível restabelecer o processo após co-cultura com a bactéria (Patena *et al.*, 1990). Contudo, estes procedimentos podem resultar numa infecção permanente por parte do material vegetal, com a possibilidade de se originarem raízes anómalas (Karnosky *et al.*, 1988).

Uma vez concluído o processo de formação de raízes, as microplantas são transferidas para misturas de vários tipos de substratos, entre eles turfa, vermiculite, perlite e areia onde prosseguem o seu desenvolvimento já em condições naturais e autotróficas.

Estas misturas são muitas vezes fertilizadas e desinfectadas e as condições ambientais devem ser bem controladas até os sistemas radiculares estarem funcionais.

Mas a possibilidade de promover pelo menos a expressão e desenvolvimento radicular em substrato natural tem vindo a tornar-se cada vez mais frequente (Driver & Suttle, 1987). Várias são as vias possíveis de utilizar (Fig. 1.4). A indução pode ser feita com a presença de baixas concentrações de auxina no meio de cultura, por períodos de tempo entre 3 a 7 dias, seguida de transferência para substrato natural (Aitken-Christie & Thorpe, 1984). Este sistema, uma combinação entre enraizamento *in vitro* e *ex vitro*, tem vindo a ser utilizado para algumas espécies lenhosas (Driver & Suttle, 1987). Contudo, o sistema ideal passará pela indução bem como a expressão e desenvolvimento em condições *ex vitro*. Aí o método de indução possível de aplicar será o de imersão (Fig. 1.4). A grande vantagem destes sistemas *ex vitro* sobre os sistemas *in vitro* é, para além de permitirem que em simultâneo com o processo de formação da raiz a planta esteja já em condições autotróficas e, como tal, em condições de pré-aclimatização, o facto de as raízes que se formam por estes sistemas possuírem uma morfologia e anatomia muito diferentes das raízes produzidas *in vitro* (McClelland *et al.*, 1990), o que se traduz numa excelente funcionalidade, com o conseqüente ganho nas taxas de sobrevivência durante a aclimatização. A juntar a todas estas vantagens estão também importantes aspectos em termos económicos (Debergh & Read, 1991)

2.2. Características morfo-fisiológicas das microplantas

A cultura *in vitro* é feita em contentores pequenos, mais ou menos estanques, onde a atmosfera se caracteriza pela elevada humidade relativa, concentração de CO₂ variável e concentrações de etileno muito fora das concentrações normais (De Proft *et al.*, 1985; Kozai, 1991a). Por outro lado, a densidade fotossintética do fluxo fotónico (PPFD) a que as microplantas estão sujeitas é baixa e registam-se ainda diferenças ao nível do espectro luminoso e duração do fotoperíodo (Economou & Read, 1987; Fujiwara & Kozai, 1995). A temperatura de crescimento é mantida quase constante durante os períodos de dia e de noite. Também o facto de as culturas se desenvolverem na presença de uma fonte de

carbono, geralmente sacarose, é um factor muito condicionante das características fisiológicas do material vegetal desenvolvido *in vitro* (Preece & Sutter, 1991). Da interacção e conjugação de todos estes factores resulta a formação de plantas com deficiências mais ou menos graves quer ao nível morfológico quer anatómico e fisiológico (Tab. 1.1).

Tabela 1.1. Características do ambiente de propagação in vitro nas fases de multiplicação e enraizamento, e os seus efeitos no crescimento dos explants e/ou plantas nas fases de multiplicação, enraizamento e aclimatização.

Características do ambiente	Efeitos <i>in vitro</i>	Efeitos <i>ex vitro</i>
♦ Humidade elevada	♦ ceras epicuticulares não organizadas ♦ mau funcionamento dos estomas ♦ enraizamento deficiente	♦ Excessiva transpiração ♦ Dificuldades na absorção de nutrientes
♦ Concentração elevada de etileno		
♦ Elevada [CO ₂] durante o período de noite	♦ Promove / inibe diferenciação	
♦ Baixa [CO ₂] durante o período de luz	♦ Baixa taxa de fotossíntese líquida ♦ Sem formação de novas folhas	♦ Suprime fotossíntese
♦ Baixa irradiância	♦ Dificuldade em desenvolver autotrofia	♦ Suprime fotossíntese
♦ Temperatura constante	♦ Elevada respiração nocturna	♦ Sensibilidade ao stress ambiental
♦ Baixa [O ₂] dissolvido no meio	♦ Dificuldade no enraizamento	♦ Morte das plantas
♦ Elevada concentração de iões inorgânicos	♦ Elevada pressão osmótica no meio, elevada produção de etileno	♦ Atraso no crescimento devido às baixas taxas de fotossíntese
♦ Meio com açúcar	♦ Vitrificação e outras desordens fisiológicas ♦ Contaminação por bactérias e fungos	
♦ Deficiências de circulação de ar	♦ Baixas trocas de gases, iões e outros	

(Adaptada de: Kozai, 1992)

As folhas são, sem dúvida, os órgãos mais afectados, sendo a redução de área foliar a alteração mais facilmente observável (Donnelly, 1986; Donnelly *et al.*, 1985). Ao nível anatómico é frequente observar-se um decréscimo na dimensão e no número de células do mesófilo, bem como o aumento do número de espaços intercelulares (Brainerd *et al.*, 1981; Wetzstein & Sommer, 1982; Marin *et al.*, 1988), do que resulta uma menor

espessura da folha. Os tecidos vasculares são também pouco diferenciados e, em geral, com redução da sua secção e deficientes conexões vasculares nos pecíolos (Donnelly *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1986). Ao nível ultraestrutural as células apresentam vacúolos muito desenvolvidos e cloroplastos com os sistemas membranares desorganizados (Wetzstein & Sommer, 1982).

Os estomas sofrem alterações na morfologia, distribuição, frequência e funcionalidade, tornando-se um dos principais responsáveis pelo deficiente controlo da transpiração e, como tal, na desidratação das microplantas. As células-guarda apresentam-se, em geral, mais arredondadas, com maior desenvolvimento e numa posição sobrelevada, o que confere ao estoma uma maior abertura (Wetzstein & Sommer, 1983; Conner & Conner, 1984; Capellades *et al.*, 1990). A densidade estomática, número de estomas por unidade de área, aumenta em condições *in vitro*. No entanto, se a frequência estomática for avaliada através do índice estomático², este parâmetro deixa de ser afectado pelo crescimento *in vitro* (Brainerd *et al.*, 1981; Wetzstein & Sommer, 1983; Conner & Conner, 1984; Capellades, 1990) e isto porque o número de células epidérmicas aumenta também. A deficiente funcionalidade estomática, dos movimentos de abertura e fecho, é também frequentemente referida (Brainerd & Fuchigami, 1981, 1982; Marín *et al.*, 1988; Sutter 1988; Shackel *et al.*, 1990).

O revestimento epidérmico é, geralmente, deficiente, apresentando as folhas cutículas pouco espessas, com menor conteúdo em ceras (Sutter *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1990) e de estrutura alterada (Grout & Aston, 1977a; Sutter & Langhans, 1979; Conner & Conner, 1984; Marín & Gella, 1988). Também ao nível da sua composição química tem sido referida uma menor proporção de componentes mais hidrofóbicos comparativamente aos componentes menos hidrofóbicos (Sutter, 1984; Capellades, 1989), do que resulta um aumento das taxas transpiratórias através da cutícula.

Ao nível do caule, os estudos são escassos. No entanto, a redução ao nível do diâmetro, a redução da quantidade de tecidos de suporte (esclerênquima e colênquima) e a redução no desenvolvimento da parede celular foram algumas das alterações referidas por Donnelly *et al.* (1985).

² Índice estomático (IE) = n° de estomas / (n° de estomas + n° células epidérmicas)

As deficiências anatómicas que acabámos de descrever implicam, como consequência, um comportamento fisiológico anormal e que se traduz numa deficiente capacidade de regulação hídrica e baixas taxas de fotossíntese aparente.

O material vegetal quando em condições *in vitro* desenvolve-se em condições de reduzida pressão evaporativa, já que a humidade relativa (HR) ambiente é elevada e a intensidade de luz baixa. Nestas condições, a taxa transpiratória é baixa, independentemente da abertura dos estomas (Shackel *et al.*, 1990). Quando as microplantas são expostas a HR baixas, tal como ocorre durante o transplante, elas podem evidenciar taxas de transpiração elevadas em consequência do deficiente funcionamento estomático (Brainerd & Fuchigami, 1982), reduzida protecção pelas ceras epicuticulares (Sutter & Langhans, 1982) e elevada densidade estomática (Capellades, 1989). Esta situação é por vezes excessiva levando a severos défices hídricos, difíceis de recuperar e responsáveis pela morte das plantas após as primeiras horas de transplante (Preece & Sutter, 1991). Se a tudo isto adicionarmos a deficiente funcionalidade de muitos dos sistemas radiculares formados *in vitro* facilmente concluímos da necessidade das plantas micropropagadas serem aclimatizadas durante algumas semanas por redução gradual da humidade relativa e acréscimo na intensidade luminosa.

A reduzida capacidade fotossintética das plantas micropropagadas tem sido atribuída à presença de sacarose no meio (Kozai & Iwanami, 1988; Kozai *et al.*, 1988; Capellades *et al.*, 1991; Kozai 1991b; Lees *et al.*, 1991; Pospisilova *et al.*, 1992), bem como à baixa intensidade luminosa e variações significativas na concentração de CO₂ (Kozai & Iwanami, 1988; Kozai *et al.*, 1987; Yue *et al.*, 1993b). No entanto, em algumas espécies, tem sido possível registar valores de capacidade fotossintética suficientemente elevados por forma a assegurarem o início do crescimento autotrófico (Lee *et al.*, 1985; Yue *et al.*, 1992).

A fraca intensidade de luz a que o material vegetal está sujeito não parece ser o factor mais limitante (Kozai, 1991b). Há algumas espécies que atingem a saturação a intensidades de luz relativamente baixas, por exemplo, Donnelly & Vidaver (1984), Smith *et al.* (1986) e Infante *et al.* (1989) referem uma intensidade saturante de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para *Rubus*, *Betula* e *Actinidia* respectivamente. Já Lee *et al.* (1985) referem que a actividade fotossintética em *Liquidambar styraciflua* durante o seu desenvolvimento

in vitro, atinge a saturação pela luz para PPFD's entre 350-450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A aplicação de uma intensidade luminosa mais elevada durante o período de cultura resulta num acréscimo da taxa de fotossíntese líquida, isto se os restantes factores não forem limitantes (Lee *et al.*, 1985; Kozai *et al.*, 1988; 1990; Dubé & Vidaver, 1992). No entanto, estes incrementos na intensidade do fluxo fotossinteticamente activo devem ser considerados cuidadosamente no sentido de prevenir possíveis fotoinibições (Dubé & Vidaver, 1992).

A concentração de CO_2 , tal como foi anteriormente referido, pode ser um factor extremamente importante no aumento da competência fotossintética de material *in vitro* (Cournac *et al.*, 1991; Kozai, 1991b; Dubé & Vidaver, 1992; Kubota & Kozai, 1992; Yue *et al.*, 1993a). Durante o período de escuro a concentração de CO_2 aumenta, atingindo o valor máximo no início do período de luz. A actividade fotossintética residual leva então ao rápido consumo de CO_2 , pelo que a planta fica sujeita, durante a maior parte do período de luz, a concentrações muito próximas, ou mesmo abaixo, do seu ponto de compensação para o CO_2 (Desjardins *et al.*, 1988; Infante *et al.*, 1989; Kozai, 1991b; Morini *et al.*, 1993). Parte do efeito benéfico do enriquecimento em CO_2 no crescimento é resultado do aumento do período de tempo durante o qual as microplantas podem assimilar CO_2 atmosférico. Contudo, um efeito complementar traz também vantagens: elevada concentração de CO_2 permite reduzir a actividade oxigenase da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), sendo a libertação de CO_2 devida à fotorespiração uma consequência directa da actividade oxigenase da Rubisco (Woodrow & Berry, 1988; Cournac *et al.*, 1991). Este processo fisiológico pode contribuir para uma perda na fixação de CO_2 e para dispêndio de energia sem benefício aparente de qualquer outra função.

2.3. Factores que condicionam a fase de aclimatização

Na última década, os progressos feitos no aperfeiçoamento das metodologias de micropropagação foram, sem dúvida, muito significativos. Porém, a utilização da micropropagação como técnica possível de ser aplicada comercialmente a um cada vez maior número de espécies vegetais sofre ainda de algumas restrições, uma das quais

continua a ser a elevada percentagem de plantas micropropagadas que ou não sobrevivem durante a aclimatização ou cujo crescimento e desenvolvimento fica muito aquém do desejado.

O termo aclimatização é definido como a adaptação climática de um organismo, em especial uma planta, que foi transferido para novas condições ambientais e cujo processo decorre sob controlo total ou parcial do homem. Este factor, intervenção humana, permite distingui-lo do termo aclimação, a qual se processa em condições naturais, isto é, sem intervenção humana (Conover & Poole, 1984).

Muitos têm sido os investigadores que têm desenvolvido estudos nesta área. Factores como o controlo de humidade (Brainerd & Fuchigami, 1981; Wardle *et al.*, 1983; Capellades, 1989), utilização de antitranspirantes (Sutter & Hutzell, 1984; Diettrich *et al.*, 1992), luz, englobando neste termo a densidade de fluxo fotónico, distribuição espectral, fotoperíodo e direcção de incidência (Economu & Read, 1987; Matysiak & Nowak, 1994; Vince-Prue, 1994) e concentração de dióxido de carbono (Desjardins *et al.*, 1987, 1990, 1995), são alguns dos factores determinantes no desenrolar do processo de aclimatização e, como tal, objecto de estudo.

Na base desta problemática estão as diferenças que se registam entre as fases da micropropagação que decorrem em condições *in vitro*, caracterizadas no ponto 2.2 deste capítulo, e a obrigatória passagem das microplantas para condições de ambiente natural. Como já foi referido, o crescimento das plantas *in vitro* ocorre em condições controladas, quer ao nível nutritivo, hormonal, químico e físico e, conseqüentemente, muito diferentes das condições naturais.

Há, assim, necessidade de uma fase de transição gradual para condições de crescimento natural, onde as plantas reajustam e readquirem processos fisiológicos que lhes permitem a passagem das condições heterotróficas para as condições autotróficas. Nesta fase são factores determinantes para a sobrevivência das microplantas a redução gradual da humidade relativa e a exposição progressiva a irradiâncias de luz mais elevadas.

A capacidade de aclimatização depende, assim, não só da espécie, das características morfológicas, anatómicas e fisiológicas das plantas regeneradas *in vitro*, como também das condições ambientais de stress a que as microplantas ficam sujeitas nesta última fase da micropropagação (Kozai, 1992; Chaves, 1994).

3. A MICROPROPAGAÇÃO NO CASTANHEIRO

3.1. A importância da espécie

O castanheiro desempenhou desde sempre um importante papel na economia rural das populações mais desfavorecidas das regiões interiores do nosso País. A castanha era utilizada para a alimentação humana e dos animais e parte dela era vendida, o que permitia obter alguns dividendos. O aproveitamento do lenho, de características excepcionais para a indústria de mobiliário e de tanoaria era uma segunda fonte de rendimento.

Esta situação de dupla aptidão do castanheiro, produtor de fruto e produtor de madeira, é hoje posta em causa pelas exigências da fruticultura moderna, pelo que se deverá evoluir pela delimitação das regiões e áreas segundo as suas características edafo-climáticas e definir, quais as de potencialidade para o castanheiro produtor de fruto e quais as de potencialidade para a exploração do castanheiro em talhadia e alto fuste.

Em termos de produção de fruto é unanimemente reconhecida a superior qualidade das castanhas portuguesas, sendo de referir entre as variedades mais comercializadas a Longal, Judia, Verdeal, Martainha, Côta, Lada, Bária, Colarinha e Negral. As regiões mais importantes de implantação desta espécie são as de Trás-os-Montes (Carrazeda de Montenegro, Bragança e Vinhais), Beira Interior (Trancoso, Sabugal e Guarda), Beira Litoral (Sernancelhe, Sátão, Vila Nova de Paiva e Moimenta da Beira) e, com menor significado, Alentejo (Castelo de Vide, Marvão e Portalegre). A área global não deverá actualmente ultrapassar os 30.000 ha, valor este que contrasta bastante com as áreas potenciais para esta espécie, que poderão atingir os 80.000 ha.

Uma vez que a *Castanea sativa* não apresenta resistência à doença da tinta, principal responsável pela morte de plantas e consequente drástica redução da área de cultura durante os últimos 50 anos, a disponibilidade de material vegetal com um maior ou menor grau de resistência tem-se revelado um factor condicionante da expansão da cultura. Uma primeira medida para solucionar aquela dificuldade consistiu na utilização de espécies exóticas, nomeadamente a *C. molissima* e a *C. crenata*, portadoras de genes de resistência à doença. Mas cedo se verificou que estas duas espécies eram bem mais exigentes sob o ponto de vista edafo-climático que a espécie *C. sativa* (Fernandes, 1957).

Na produção de fruto, tentou-se a utilização destas espécies como porta-enxertos para as nossas variedades, no entanto também rapidamente se começaram a verificar situações de rejeição da enxertia, incompatibilidade, pelo que esta via foi abandonada. Assim, em Portugal, tal como em outros países europeus, recorreu-se à hibridação da *C. sativa* com as referidas espécies exóticas, em especial com a *C. crenata*, portadora de genes de resistência à doença. Os objectivos pretendidos eram comuns a qualquer programa de hibridação, isto é, conseguir reunir num indivíduo características importantes que se encontram dispersas pelos seus progenitores e, eventualmente, obter o chamado vigor híbrido ou heterosis. Tais programas foram levados a cabo durante cerca de duas décadas no então chamado Centro de Estudos do Castanheiro, em Vimioso, Alcobaca, dos quais resultaram várias dezenas de híbridos considerados resistentes (Fernandes, 1948, 1957, 1970, 1982). Mas só a possibilidade de multiplicar em larga escala os indivíduos seleccionados, permitiria o desenvolvimento e concretização destes programas. Contudo, a quase total autoesterilidade do castanheiro, não permite a obtenção de linhas seminais com genótipo estável, pelo que a multiplicação vegetativa é a única via a explorar.

3.2. *Sistemas de multiplicação*

Para o castanheiro, a manutenção das características genotípicas (manutenção clonal) e a redução do período de juvenilidade, são factores determinantes para que a propagação desta espécie para a produção de fruto seja por via vegetativa.

É opinião generalizada, desde há muitos anos, de que o castanheiro é uma espécie de difícil enraizamento, o que significa que o enraizamento por estacas, método mais produtivo sob o ponto de vista de propagação vegetativa é, com base nos trabalhos publicados, de realização difícil e economicamente inviável no caso do castanheiro. Fracassos obtidos com a utilização desta técnica foram sucessivamente citados por Urquiijo (1952) e Vieitez (1952). Areses & Vieitez (1970) verificaram que as estacas de castanheiro adulto contêm inibidores de crescimento, detectados pelo teste do coleóptilo da aveia, e inibidores do processo de enraizamento, pelo que estes dois grupos de substâncias químicas devem desempenhar um papel determinante na fraca capacidade

rizogénica do castanheiro.

Em relação às técnicas convencionais de enxertia, nas suas diferentes variantes, elas têm sido utilizadas com relativo êxito, sendo a incompatibilidade entre cavalo e garfo uma das principais preocupações. Mas este método não resolve o problema da necessária multiplicação vegetativa de porta-enxertos seleccionados. O método mais utilizado para multiplicar este tipo de material tem sido a amontoa. Foi usado em Espanha por Vieitez (1955), com aplicação de auxinas e em Portugal por Fernandes (1972), que utilizou o anilhamento e a aplicação de auxinas em simultâneo. Esta técnica tem permitido a obtenção de plantas enraizadas e com manutenção genotípica da planta mãe, nomeadamente os referidos clones híbridos obtidos no ex-Centro de Estudos do Castanheiro. A aptidão de enraizamento varia de acordo com os clones. Mas se atendermos que de cada touça é possível retirar entre 10 a 12 plantas enraizadas, facilmente constatamos a dificuldade de por este método se obterem números significativos de plantas. A juntar a este aspecto, também a viabilidade destas plantas ao fim do primeiro ano é, por vezes, bastante reduzida.

As modernas biotecnologias que fazem uso da cultura de tecidos vegetais *in vitro* aplicadas à propagação de plantas, demonstraram já serem possuidoras de enorme potencial, capazes de serem alternativa eficaz às metodologias clássicas.

Os primeiros ensaios com este género foram desenvolvidos por Jacquiot (1950, 1970) a partir do estabelecimento *in vitro* de tecidos cambiais. As primeiras manifestações de organogénese foram observadas por Vieitez *et al.* (1978) que conseguiram obter rizogénese adventícia a partir de *calli* com origem em tecidos cotiledonares. As primeiras plantas completas foram obtidas a partir do desenvolvimento do embrião seminal (Vieitez e Vieitez, 1980a). Os trabalhos que se seguiram permitiram o estabelecimento e multiplicação *in vitro* de vários tipos de explantes provenientes de plantas com características juvenis, tais como gomos axilares (Vieitez & Vieitez, 1980b, 1982; Chevre *et al.*, 1983) e ápices caulinares (Rodríguez, 1982).

A utilização de explantes com origem em material de características adultas tem deparado com algumas dificuldades quer no estabelecimento quer na sua multiplicação. Os primeiros resultados com algum êxito foram referidos por Biondi *et al.* em 1981, e por Vieitez *et al.* em 1983. Esta última equipa utilizou como explantes segmentos nodais e

ápices caulinares de rebentos axilares de varas de amontoa. Na sequência desse trabalho, algumas condições gerais quanto à formulação dos meios de cultura têm vindo a ser obtidas, no sentido de permitir tornar a fase de multiplicação viável (Vieitez *et al.*, 1986; Gonçalves, 1991; Gonçalves *et al.*, 1993)

Na fase de enraizamento utilizam-se meios cuja concentração em macronutrientes é normalmente reduzida a metade da sua concentração (Vieitez *et al.*, 1983; Vieitez *et al.*, 1986), sendo indispensável a utilização de uma auxina em concentrações e tempo de aplicação que variam segundo a metodologia utilizada (Vieitez *et al.*, 1983; Gonçalves *et al.*, 1994).

Em relação à fase de transplante e aclimatização existe pouca informação disponível. Vieitez *et al.* (1986) referem valores de sobrevivência na ordem dos 35% e Mullins (1987) refere que para rebentos enraizados *in vitro* se registaram elevadas taxas de mortalidade, embora em rebentos com enraizamento *in vivo* se tivessem verificado melhores resultados, mas sem qualquer quantificação, e tudo com material juvenil. Em material adulto, Gonçalves *et al.* (1994) referem taxas de sobrevivência na ordem dos 50% em rebentos com enraizamento *in vitro*. Com a utilização de sistemas de enraizamento *ex vitro*, Miranda & Fernandez (1992) referem taxas de enraizamento na ordem dos 90% e com elevada taxa de sobrevivência das plantas na aclimatização. Como factores de sucesso referem-se não só o bom estado fisiológico das plantas regeneradas *in vitro*, a funcionalidade do sistema radicular e o tipo de substrato utilizado, mas também as condições ambientais, em particular a humidade e a temperatura.

4. OBJECTIVOS DO TRABALHO

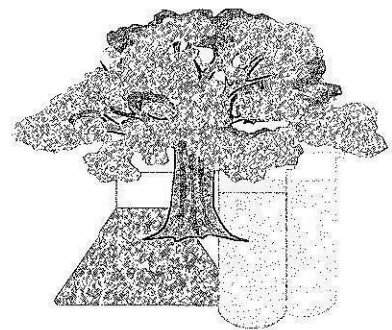
A investigação já realizada, em especial, nestas últimas duas décadas com esta espécie e anteriormente referida, definiu, de uma forma mais ou menos eficaz, para um número relativamente elevado de clones, protocolos para a fase de estabelecimento e multiplicação que se podem considerar como comercialmente aplicáveis. No entanto, a fase de enraizamento e aclimatização permanecem, ainda, como fases susceptíveis de sofrerem aperfeiçoamento por forma a tornarem o processo de micropropagação de clones

seleccionados de castanheiro comercialmente viável. Neste sentido os dois grandes objectivos deste trabalho foram:

- ✓ Desenvolver metodologias de enraizamento eficazes e susceptíveis de viabilizar elevadas taxas de sobrevivência na aclimatização, com caracterização de alguns aspectos morfológicos, anatómicos e bioquímicos da fase de enraizamento.
- ✓ Avaliar a influência do tipo de sistema radicular formado, *in vitro* ou *ex vitro*, e de níveis de irradiância, na sobrevivência e desempenho fisiológico das microplantas na fase de aclimatização.

Para a sua concretização, foram delineados ensaios que permitiram a avaliação e quantificação de diferentes parâmetros. Assim, para a fase de enraizamento foram desenvolvidos estudos ao nível histológico e anatómico do processo de rizogénese, que ocorreu em condições *in vitro* ou em condições *ex vitro*; como possíveis indicadores bioquímicos de rizogénese foram avaliados os níveis de actividade das peroxidases e a quantificação das concentrações endógenas de auxinas durante a fase de indução e desenvolvimento radicular. Na final da fase de enraizamento e aclimatização, para cada um dos tratamentos efectuados, foram avaliados os comportamentos e desempenhos das microplantas através de estudos feitos a diferentes índices quantificadores de análise de crescimento; a diferenciação ocorrida em termos anatómicos, histológicos e morfológicos das folhas formadas *in vitro* com comparação das folhas formadas na fase autotrófica, foi feita por microscopia óptica e electrónica de varrimento; foi avaliado o controle da perda de água por parte das folhas formadas durante a aclimatização; o desempenho fotossintético das folhas formadas *in vitro* e *in vivo*, foi feito através da quantificação da fixação do CO₂ e da evolução das taxas de libertação de O₂, com determinação dos índices de taxas de fotossíntese aparente, capacidade fotossintética, curvas de resposta a diferentes densidades de fluxo fotónico, rendimento quântico e ponto de compensação para a luz; foram também avaliados os teores de alguns metabolitos, tais como, clorofilas, hidratos de carbono solúveis e insolúveis e proteínas solúveis totais.

**MATERIAIS E MÉTODOS DE
CULTURA**



1. MATERIAL VEGETAL

Para a realização dos ensaios foi utilizado um clone de castanheiro adulto, híbrido de *Castanea sativa* x *Castanea crenata*, designado por M3, obtido na década de 60 no ex-Centro de Estudos do Castanheiro e considerado resistente à doença da tinta (Fernandes, 1948, 1957, 1970, 1982). Desde a sua obtenção que este clone tem sido mantido por amontoa no ex-Centro de Estudos do Castanheiro, Vimioso, Alcobaça, onde foram recolhidas as varas que permitiram o estabelecimento *in vitro* de acordo com a metodologia que a seguir resumidamente se descreve e já referida em trabalhos publicados (Vieitez *et al.*, 1983, 1986; Gonçalves, 1991).

2. CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTURA PARA ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO

Para a micropropagação deste clone foi utilizado o esquema base proposto por Murashige (1974) e Debergh & Maene (1981) já referido no cap. I deste trabalho. Assim:

Fase 0. Preparação do material vegetal.

De acordo com o procedimento descrito por Vieitez *et al.* (1983, 1986) foram recolhidas varas de rebentos provenientes de amontoa no período de repouso vegetativo, de Novembro a Janeiro, cortadas com ± 20 cm, desinfectadas durante 2 minutos com Benlate 2 gl^{-1} , envolvidas em plástico e colocadas durante 2 a 3 meses no frio a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Após este período as varas foram tiradas do frio e colocadas em estufa com condições controladas por forma a permitir o abrolhamento dos gomos axilares (Fig. 2.1). As varas foram mantidas durante 4 semanas com a base imersa em água, sob fotoperíodo de 16 h luz e 8 h noite a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante o dia e $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante a noite. Para facilitar o abrolhamento foram pulverizadas semanalmente com uma solução de 6-benzilaminopurina (BAP) numa concentração de 100 mg l^{-1} .

Fase 1. Estabelecimento de culturas assépticas.

Após o abrolhamento, os rebentos com crescimento entre 3 a 5 cm foram isolados das estacas, retiradas as folhas, parafinados na base e mergulhados em álcool a 70% durante 30 segundos. A desinfecção superficial foi feita com uma solução a 30% de hipoclorito de sódio, na forma de lixívia comercial com 5% de cloro activo, sob agitação, na câmara de fluxo laminar, durante 10 minutos. A remoção do agente desinfectante foi feita por quatro passagens sucessivas em água destilada e esterilizada, permanecendo os rebentos na quarta água. Como explantes primários, foram utilizados os ápices e gomos nodais (8 ± 2 mm) dos rebentos que, após serem seccionados, foram mantidos durante 15 minutos numa solução anti-oxidante¹. Para estabelecimento do material *in vitro* foi colocado um explante por tubo de ensaio (Fig. 2.2).

Fase 2. Multiplicação.

A multiplicação das culturas foi feita por repicagens sucessivas com intervalos de 4 a 5 semanas. Como explantes secundários de multiplicação utilizaram-se os ápices e os segmentos nodais provenientes da proliferação axilar dos rebentos, com 8 ± 2 mm de comprimento e um mínimo de dois gomos axilares (Fig. 2.3).

Fase 3. Enraizamento.

Os rebentos utilizados para o enraizamento foram provenientes de um meio de alongamento que adiante se refere. Esta fase foi objecto de estudo no presente trabalho pelo que está descrita em pormenor no ponto 3 deste capítulo.

Fase 4: Aclimatização.

A aclimatização das microplantas decorreu em ambiente controlado e, tal como a fase anterior, em virtude de ter sido objecto de estudo neste trabalho, será descrita em pormenor no ponto 4 deste capítulo.

¹ 100 mg l⁻¹ de ácido cítrico + 150 mg l⁻¹ de ácido ascórbico



Figura 2.1. Abrolhamento de varas de castanheiro em condições controladas. A barra representa 2 cm.



Figura 2.2. Explante primário 15 dias após o estabelecimento. A barra representa 1 cm.

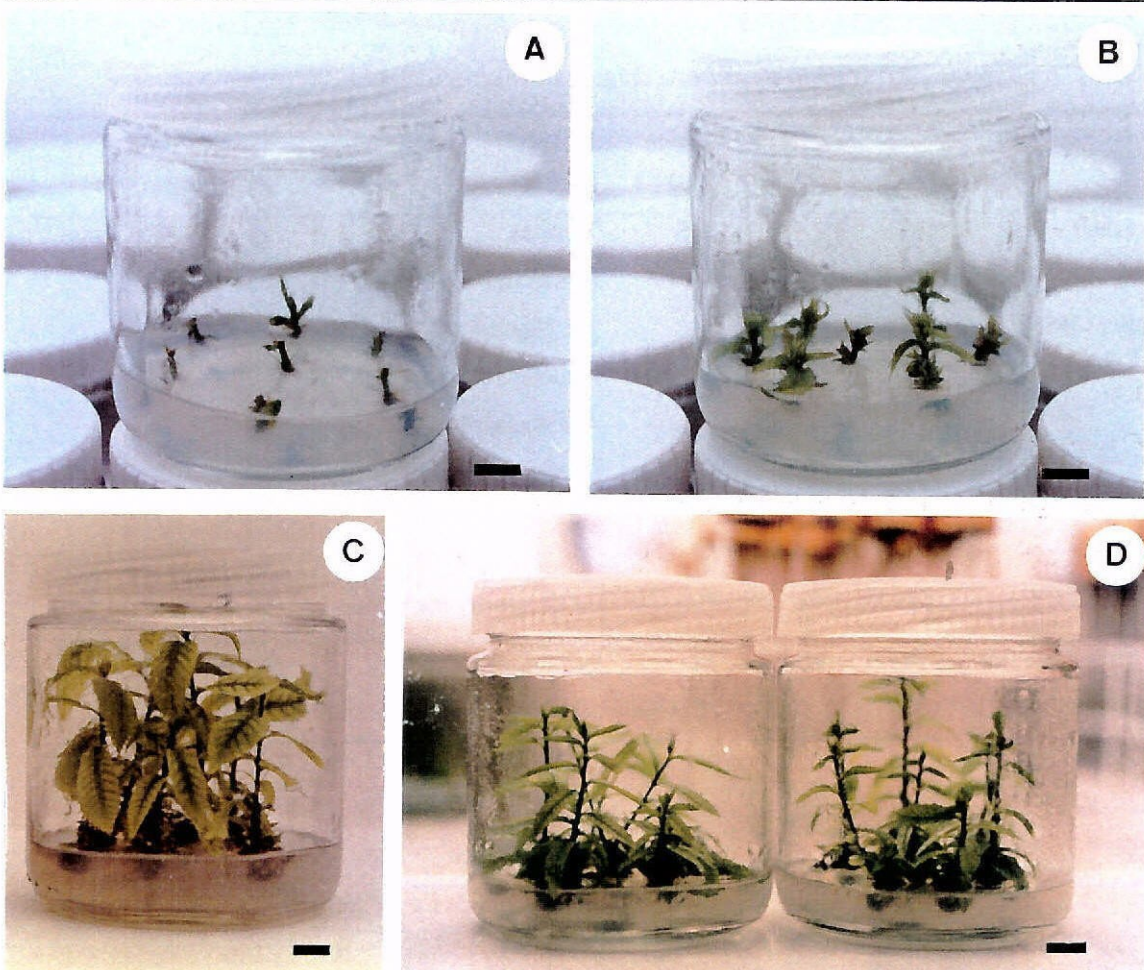


Figura 2.3. Fase de multiplicação de rebentos de castanheiro. (A) Explantes secundários após repicagem. (B) Explantes 1 semana após a repicagem. (C) Rebentos 4 semanas após a repicagem. (D) Aspecto dos rebentos no final do alongamento. A barra representa 1 cm.

Para cada uma das fases de cultura utilizaram-se diferentes formulações nutritivas descritas nas Tabelas 2.1, 2.2 e 2.3, para as fases de estabelecimento, multiplicação e alongamento respectivamente.

Tabela 2.1. Composição do meio de cultura da fase de estabelecimento.

Macronutrientes	Micronutrientes	Fe- -EDTA	Vitaminas (mg ^l ⁻¹)	Regulador de crescimento	
½ MS (1962)	MS	MS	Tiamina	1	BAP 0,5 mg ^l ⁻¹
			Piridoxina	1	
			Ác. Nicotínico	1	
			Pantotenato de Ca	1	
			Ácido ascórbico	1	
			Inositol	100	

Tabela 2.2. Composição do meio de cultura da fase de multiplicação.

Macronutrientes	Micronutrientes	Fe- -EDTA	Vitaminas (mg ^l ⁻¹)	Regulador de crescimento	
Greshoff e Doy (1972) ou Heller (1953) + 1 mM NH ₄ SO ₂	MS	MS	Tiamina	1	BAP 0,2 mg ^l ⁻¹
			Piridoxina	1	
			Ác. Nicotínico	1	
			Pantotenato de Ca	1	
			Ácido ascórbico	1	
			Inositol	100	

Tabela 2.3. Composição do meio de cultura da fase de alongamento.

Macronutrientes	Micronutrientes	Fe- -EDTA	Vitaminas (mg ^l ⁻¹)	Regulador de crescimento	
½ MS	MS	MS	Tiamina	1	BAP 0,2 mg ^l ⁻¹
			Piridoxina	1	
			Ác. Nicotínico	1	
			Pantotenato de Ca	1	
			Inositol	100	

Em todos os meios o pH foi ajustado entre 5,5 e 5,6 com HCl ou NaOH 1 N, antes de adicionar o agar (Difco Bacto Agar), que foi usado na concentração de 7 g l⁻¹. Para a preparação dos meios foi utilizada água destilada.

A esterilização dos meios de cultura foi feita por calor húmido em autoclave, durante 20 ou 25 minutos, de acordo com o volume de meio, a 121 °C e 1 atm.

Os recipientes de cultura utilizados em cada fase, bem como a suas dimensões, tipo de tampa, volume e número de explantes ou rebentos estão indicados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Características dos recipientes, volume de meio e número de explantes para as fases de estabelecimento, multiplicação e alongamento.

	Estabelecimento	Multiplicação	Alongamento
Tipo de recipiente	tubo de ensaio	frasco	frasco
Dimensões (mm)	150 x 25 Ø	90 x 75 Ø	90 x 75 Ø
Tipo de tampa	metal opaco	plástico translúcido	plástico translúcido
Volume de meio (ml)	12	50	50
Número de explantes	1	7	7

Todas as manipulações do material vegetal foram executadas em câmara de fluxo laminar horizontal, sobre caixas de Petri esterilizadas por calor seco durante 3 h a 180 °C. Os utensílios de corte e manuseamento, durante as operações, eram esterilizados em esterilizador de bancada a uma temperatura de 250 °C e durante 8/10 s (Steri™ 350).

As culturas foram mantidas sob condições ambientais controladas em sala de cultura ARALAB™, com fotoperíodo de 16 h e 8 h de escuro, sob uma densidade de fluxo fotónico (PPFD) de 45 ± 5 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes branco frio e à temperatura de 25 °C dia e 20 °C noite. A humidade relativa do ar, não controlada, foi da ordem dos 35 ± 5%.

3. FASE DE ENRAIZAMENTO

Utilizou-se material vegetal em multiplicação desde há dois anos. A sub-cultura anterior ao início dos tratamentos de enraizamento correspondeu a um período de

alongamento (4 semanas) no meio respectivo (Tab. 2.3 e Fig. 2.3D). Rebentos provenientes desse meio, com $4 \pm 0,5$ cm de comprimento aos quais foram retiradas as folhas dos 1,5 cm basais, foram utilizados em todos os ensaios da fase de enraizamento. A composição do meio base de cultura na fase de enraizamento está descrita na Tabela 2.5.

Tabela 2.5. Composição do meio base de cultura na fase de enraizamento.

Macronutrientes	Micronutrientes	Fe-EDTA	Vitaminas (mg l ⁻¹)
½ MS (½ NO ₃)	MS	MS	Tiamina
			Piridoxina
			Ác. Nicotínico
			Pantotenato de Ca
			Inositol
			1
			1
			1
			1
			100

3.1. Ensaio de enraizamento

No dia 0 de indução de rizogénese os rebentos, provenientes do meio de alongamento, foram decapitados, isto é, foi cortado o ápice. Este procedimento, para além de evitar o aparecimento da necrose apical, retira também o efeito de dominância apical facilitando, assim, o desenvolvimento do gomo axilar.

O enraizamento foi programado em duas fases, uma primeira fase de indução, em que é indispensável a presença de ácido 3-indol butírico (AIB), e uma fase de expressão e desenvolvimento em meio agarizado sem AIB, ou em substrato natural.

Para a fase de indução foram utilizados dois métodos. O primeiro consistiu na utilização de AIB, na concentração de 3 mg l⁻¹, no meio base de enraizamento (Tab. 2.5) com o qual os rebentos estiveram em contacto durante 5 dias, adiante referido por AIB3 (Fig. 2.4A). O segundo método consistiu na imersão da parte basal do rebento ($\pm 1,5$ cm) numa solução hidroalcoólica de AIB, na concentração de 1 g l⁻¹, durante 1 minuto, adiante designado por imersão (Fig. 2.4B).

Para a expressão e desenvolvimento radicular foram utilizados dois sistemas. O primeiro consistiu em colocar os rebentos induzidos pelos dois métodos atrás descritos, AIB3 e imersão, em meio base de enraizamento (Tab. 2.5) com 6 g l⁻¹ de carvão activo,

adiante designado por expressão e desenvolvimento *in vitro* (Fig. 2.5A). Os recipientes de cultura utilizados nesta fase, bem como a suas dimensões, tipo de tampa, volume e número de rebentos estão indicados na Tabela 2.6. O segundo consistiu em transferir os rebentos induzidos para uma mistura esterilizada de perlite:turfa (2:1,v:v) e humedecida a 70% da sua capacidade de retenção, contida em caixas de esferovite (60 x 40 x 20 cm), adiante designado por expressão e desenvolvimento *ex vitro* (Fig. 2.5B). As caixas foram tapadas com uma placa acrílica translúcida, e as plantas foram pulverizadas diariamente com água e fertilizadas semanalmente com uma solução de macro e micronutrientes do meio base de enraizamento a pH 5,5.

Tabela 2.6. Características dos recipientes, volume de meio e número de explantes para a fase de enraizamento com expressão e desenvolvimento *in vitro*.

	Enraizamento	
	Indução	Expressão e desenvolvimento
Tipo de recipiente	frasco	frasco
Dimensões (mm)	125 x 65 Ø	125 x 65 Ø
Tipo de tampa	plástico opaco	plástico opaco
Volume de meio (ml)	50	50
Número de explantes	5	5

Na Tabela 2.7 apresentam-se, em esquema, os tratamentos de enraizamento que acabámos de descrever.

Tabela 2.7. Esquema dos tratamentos de enraizamento. Para cada método de indução, foram ensaiados dois métodos de expressão e desenvolvimento radicular, *in vitro* e *ex vitro*.

Indução	Expressão e desenvolvimento
AIB3 (AIB 3 mg l ⁻¹ , 5 dias no meio)	meio sem AIB (<i>in vitro</i>) substrato natural (<i>ex vitro</i>)
IMERSÃO (AIB 1 g l ⁻¹ , 1 min)	meio sem AIB (<i>in vitro</i>) substrato natural (<i>ex vitro</i>)



Figura 2.4. Sistemas de indução radicular. (A) Indução com AIB 3 mg l⁻¹ no meio de cultura durante 5 dias. (B) Indução por imersão basal dos rebentos numa solução de AIB 1 g l⁻¹ durante 1 minuto. A barra representa 1 cm



Figura 2.5. Sistemas de expressão e desenvolvimento radicular. (A) Expressão e desenvolvimento radicular in vitro com a utilização do meio base de enraizamento com 6 g l⁻¹ de carvão activo. (B) Expressão e desenvolvimento ex vitro, em caixas de esferovite, numa mistura esterilizada de perlite e turfa. A barra representa 1 cm em A e 10 cm em B.

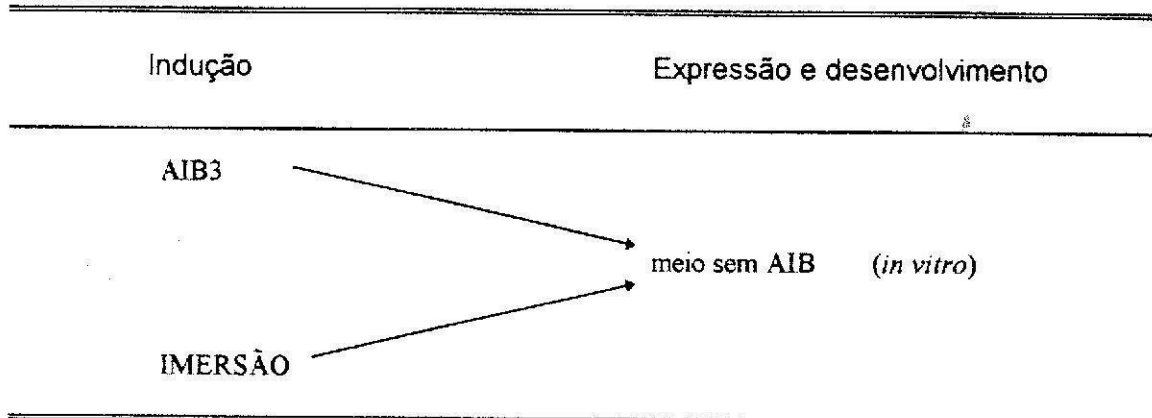
Quer os rebentos com expressão e desenvolvimento *in vitro* quer com expressão e desenvolvimento *ex vitro*, foram colocados na sala de cultura, durante 4 semanas, sob as condições standard de luz, fotoperíodo e temperatura, definidas no ponto 2 deste capítulo.

Como controlo foram utilizados rebentos provenientes do meio de alongamento (Tab. 2.3), colocados em meio base de enraizamento, sem AIB (Tab. 2.5) e transferidos para igual meio mas com carvão activo, no caso do enraizamento *in vitro*, ou para as caixas com substrato natural, no caso do enraizamento *ex vitro*.

3.2. *Indicadores anatómicos e bioquímicos*

Relativamente ao estudo desenvolvido sobre alterações anatómicas durante os primeiros dias de rizogénese, os estudos foram feitos tendo como base comparativa os dois métodos de indução da rizogénese de acordo com o esquema apresentado na Tabela 2.8, sendo a expressão e desenvolvimento radicular feita em meio agarizado sem AIB. Como controlo foram utilizados rebentos provenientes do meio de alongamento, sem indução em AIB, isto é, foram colocados directamente no meio base de enraizamento.

Tabela 2.8. *Métodos de indução e expressão e desenvolvimento radicular utilizados no enraizamento in vitro para o estudo de alterações anatómicas e de indicadores bioquímicos do enraizamento.*



Para o estudo de possíveis indicadores bioquímicos da rizogénese, concretamente a determinação da actividade peroxidásica e concentrações de auxinas, foi feito um estudo comparativo em moldes iguais aos acabados de referir para o estudo sobre alterações

anatômicas durante os primeiros dias de rizogênese. Os procedimentos técnicos para a execução e determinação destes parâmetros são adiante descritos em pormenor no ponto 2.3 do capítulo III.

4. FASE DE ACLIMATIZAÇÃO

Para a fase de aclimatização das microplantas foram utilizados estufins com um volume interno de 450 litros e equipados com dispositivos de controlo de luz e humidade (ARALAB™, mod. 500 E). Os estufins estavam colocadas numa sala climatizada a 25 °C. No interior dos estufins, como consequência da dissipação de calor pela energia luminosa, a temperatura oscilou em 25 ± 2 °C.

A iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes Osram® Lumilux White Cool e Sylvania® Gro-lux colocadas no topo do estufim, com intensidade de acordo com os tratamentos definidos no ponto 4.1 deste capítulo. O fotoperíodo utilizado foi de 16 h luz e 8 h noite.

A humidade relativa (HR), controlada por uma sonda higrométrica com controlo digital, era produzida por um sistema vaporizador de ultra-sons (sistema de nevoeiro), que produz gotículas de água, cujas dimensões permitem a criação de ambientes com humidade elevada, sem que haja significativa condensação. Os valores de HR foram sendo gradualmente reduzidos desde os 98% e 95% no dia 0 de instalação, respectivamente para as microplantas provenientes do enraizamento *in vitro* e *ex vitro*, até aos 50%, 24 dias após o início da aclimatização, mantendo-se esta humidade até ao final do período de aclimatização que foi de 4 semanas.

As microplantas usadas nos ensaios de aclimatização foram seleccionadas por forma a constituírem lotes homogêneos e apresentando sinais aparentes de crescimento quer da parte aérea quer da parte radicular. No caso das microplantas provenientes do enraizamento *in vitro*, após a remoção da planta do meio de cultura, foi feita a lavagem do sistema radicular em água corrente por forma a retirar o mais possível os restos de agar antes de serem colocadas em vasos. No caso das plantas com enraizamento *ex vitro*, estas foram retiradas das caixas e colocadas directamente nos vasos.

As microplantas foram colocadas individualmente em vasos de plástico com 200 cm³ de capacidade (Ø 9 x 8 cm). O substrato foi uma mistura igual à utilizada para a expressão e desenvolvimento radicular *ex vitro* (turfa:perlite, 1:2, v:v). Após o envasamento cada planta foi regada com uma solução nutritiva de Rhue *et al.* (1978), com as concentrações de nitratos e de cálcio modificadas para 3,5 mM e 1,5 mM respectivamente, micronutrientes de Arnon (1938) e o ferro fornecido na forma de citrato na concentração de 35,8 µM, pH 5,5, sendo de imediato colocada no estufim de aclimatização.

Na Figura 2.6 observam-se microplantas de castanheiro durante a fase de aclimatização.



Figura 2.6. Microplantas de castanheiro durante a fase de aclimatização no interior do estufim de aclimatização. (A) Microplantas no dia zero de aclimatização. (B) Microplantas na terceira semana de aclimatização; note-se uma etiqueta branca colocada numa das folhas das plantas a fim de identificar a primeira folha com expansão na fase de aclimatização. A barra representa 5 cm.

No final da primeira semana de aclimatização, foi colocada uma pequena argola em papel no pecíolo da primeira folha a contar do ápice, a qual foi considerada como folha um (*f1*), isto é, folha cuja formação e início de diferenciação ocorreu ainda durante a fase de enraizamento, mas cujo desenvolvimento e expansão ocorreu já em condições de aclimatização (Fig. 2.6.B). Este procedimento permitiu distinguir entre as folhas formadas na fase de multiplicação e que se mantiveram durante o enraizamento e aclimatização, a seguir designadas por folhas persistentes (*fP*), e as folhas cujo desenvolvimento e/ou expansão ocorreu exclusivamente durante a aclimatização, a seguir designadas por folha dois (*f2*), folha três (*f3*) e restantes, de acordo com a sua ordem de formação, e que no seu conjunto são a seguir também designadas por folhas novas (*fN*).

4.1. Tratamentos de aclimatização

Para os ensaios de aclimatização foram utilizadas microplantas com sistema radicular cuja expressão e desenvolvimento se deu em condições *in vitro* (meio agarizado) e *ex vitro* (substrato de turfa e perlite) e cuja indução radicular foi feita por AIB no meio de cultura (Tab. 2.9).

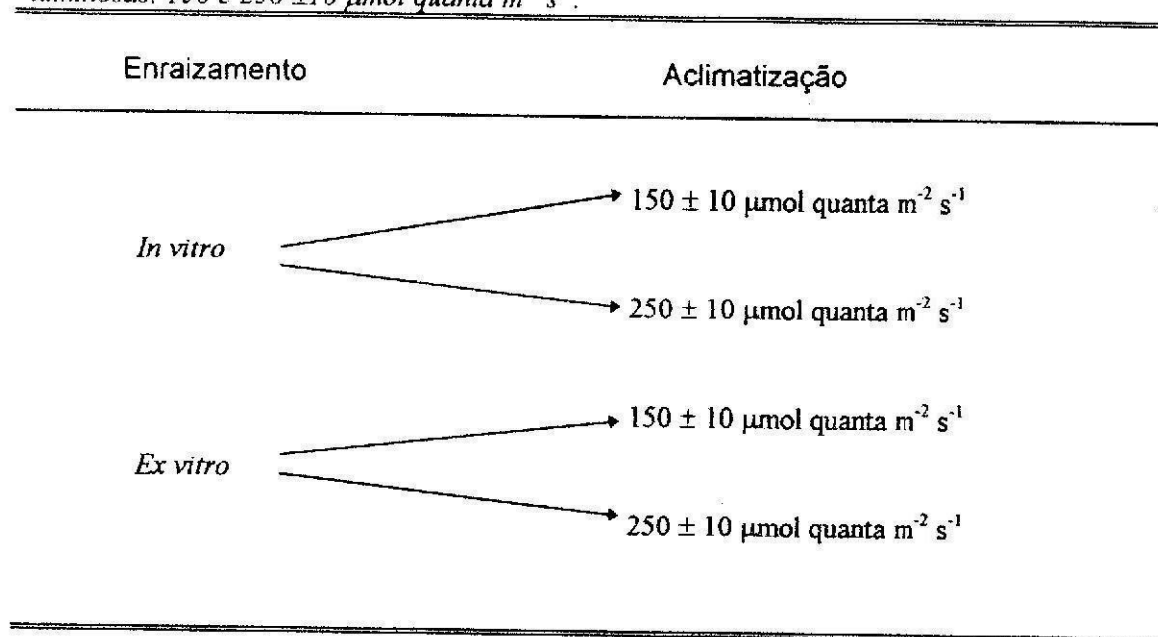
Tabela 2.9. Esquema de enraizamento para as microplantas utilizadas nos ensaios de aclimatização. A indução foi feita com AIB no meio de cultura e fizeram-se variar as condições de expressão e desenvolvimento radicular, *in vitro*, meio agarizado e *ex vitro*, substrato de turfa e perlite.

Indução	Expressão e desenvolvimento
AIB3	meio agarizado sem AIB (<i>In vitro</i>)
	mistura de turfa e perlite (<i>Ex vitro</i>)

Na aclimatização destas microplantas foram estudados os efeitos de dois níveis de irradiância, $150 \pm 10 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, de acordo com o esquema de tratamentos indicados na Tabela 2.10.

As intensidades luminosas foram controladas por um quantímetro LI-COR (Type LI-170), tendo os tratamentos referidos sido realizados em momentos diferentes.

Tabela 2.10. Esquema dos tratamentos de aclimatização. Para cada um dos tratamentos de expressão e desenvolvimento radicular, in vitro e ex vitro, foram usadas duas intensidades luminosas, 150 e $250 \pm 10 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



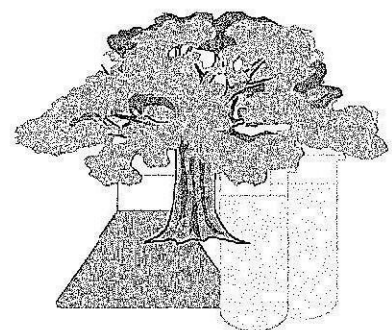
5. DELINEAMENTO E TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Face à diversidade dos ensaios realizados, e no sentido de uma melhor explicitação, os procedimentos particulares de delineamento e tratamento estatístico dos dados são referidos em cada um dos capítulos.

Na elaboração das bases de dados foi utilizado o programa Microsoft Excel®, Versão 7 para Windows 95®. Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizado o programa Statgraphics, Statistical Graphics System® Versão 6.0 e o programa Sigma Stat® Versão 1.0 da Jandel Scientific Corp™. Para a elaboração gráfica do trabalho foram

utilizados os programas Sigma Plot Versão 1.01© da Jandel Scientific Corp™, Microsoft Excel© e Microsoft Word©, Versão 7 para Windows 95©.

**ENRAIZAMENTO: SOBREVIVÊNCIA
E MORFOLOGIA RADICULAR,
ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E
BIOQUÍMICAS**



I. INTRODUÇÃO

A formação de um sistema radicular adventício por parte dos rebentos regenerados *in vitro* continua a ser um passo chave em todo o processo de micropropagação, qualquer que seja a espécie vegetal em estudo. Esta fase assume especial importância no caso das espécies lenhosas, nas quais o processo de maturação é normalmente acompanhado por uma diminuição da capacidade rizogénica (Németh, 1986; Davies & Hartmann, 1988; Pierik, 1990; Haissig *et al.*, 1992; Davies & Haissig, 1994).

Muitas são as referências feitas acerca dos factores envolvidos no controlo do enraizamento, no entanto muitas continuam também ainda a ser as interrogações que se levantam aos investigadores sobre as interacções entre os factores já identificados (McCown, 1988; Haissig *et al.*, 1992; Davies & Haissig, 1994).

As auxinas são, sem dúvida, um desses factores cujo importante papel na rizogénese é por todos reconhecido, em especial durante a fase de indução. O tipo de auxina, a concentração, o modo e tempo de aplicação, são aspectos que influenciam marcadamente este processo (Gaspar & Coumans, 1987; Blakesley, 1994). Dentro do grupo das auxinas, as mais utilizadas são o ácido indol butírico (AIB), o ácido indol acético (AIA) e o ácido naftalenoacético (ANA). Quanto ao modo de aplicação, elas podem ser incorporadas ao meio de cultura quer durante todo o processo de rizogénese, quer durante um período curto de exposição, que pode ir desde algumas horas até vários dias. Outro processo de aplicação consiste na imersão da base dos rebentos em soluções concentradas de auxina durante curtos períodos de tempo, de alguns segundos a poucos minutos. No castanheiro, alguns resultados têm sido apresentados (Vieitez *et al.*, 1986; Gonçalves, 1991; Miranda & Fernandez, 1992; Gonçalves *et al.*, 1993, 1994) no sentido de se definirem condições óptimas para o enraizamento e conseqüente capacidade de sobrevivência na aclimatização das plantas regeneradas *in vitro*.

Para a fase de expressão e desenvolvimento, factores como o meio de cultura, para o caso de enraizamento *in vitro*, tipo de substrato, para o caso de enraizamento *ex vitro*, estado fisiológico do rebento, humidade, luz e temperatura, entre outros, parecem ser os factores determinantes (McCown, 1988; Bonga & Von Aderkas, 1992). Os factores ambientais podem ser importantes no estímulo do enraizamento, nomeadamente a luz e a

temperatura, mas os resultados têm mostrado que estes factores actuam de uma forma muito variável de acordo com as espécies (Moncousin, 1991; Bonga & Von Aderkas, 1992).

Dependendo da espécie e também dos objectivos que se pretendem concretizar, a fase de expressão e desenvolvimento radicular pode ser executada quer *in vitro* quer *ex vitro* (*vide* Cap. I). Na expressão e desenvolvimento *in vitro*, para além da importância da formulação nutritiva, também a presença de carvão activado pode beneficiar o desenvolvimento do novo sistema radicular (McCown, 1988; Sanchez *et al.*, 1997). No castanheiro, as condições de expressão e desenvolvimento radicular *in vitro*, dependendo dos clones, têm sido definidas por vários autores (Vieitez *et al.*, 1983, 1986; Gonçalves, 1991; Gonçalves *et al.*, 1993, 1994). Em relação ao enraizamento *ex vitro*, normalmente considerado de execução mais difícil, ele tem vindo gradualmente a despertar o interesse dos investigadores tendo em vista a sua utilização sob uma perspectiva comercial. São conhecidas as múltiplas vantagens deste tipo de enraizamento (Maene & Debergh, 1983; McCown, 1988; Bonga & Von Aderkas, 1992). A mais importante talvez seja o facto de ser muito mais fácil de colocar em substrato uma simples microestaca, do que uma microplanta com um sistema radicular já desenvolvido, abrindo, assim, a possibilidade para uma mecanização mais eficaz. No entanto, outras são as razões que se poderão apresentar tais como, o facto de as manipulações poderem ser feitas em condições não assépticas e diminuição dos cuidados a ter com o transplante das plantas enraizadas, o que traz como consequência a redução de tempo de mão de obra. Também, contrariamente ao que por vezes sucede com os sistemas radiculares desenvolvidos *in vitro*, não se põem problemas de funcionalidade nas raízes formadas *ex vitro* (McClelland *et al.*, 1990). Outro factor, e não menos importante, consiste na redução do tempo do processo, uma vez que em simultâneo com o enraizamento se assiste desde logo a uma fase de pré-aclimatização das microplantas, em muitos casos, em condições já autotróficas, permitindo assim uma aclimatização sob condições ambientais menos controladas.

Associado aos sistemas indutores de rizogénese estão todo um conjunto de substâncias que, por aplicação exógena, desencadeiam internamente mecanismos metabólicos capazes de iniciarem um processo de formação de raízes adventícias. Aditivos ao meio de cultura, como poliaminas (Tiburcio *et al.*, 1989; Bagni *et al.*, 1993), fenóis

(Caboni *et al.*, 1992) e antioxidantes (Standardi & Romani, 1990) têm também sido referidos como possíveis de influenciar positivamente o enraizamento. Nos últimos anos, foi possível obter consideráveis evidências que mostram o importante papel celular e bioquímico que as substâncias auxínicas desempenham durante os diferentes estádios do processo de formação de raízes adventícias (Gaspar & Coumans, 1987; Davies *et al.*, 1988; Moncousin, 1991; Haissig *et al.*, 1992).

As variações das actividades das peroxidases durante o processo de rizogénese têm sido relativamente bem documentadas e explicitadas para diferentes espécies (Druart *et al.*, 1982; Berthon *et al.*, 1987; Gaspar *et al.*, 1992, 1994; Hausman, 1993; Auderset *et al.*, 1994; Ripetti *et al.*, 1994). Segundo Gaspar (1986) a formação de raízes é caracterizada por uma fase inicial em que se regista um incremento na actividade das peroxidases básicas, logo seguido por um decréscimo, enquanto a actividade das peroxidases ácidas aumenta regularmente ao longo do processo rizogénico. Análises das alterações da actividade total das peroxidases e dos espectros das isoperoxidasas no decorrer do enraizamento *in vitro* de diferentes espécies (Quoirin *et al.*, 1974; Van Hoof & Gaspar, 1976), bem como das células epidérmicas de tabaco (Gaspar *et al.*, 1977; Thorpe *et al.*, 1978), apontam para uma relação em que o processo de rizogénese se inicia após se atingir um determinado pico de actividade enzimática máxima. No entanto, e em consequência das suas múltiplas formas, bem como da sua participação no metabolismo auxínico, síntese da parede celular e resposta a ferimentos, entre outros, torna-se relativamente difícil definir o papel específico das peroxidases no processo de enraizamento. Tem sido proposto que as alterações das peroxidases básicas correspondem a alterações paralelas na actividade da AIA-oxidase (Mato & Vieitez, 1986; Mato *et al.*, 1988). De facto o nível de auxina endógena revela ter uma evolução inversa à actividade peroxidásica. Gaspar *et al.* (1994) observaram pela primeira vez uma quebra momentânea da actividade peroxidásica nas primeiras horas após o corte de microestacas de videira, seguida então de um aumento até um máximo e de um decréscimo antes do aparecimento de raízes. Inversamente, registaram um aumento do conteúdo de AIA livre durante as primeiras horas, seguido de um decréscimo até um mínimo a partir do qual se verifica um ligeiro aumento. Hausman (1993) observou a mesma evolução do AIA livre durante o enraizamento de estacas de choupo.

Em muitos casos, tem sido referido um acréscimo do conteúdo endógeno de auxinas na base dos rebentos durante o período de indução radicular (Fouret *et al.*, 1986; Liu & Reid, 1992), o que sugere a necessidade de níveis óptimos para o enraizamento se iniciar. Níveis baixos de auxinas têm sido considerados como responsáveis da falta de capacidade de enraizamento em muitas espécies (Smith & Wareing, 1972a, b). Contudo, noutros casos, os níveis de auxina não parecem ser limitantes (Biran & Halevy, 1973; Greenwood *et al.*, 1976).

Gaspar *et al.* (1994) referem que o primeiro passo na formação de raízes se traduz na desdiferenciação e reactivação celular. O sinal para este primeiro acontecimento poderá ser o aumento acentuado e rápido da concentração de AIA na zona de enraizamento. Em muitos casos o pico de AIA é temporário, decrescendo rapidamente. Este decréscimo coincide com o aparecimento de actividade da AIA-oxidase e da actividade das peroxidases anteriormente referido. Divisões celulares precoces e a formação de campos potencialmente morfogénicos (agregados de células sem diferenciação de polaridade) são as alterações que se seguem durante a fase de iniciação radicular. A fase seguinte, de expressão, corresponde à individualização e crescimento interno de meristemas e, para muitas espécies, a aplicação de auxinas exógenas nesta fase é quase sempre inibidora do desenvolvimento radicular (Gaspar *et al.*, 1992).

Com o objectivo de avaliar o comportamento rizogénico do clone M3 compararam-se dois métodos de indução de rizogénese, com AIB no meio de cultura e por imersão basal, com dois sistemas de expressão e desenvolvimento radicular, em meio agarizado, *in vitro*, ou directamente em substrato natural, *ex vitro*. A sobrevivência das microplantas assim regeneradas, no final da fase de aclimatização foi também outro dos aspectos analisados.

Para a caracterização do processo de rizogénese determinou-se a actividade enzimática das peroxidases solúveis e os níveis de AIA, IAAsp e AIB, durante os primeiros dias do processo de enraizamento. Em paralelo foi feito o estudo anatómico de modo a registar as alterações citológicas e histológicas que ocorrem durante o processo de indução e expressão das raízes adventícias.

2. MATERIAL E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

2.1. *Enraizamento in vitro e ex vitro*

As condições dos ensaios foram descritas em pormenor no ponto 3.1 do capítulo II. Sucintamente, foram comparados os dois métodos de indução definidos em trabalhos anteriores como sendo eficazes na promoção de um sistema radicular adventício (Gonçalves, 1991; Gonçalves *et al.*, 1993): aplicação de AIB na concentração de 3 mg l^{-1} no meio base de enraizamento durante 5 dias (adiante designado por AIB3); o segundo método de indução consistiu na imersão da base dos rebentos numa solução de AIB na concentração de 1 g l^{-1} durante 1 minuto (adiante designado por imersão). Todo o processo foi feito em condições assépticas na indução por AIB3 e não assépticas na indução por imersão nos rebentos com expressão e desenvolvimento radicular *ex vitro*.

Após a indução, os rebentos foram transferidos ou para meio base de enraizamento, sem AIB mas suplementado com 6 g l^{-1} de carvão activo, adiante designada por expressão e desenvolvimento radicular *in vitro*, operação feita em condições assépticas, ou para substrato natural constituído por uma mistura de turfa:perlite (1:2, v:v) humedecido a 70% e esterilizada durante 1 hora em autoclave a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1 atm, adiante designada por expressão e desenvolvimento radicular *ex vitro*, operação feita em condições não assépticas.

Na indução AIB3 e expressão *in vitro* foram colocados 5 rebentos por frasco (Fig. 2.4A e 2.5A). Na indução por imersão foram colocados 10 rebentos de cada vez em copo de precipitação de 30 ml contendo 15 ml de solução auxínica (Fig. 2.4B). Na expressão *ex vitro* foram colocados 60 rebentos por caixa (Fig. 2.5B).

Na avaliação dos tratamentos com expressão e desenvolvimento radicular *in vitro* foram contabilizados 30 rebentos, contidos em 5 frascos. No tratamento com expressão e desenvolvimento radicular *ex vitro*, foram contabilizados 60 rebentos, contidos numa caixa, tendo os ensaios sido repetidos 3 vezes. Os parâmetros registados, contabilizados após 4 semanas do momento de indução, foram a percentagem de enraizamento, o número de raízes e o comprimento da maior raiz por rebento enraizado. Foi também feita uma

análise qualitativa sobre alguns aspectos morfológicos e executados cortes histológicos do sistema radicular formado.

Para a execução dos cortes histológicos, o material vegetal foi fixado em FAA (formaldeído a 35%:ácido acético glacial:etanol absoluto:água, 2:1:10:7, v:v:v:v) durante pelo menos 24 horas. Ao ser retirado do FAA, o material vegetal foi lavado por duas vezes com etanol a 50% durante duas horas, após o que as amostras foram desidratadas numa série ascendente de etanol (60, 70, 80, 90 e 96%), permanecendo 1 hora, no mínimo, em cada uma das soluções e 24 horas na concentração de 96%. A infiltração foi feita com hidroxietilmetacrilato (LKB Historesin[®], Leica Comercial[™], Kit 70-2218-500) no vácuo; o material esteve previamente na solução de infiltração diluída a 50% durante 2 horas, passando depois para a solução de infiltração pura durante 3 horas. A inclusão foi feita em hidroxietilmetacrilato (LKB Historesin[®], Leica Comercial[™], Kit 70-2218-500) ao qual se adicionou um agente polimerizante (dimetilsufóxido). A polimerização foi feita em pequenos alvéolos de moldes de teflon, durante 2 horas à temperatura ambiente; durante o período inicial de polimerização foi necessário ter cuidado com a orientação do material vegetal. A montagem foi feita com os respectivos suportes plásticos dos moldes de teflon utilizado.

Os cortes do material foram feitos num micrótomo rotativo (American Optical Company[™], modelo 820) com espessuras de 5 a 7 μm . Após a montagem dos cortes sobre lâmina de vidro e secagem, a coloração foi feita com uma solução aquosa de azul de toluidina a 0,05% (p.v), durante cerca de 5 minutos, ou por ácido periódico e reagente de Schiff (PAS), usando o azul de toluidina como contrastante. Após lavagem em água corrente e secagem foi colocada a lamela sendo a preparação selada com Entellan[®].

Como controlo foram utilizados rebentos sem indução auxínica e que permaneceram durante todo o tempo do ensaio em meio base de enraizamento.

A metodologia de aclimatização utilizada para quantificar a sobrevivência foi descrita no ponto 4 do capítulo II, tendo sido utilizada uma intensidade de fluxo fotónico de $150 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2. *Estudo anatômico do enraizamento*

Para descrever as alterações anatômicas durante o processo de enraizamento, foram recolhidas amostras diárias, até ao dia 15, da parte basal dos rebentos (8 ± 1 mm). Foram comparados os dois métodos de indução de rizogénese descritos. Após a indução com AIB3, ou por imersão basal, os rebentos foram colocados em meio base de enraizamento, sem auxina (Tab. 2.8). Como controlo foram utilizados rebentos sem indução, estando desde o dia 0 em meio base de enraizamento, sem auxina.

A preparação do material vegetal para os cortes histológicos foi em tudo idêntica à descrita anteriormente no ponto 2.1, tendo sido utilizados as bases de quatro rebentos por cada dia analisado.

2.3. *Indicadores bioquímicos*

2.3.1. *Determinação da actividade peroxidásica*

Para os ensaios da determinação da actividade peroxidásica foram utilizados rebentos provenientes da fase de alongamento, com comprimentos entre 3 e 5 cm. Foram comparadas as actividades peroxidásicas, ao longo dos primeiros 8 dias de enraizamento, dos dois métodos de indução de rizogénese, descritos no ponto 3.2 do capítulo II, e que foram, AIB 3 mg l^{-1} no meio de cultura durante 5 dias, adiante designado por AIB3, e por imersão basal dos rebentos em AIB 1 g l^{-1} durante 1 minuto, adiante designado por imersão. Após a indução com AIB no meio, ou por imersão basal, os rebentos foram colocados em meio base de enraizamento sem auxina (Tab. 2.8). Como controlo foram utilizados rebentos sem indução, estando desde o dia 0 em meio base de enraizamento, sem auxina.

Os rebentos foram recolhidas após 0 h, 12 h, 24 h, 36 h, 2, 4, 6 e 8 dias de se ter iniciado a indução rizogénica. Foram retiradas as folhas, cortados sensivelmente a meio (± 15 mm), separando a metade apical da metade basal, pesados, congelados em azoto líquido e conservadas a -80°C até ao momento da extracção das peroxidases solúveis para

quantificação. A extracção, executada em câmara fria a 4 °C, consistiu na maceração em almofariz de cada uma das amostras, à qual era adicionada polivinilpolipirrolidina (PVPP) na proporção de 0,5 g por grama de peso fresco de material vegetal e tampão fosfato¹ pH 6,1 na proporção de 1 ml por 100 mg de peso fresco de material vegetal. Após a maceração e homogeneização, a suspensão foi centrifugada durante 20 min a 20.000 rpm a 4 °C. A actividade peroxidásica específica foi determinada por espectrofotometria UV/VIS a 25 °C, através da monitorização da formação de tetraguaiacol a 470 nm. Foi utilizado um programa informático que permitiu visualizar a cinética progressiva da reacção, tendo, por ensaios prévios, sido definido um tempo de reacção de 150 s, sendo considerado o tempo 0 de contagem para o diferencial de absorvência aos 50 s, tempo a partir do qual se considerou uma velocidade de reacção constante.

A mistura de reacção continha 100 µl de guaiacol 20 mM, 100 µl de peróxido de hidrogénio 10 mM, 700 µl de tampão fosfato e 100 µl de amostra. A actividade enzimática específica foi expressa como a variação de absorvência por minuto e por miligrama de proteína ($\Delta\text{Abs min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína), sendo também apresentada a actividade por peso fresco ($\Delta\text{Abs min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ pf).

Para a quantificação da proteína total solúvel em cada amostra foi utilizado o método calorimétrico de Bradford (1976). Este método baseia-se na capacidade de certos grupos livres do azul brilhante de Comassie G-250 se ligarem a grupos ácidos e básicos das proteínas, com a consequente alteração de cor. Esta alteração, quando lida a 595 nm, permite quantificar a concentração de proteína por interpolação numa recta padrão obtida a partir das absorvências de concentrações definidas de albumina de soro bovino. Para cada amostra foram utilizados 200 µl de extracto ao qual se adicionou 1 ml de azul brilhante de Comassie na forma comercial Bio-Rad®, diluído em água na proporção de 1:4 (v:v) que, após agitação, seguida de 10 min de tempo de reacção, foi lida a 595 nm.

Quer para as quantificações das actividades enzimáticas quer para a quantificação da proteína foram utilizadas cuvetes de 1,5 ml de capacidade, do tipo acrílico e descartáveis. As leituras foram feitas num espectrofotómetro UV/VIS de feixe duplo (Shimadzu UV-2100).

¹ Mistura de 85% solução A (KH_2PO_4 66,7 mM) + 15% solução B (Na_2HPO_4 62,5 mM)

Para cada amostra foram utilizadas as bases (± 15 mm) de 10 rebentos e o ensaio foi repetido duas vezes. Cada amostra foi lida por três vezes. Assim, cada valor representa a média de seis leituras, à qual se associou o valor do erro padrão.

2.3.2. Determinação das concentrações de AIA, IAAsp e AIB

Para os ensaios da determinação dos níveis endógenos de auxinas durante o processo de enraizamento, foram utilizados rebentos do clone M3 de castanheiro, provenientes da fase de alongamento, com comprimento entre 3 e 5 cm. Foram comparados os níveis endógenos de auxinas ao longo dos primeiros dias de enraizamento dos dois métodos de indução de rizogénese descritos no ponto 3.2 do capítulo II e também utilizados para a determinação da actividade peroxidásica, anteriormente descritos. Após a indução com AIB no meio, ou por imersão basal, os rebentos foram colocados em meio base de enraizamento, sem auxina (Tab. 2.8). Como controlo foram utilizados rebentos sem indução, estando desde o dia 0 em meio base de enraizamento, sem auxina.

Os rebentos foram recolhidas nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 6 e 8 após o início da indução rizogénica, retiradas as folhas e divididos em parte apical e basal (sensivelmente a meio) por forma a virem a ser analisadas independentemente, congelados em azoto líquido e conservados a -80 °C até ao momento da sua liofilização. A liofilização foi feita durante tempo variável, de acordo com a capacidade do aparelho e número de amostras a processar (liofilizador Freeze Dryer Micro Modulyo Edwards). Após liofilização, as amostras foram moídas manualmente em almofariz e guardadas a temperatura ambiente em exsiccador e às escuras até à sua utilização.

O protocolo de extracção, purificação e filtração encontra-se descrito na Figura 3.1 e foi adaptado de Nordström & Eliasson (1991) e Nordström *et al.* (1991). Todo o processo foi executado em sala com luz ténue, sem incidência directa de luz solar, e a temperatura baixa. Para a extracção foi utilizado um sistema de extracção de fase sólida com controlo individual de 12 colunas ligado a uma bomba de vácuo. Após a filtração, os extractos foram mantidos em congelador, a -20 °C, até à sua injeção no HPLC.

100 mg de amostra liofilizada e moída

Colocar amostra em almofariz, adicionar 5 ml de tampão 6,5 e moer²

Deitar para tubo de centrifuga → Lavar 2x com 5 ml tampão 6,5

Adicionar 100 µl de ANA 10 mg l⁻¹ e 100 µl de BHT³

Incubar no frio durante 1 h

Centrifugar a 4°C durante 10 min a 11.000 rpm

Retirar com pipeta pasteur e filtrar⁴ com vácuo moderado → Lavar com 5 ml de tampão 6,5

Ajustar volume a 20 ml com tampão 6,5 e dividir extracto em 2 de 10 ml cada

Passar por 1 coluna 6,5⁵ em vácuo moderado e recolher extracto

Lavar com 5 ml de tampão 6,5 → Adicionar 3 gotas de ácido fosfórico 2,8 N

Passar o extracto por 2 colunas 2,5⁶ em série em vácuo moderado sem recolher extracto

Passar pelas colunas:

- 2 ml água (não recolher)
- 2 ml etanol:ácido acético:água (20:78:2) (esta fracção recolhe-se)⁷
- 2 ml água (não recolher)

Eluir as auxinas retidas nas colunas⁸, adicionando a cada uma :

- 100 µl metanol 100%
- 500 µl metanol 80%

Guardar no congelador

Antes de injectar no HPLC, filtrar⁹

Figura 3.1. Protocolo utilizado para extracção, purificação e filtração de auxinas endógenas durante a fase de enraizamento de rebentos de castanheiro regenerados in vitro.

A quantificação foi feita num HPLC Waters Model 590, com detector de fluorescência Waters 470, sendo todo o processo de injeção feito em automático (Waters 717 plus Autosampler). Foi utilizado como suporte informático de apoio o programa Millennium™ Chromatography Manager 2010.

² Tampão fosfato pH 6.5 = (54 ml Sorensen A + 23 ml Sorensen B) / litro; Sorensen A : KH₂PO₄ 1/15 M; Sorensen B: Na₂HPO₄*12H₂O 1/15 M

³ Dissolver 1 mg ml⁻¹ em Metanol

⁴ Filtros Whatman GF/C Glass Microfibre Ø 55 mm

⁵ Colunas Supelco C18 1 ml / 100 mg previamente acondicionadas com 2 ml de etanol 95%, 2 ml de água e 2 ml de tampão 6,5 onde permanecem a 4 °C.

⁶ Colunas Chromabond C18 1 ml / 100 mg previamente acondicionadas como as anteriores excepto usar tampão fosfato pH 2,5 [(39 ml Sorensen A + 23µl HCl 12 N) / litro] onde permanecem a 4 °C.

⁷ Contém parte do AlAsp, é colocada no congelador até ser concentrada e reconstituída.

⁸ Sem recurso ao vácuo com auxílio de seringas de 1 ml.

⁹ Filtros 0,2 µm nylon de Ø 13 mm.

A fracção recolhida dos 2 ml de etanol:ácido acético:água (20:78:2) foi conservada no congelador, após o que foi concentrada por centrifugação e aquecimento no vácuo (UNIVAPO 100H). O resíduo sólido foi depois reconstituído com 1,2 ml de metanol 80%, agitado no vórtex, passado por ultrasons e filtrado com filtros de nylon, 0,22 μm com \varnothing 13 mm, antes de injectar no HPLC.

A coluna do HPLC foi uma coluna Hypersil ODS de 3 μm de 6 cm, tendo todo o processo de quantificação decorrido a temperatura ambiente (± 20 °C) e com um fluxo de 1 ml min⁻¹. Como fase móvel, foi utilizada uma mistura de 84% de acetonitrilo:ácido acético:água (10:2:88, v.v.v) e 16% de acetonitrilo para a fracção do AIA e AIB e de 95% e 5% respectivamente, para a fracção do AIAsp. O valor de excitação do detector de fluorescência estava programado para 292 nm e a luz de emissão foi monitorizada a 360 nm. A quantificação das auxinas foi feita por quantificação da área do pico de emissão, por extrapolação com rectas de calibração, feitas com soluções standard de AIA, AIA aspartato, AIB e ANA. Os tempos de retenção para as diferentes substâncias nas rectas de calibração, e para as condições descritas, foram para o AIAsp de 1,683 min, para o AIA de 3,383 min, para o AIB de 9,550 min e para o ANA de 12,100 min.

Cada amostra era constituída por 24 rebentos, divididos em parte basal (± 15 mm) e parte apical (± 15 mm) e o ensaio foi repetido três vezes. De cada extracto foram injectados 30 μl e feitas 2 injeções, tendo sido considerado o valor médio das duas leituras. Foram contabilizados os resultados de duas das repetições. Assim, cada valor representa a média de 4 valores, à qual se associou o valor do erro padrão.

2.4. Quantificação e tratamento estatístico dos dados

Todas as quantificações foram realizadas a partir de plantas casualizadas, correspondendo os valores apresentados a médias do número de amostras referidas para cada determinação.

Os resultados indicados para os parâmetros de morfologia radicular e sobrevivência na aclimatização foram avaliados por análise de variância bi-factorial.

No caso dos indicadores bioquímicos os resultados são apresentados sob a forma do valor médio das repetições \pm erro-padrão.

Nas análises de variância, para valores de F significativos foi feita a separação de médias pelo teste de comparação múltipla de Duncan para $P \leq 0,05$. Para resultados apresentados em tabelas, valores na mesma coluna seguidos por letras diferentes são significativamente diferentes. Para além deste nível de significância, consideraram-se dois outros níveis (1% e 0,1%), assinalando-se as probabilidades dos testes por $P > 0,05$ (ns), $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**) e $P \leq 0,001$ (***).

3. RESULTADOS

3.1. *Enraizamento e sobrevivência*

A sobrevivência dos rebentos submetidos aos dois métodos de indução de enraizamento, AIB3 e imersão, seguidos dos dois métodos de expressão e desenvolvimento radicular, *in vitro* e *ex vitro*, apresentou valores significativamente superiores para os rebentos cujos sistemas radiculares se desenvolveram *ex vitro*, isto é, em condições de substrato natural. De facto com este tipo de microplantas foi possível obter 100% de sobrevivência contra os 50% das microplantas com sistemas radiculares desenvolvidos *in vitro* (Tab. 3.1). O factor expressão foi o único responsável por estes resultados ($P \leq 0,001$), já que a influência do método de indução não é significativa, bem como não se registou interacção significativa entre os dois factores.

Os rebentos do controlo, sem indução auxínica, não manifestaram qualquer resposta rizogénica. Nos rebentos induzidos, não se registaram diferenças significativas na percentagem de enraizamento como consequência do factor indução, no entanto, as condições de expressão e desenvolvimento radicular mostraram ser um factor capaz de provocar variabilidade ($P \leq 0,05$). As percentagens de enraizamento mais elevadas registaram-se nas condições de expressão *in vitro*, com 93% para a indução com AIB3 e de 97% para a indução por imersão, sem diferença significativa entre si (Tab. 3.1). A modalidade de indução por AIB 3 e expressão *ex vitro* permitiu uma percentagem de enraizamento de 87%, enquanto para a expressão *ex vitro* com indução por imersão foi registado o valor de 77%. De referir ainda que não se registou interacção significativa entre estes dois factores ($P \leq 0,05$).

O número de raízes por rebento enraizado mostrou ser afectado quer pelo método de indução ($P \leq 0,001$) quer pelo processo de expressão e desenvolvimento ($P \leq 0,01$). O número de raízes mais baixo foi registado nos rebentos induzidos em AIB3 e com expressão *in vitro*, com uma média de $2,9 \pm 0,19$ raízes (Tab. 3.1), não tendo as restantes combinações apresentado diferenças significativas entre si. Na combinação AIB3 com expressão *ex vitro* obtiveram-se $3,9 \pm 0,23$ raízes por rebento enraizado, $4,2 \pm 0,19$ para a combinação imersão e expressão *in vitro* e $4,3 \pm 0,16$ raízes para a combinação imersão e

expressão *ex vitro*. Estes factores mostraram interacção entre si ($P \leq 0,05$), pelo que a influência do factor indução na capacidade de controlar o número de raízes formadas está dependente das condições de expressão e desenvolvimento.

Tabela 3.1. Resultados obtidos nos ensaios de enraizamento para o clone M3 após 4 semanas do início do processo, para os dois métodos de indução, AIB 3 mg l⁻¹ no meio base de enraizamento durante 5 dias (AIB3), ou por imersão em AIB 1 g l⁻¹ durante 1 minuto (imersão), seguidos de dois processos de expressão e desenvolvimento radicular, *in vitro*, isto é, em meio agarizado, ou *ex vitro*, isto é, em substrato natural. A sobrevivência na aclimatização foi quantificada 4 semanas após o início da aclimatização.

Indução		Expressão	Sobrevivência na aclimatização (%)	Enraizamento (%)	Número de raízes	Comprimento da maior raiz (cm)
[AIB]	Tempo					
3 (mg l ⁻¹)	5 dias	<i>In vitro</i>	50 b	93 a	2,9 b	3,3 c
		<i>Ex vitro</i>	100 a	87 ab	3,9 a	6,6 a
1 (g l ⁻¹)	1 min	<i>In vitro</i>	50 b	97 a	4,2 a	3,1 c
		<i>Ex vitro</i>	100 a	77 b	4,3 a	5,9 b

Em relação ao alongamento radicular, aqui contabilizado pela média dos comprimentos da raiz mais longa formada por rebento enraizado, apesar de ser um valor influenciado pelo método de indução ($P \leq 0,05$) ele é claramente afectado pelo ambiente de expressão e desenvolvimento ($P \leq 0,001$). O valor mais elevado, de $6,6 \pm 1,8$ cm, foi registado na expressão *ex vitro* com indução AIB3, diferindo significativamente dos restantes valores (Tab. 3.1). O ambiente de expressão radicular em meio agarizado proporcionou os resultados mais baixos no alongamento radicular. Este parâmetro não mostrou ser condicionado de uma forma interactiva pelos dois factores que sobre ele exerceram influência.

3.2. Morfologia e anatomia radicular

Ao nível morfológico e histológico a comparação dos dois tipos de sistema radiculares formados de acordo com o ambiente de expressão e desenvolvimento, *in vitro* e *ex vitro*, revelou algumas diferenças que a seguir se descrevem.

Uma diferença perceptível macroscopicamente tem a ver com a maior espessura e quase total ausência de ramificação secundária das raízes formadas *in vitro* (Fig. 3.2A e 3.3A), comparativamente com as *ex vitro* (Fig. 3.2B e 3.3B). A presença de uma estrutura calosa na zona de formação de raízes é mais evidente nos rebentos com expressão radicular *in vitro* (Fig. 3.3A), comparativamente aos rebentos cuja expressão e desenvolvimento radicular ocorreu em condições *ex vitro* (Fig. 3.3B).

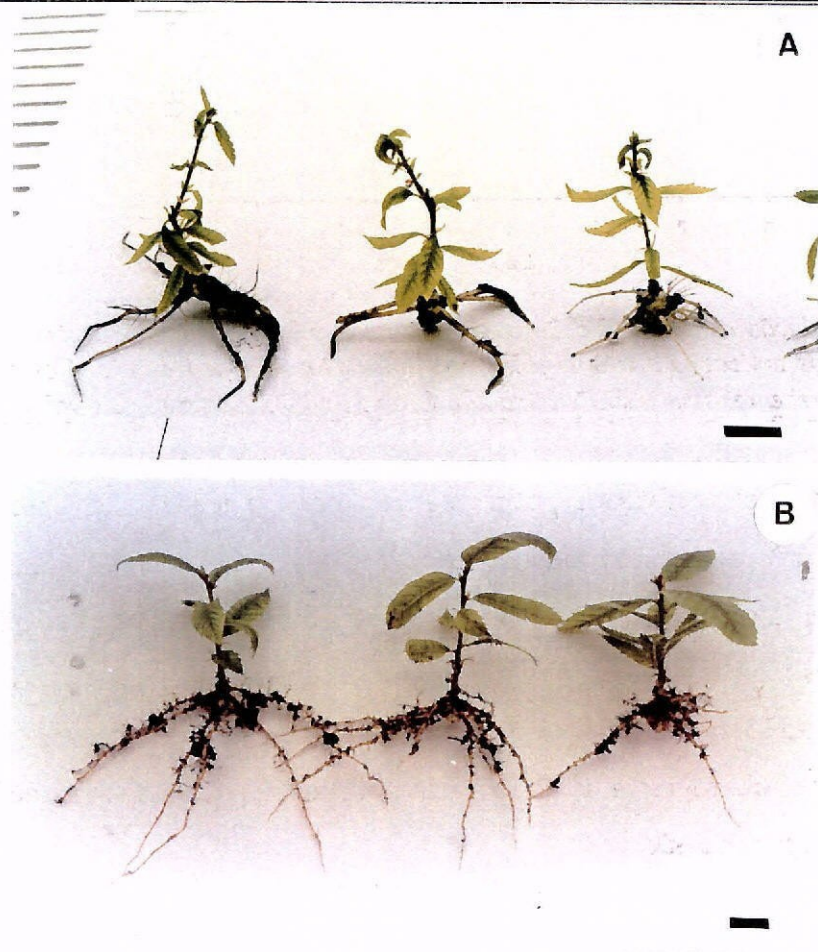


Figura 3.2. Aspecto de rebentos de castanheiro no final da fase de enraizamento. (A) Rebentos com expressão e desenvolvimento radicular *in vitro*. (B) Rebentos com expressão e desenvolvimento radicular *ex vitro*. A barra representa 1 cm.

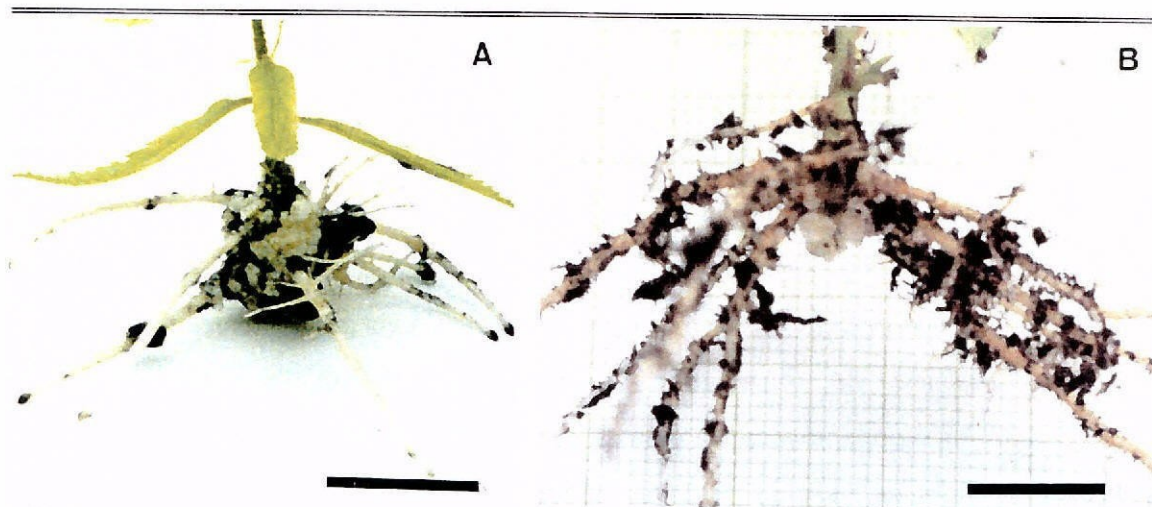


Figura 3.3. Pormenor do sistema de ramificação radicular. (A) Rebento com enraizamento in vitro. (B) Rebento com enraizamento ex vitro. A barra representa 1 cm.

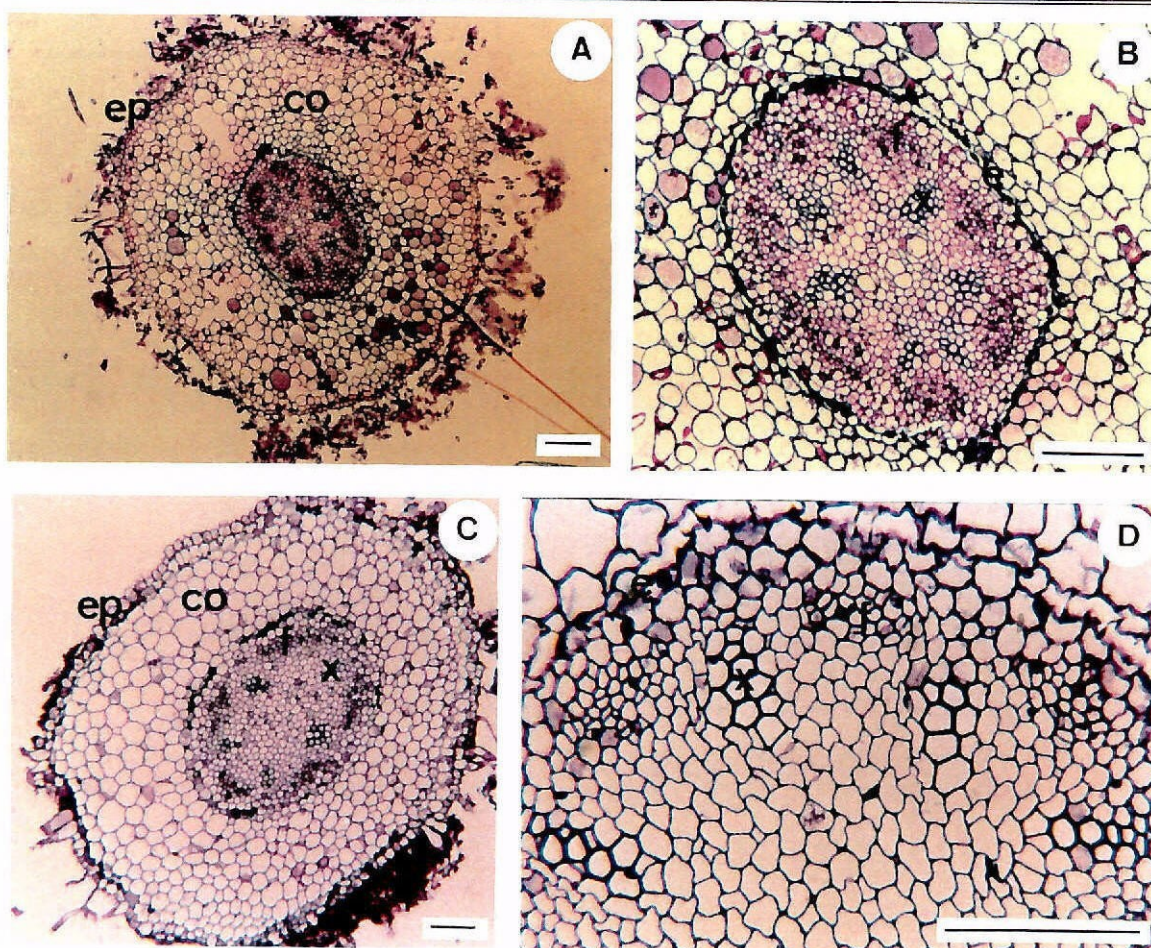


Figura 3.4. Cortes transversais de raízes adventícias de rebentos no final da fase de enraizamento. (A) Raiz com expressão e desenvolvimento in vitro. (B) Pormenor do cilindro vascular. (C) Raiz com expressão e desenvolvimento ex vitro. (D) Pormenor do cilindro vascular. Legenda: córtex (co); endoderme (e); epiderme (ep); floema (f); xilema (x). A barra representa 100 μ m em A, B e C, e 50 μ m em D.

O córtex e as áreas vasculares das secções das raízes *in vitro* apresentam-se pouco compactadas e com deficiente organização (Fig. 3.4A). Estes aspectos contrastam com as raízes desenvolvidas *ex vitro*, em que as células corticais se apresentam melhor organizadas, com espaços intercelulares muito reduzidos e uma distribuição dos tecidos vasculares mais regular (Fig. 3.4C e D). Comparativamente às raízes *in vitro* as raízes *ex vitro* apresentam uma maior proporção do cilindro vascular relativamente ao total da área transversal da raiz (Fig. 3.4A e C). Nas raízes que se desenvolveram em condições *ex vitro* é também frequente observar o início de formação de estruturas secundárias (Fig. 3.5) o que nunca foi possível observar nas raízes *in vitro*.

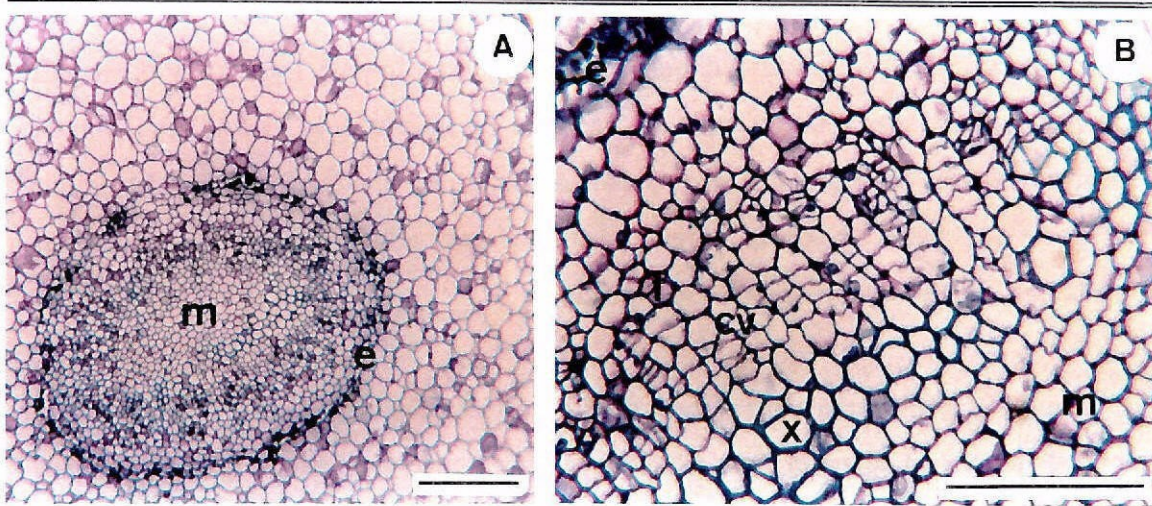


Figura 3.5. (A) Corte transversal de raiz adventícia desenvolvida *ex vitro*, com formação de estruturas secundárias no final da fase de enraizamento. (B) Pormenor do cilindro vascular. Legenda: câmbio vascular (cv); endoderme (e); floema secundário (f); medula (m); xilema secundário (x). A barra representa 100 μm em A e 50 μm em B.

3.3. Alterações anatômicas durante a rizogénese

O estudo anatómico do processo de enraizamento foi feito nos rebentos sujeitos aos dois tratamentos de indução, AIB3 e por imersão e no controlo, isto é, nos rebentos sem indução auxínica. Não se verificaram diferenças assinaláveis entre os rebentos induzidos por qualquer dos dois métodos, pelo que a descrição das alterações anatômicas que a seguir se referem se aplicam a ambos, sendo apresentadas fotografias dos cortes histológicos da base das microestacas induzidas com AIB3. Também de referir que o

processo de iniciação e desenvolvimento rizogénico não foi sincronizado no tempo, embora a sequência de alterações seja em tudo semelhante.

Dia 0: cortes transversais da base dos rebentos no dia 0 mostram uma organização histológica que se pode considerar como típica e normal para um caule de uma dicotiledónea (Fig. 3.6A). O câmbio vascular, interrompido pelas zonas interfasciculares, apresenta-se constituído por três a quatro camadas de células que vão gradualmente assumindo a sua diferenciação vascular em xilema e floema (Fig. 3.6B). O xilema é quase inteiramente constituído por elementos de xilema muito pouco lenhificados e por células de parênquima. O floema é constituído por células crivosas, células companheiras e células de parênquima. O córtex que rodeia o cilindro vascular é em grande parte constituído por células de parênquima de grandes dimensões, sendo interrompido logo após o anel de floema por um anel descontínuo de esclerênquima uniseriado (Fig. 3.6A). A delimitar externamente a zona cortical é visível uma camada de células que constitui a epiderme. De referir ainda que todas as células parenquimatosas, com possível excepção das células companheiras, se apresentam bastante vacuolizadas.

Dias 1-2: a alteração mais visível ao fim de vinte e quatro horas de indução é a presença de pequenos agregados de células com citoplasma densamente corado e núcleo com nucléolo proeminente (Fig. 3.6C). Estes pequenos agregados de células parenquimatosas derivadas do câmbio vascular estão localizadas preferencialmente junto ao floema. Tal como foi referido anteriormente, embora o processo não seja sincronizado, foi possível identificar algumas células em plena divisão celular.

Dias 3-4: após três a quatro dias de indução, o número de células em divisão aumentou de uma forma significativa, podendo então observar-se a formação de meristemóides entre a zona de floema primário e o câmbio vascular (Fig. 3.6D). Progressivamente os tecidos floémicos vão sendo comprimidos e os meristemóides, que se desenvolvem em direcção ao córtex e se apresentam separados deste por zonas de células alongadas radialmente, passam a ser designados por primórdios radiculares.

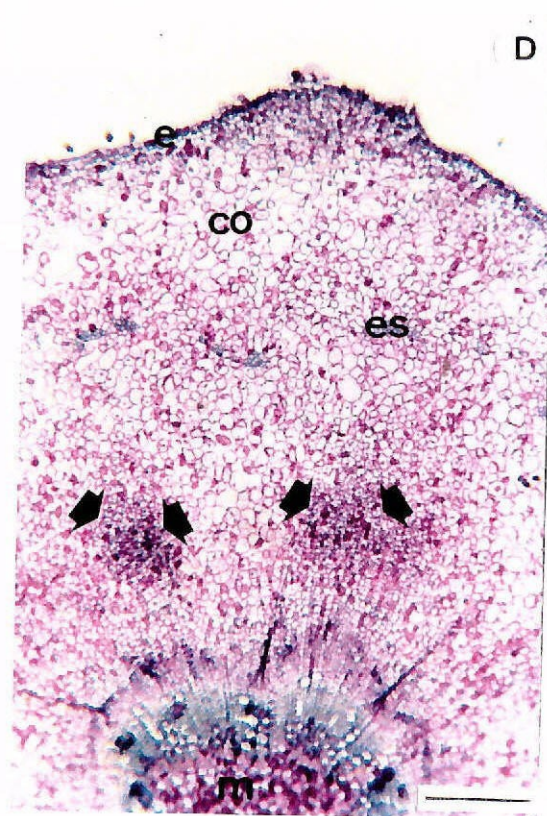
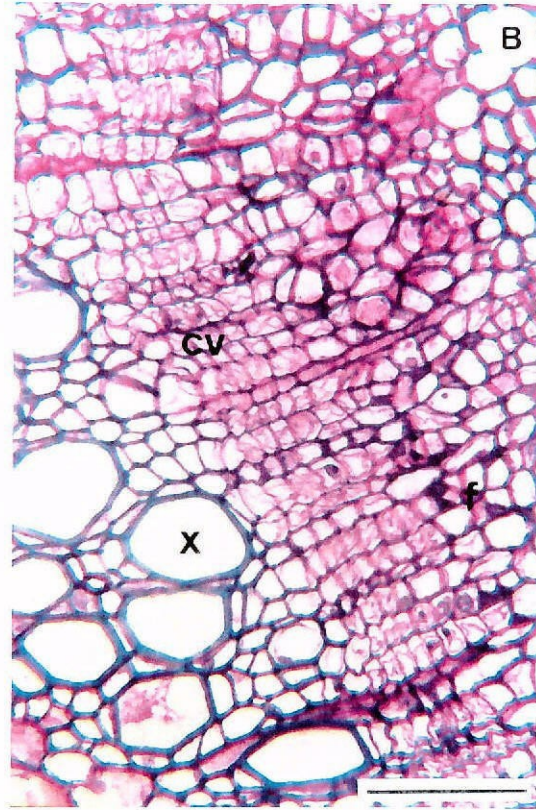
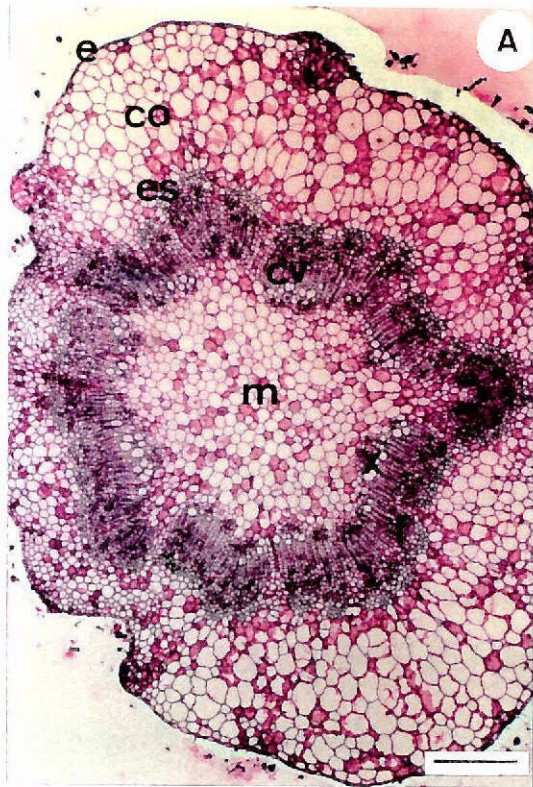
III. *Enraizamento: sobrevivência e morfologia radicular, alterações anatômicas e bioquímicas*

Dias 6-8: os primórdios radiculares, cuja fase inicial de diferenciação se observou nos dias 3 a 4, apresentam-se agora bem diferenciados e com a sua forma típica em ponta afiada acabando por atravessar o anel de esclerênquima e continuando o seu desenvolvimento através do córtex, provocando assim a sua saída para o exterior do caule (Fig. 3.6E). Assiste-se então a uma progressiva diferenciação das células do primórdio radicular. As mais externas começam a desempenhar as funções de epiderme; nas mais internas assiste-se a uma diferenciação em traqueídeos (Fig. 3.6F), os quais se dispõem horizontalmente e irão ligar-se aos elementos de xilema do caule, estabelecendo assim as conexões vasculares.

Dias 12-14: ao fim de doze a catorze dias após a indução os primórdios radiculares atingiram já dimensão suficiente para poderem ser vistos externamente, continuando-se assim o processo de desenvolvimento radicular (Fig. 3.7).

Páginas seguintes:

Figura 3.6. Cortes transversais da base dos rebentos do clone M3 de castanheiro durante o processo de rizogénese (ver explicação no texto). (A) Dia zero de indução. (B) Pormenor da zona cambial no dia zero. (C) Activação de células adjacentes ao câmbio que readquirem actividade meristemática 24 horas após o início do tratamento. A seta indica um final de mitose. (D) Formação de meristemóides entre os dias 3 e 4 (setas). (E) Emergência de primórdios radiculares após 6 a 8 dias de indução. (F) Diferenciação de elementos de xilema nos primórdios radiculares entre os dias 8 e 10 (setas). Legenda: câmbio vascular (cv); córtex (co); epiderme (e); esclerênquima (es); floema (f); medula (m); xilema (x). A barra representa 200 µm em A e E, 100 µm em D e 50 µm em B, C e F.



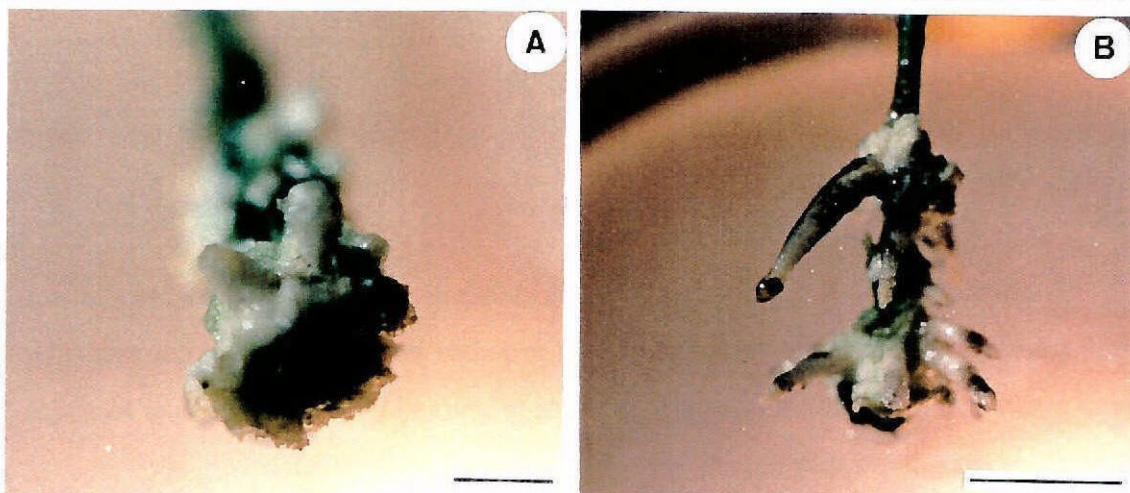
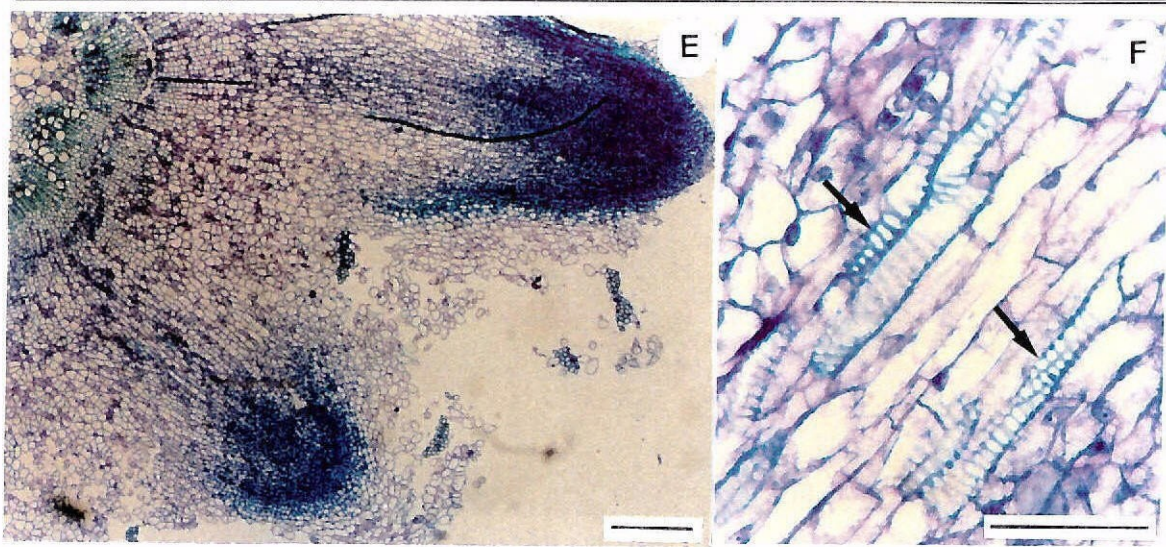


Figura 3.7. Aspecto macroscópico da emergência das raízes. (A) Ao fim de 10-12 dias após indução. (B) Ao fim de 16-18 dias após indução. A barra representa 0,5 cm em A e 1 cm em B.

No controle, durante os primeiros 3 a 5 dias, não foram observadas alterações anatômicas indicadoras de diferenciação ou actividade meristemática. Nos dias subsequentes, foi possível observar que, como resultado da actividade cambial, as células formadas não apresentavam qualquer diferenciação, constituindo assim uma massa celular parenquimatosa, de tipo caloso, com espaços intercelulares bem evidentes (Fig. 3.8) provocando uma acentuado entumescimento da base do rebento.

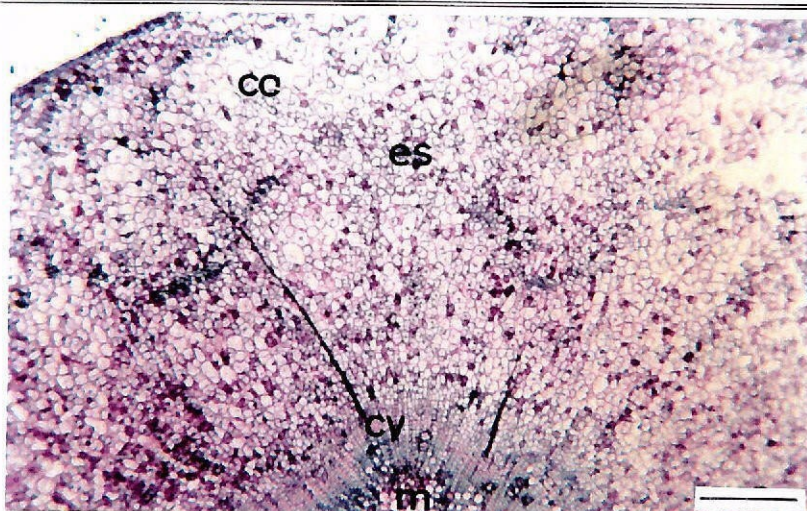


Figura 3.8. Corte transversal de rebento controlo, não induzido, após 7 dias em meio base de enraizamento sem AIB. É visível o aumento da zona entre o floema e o anel de esclerênquima bem como da zona cortical, como resultado do aumento de células de parênquima não diferenciadas, bem como no aumento de espaços intercelulares. Legenda: esclerênquima (es); câmbio vascular (cv); córtex (co); medula (m). A barra representa 100 μm .

3.4. Indicadores bioquímicos

Os resultados que a seguir se apresentam referem-se aos indicadores bioquímicos quantificados com o objectivo de caracterizar o processo de enraizamento, em particular durante a sua fase inicial de indução e expressão, procurando comparar os dois métodos de indução da rizogénese aplicados ao clone M3 utilizado neste trabalho.

3.4.1. Actividade peroxidásica

A variação da actividade específica das peroxidases foi, durante os dois primeiros dias, em tudo equivalente entre os dois tratamentos de indução, AIB3 e imersão (Fig. 3.9). Registou-se um significativo decréscimo entre as 0 e as 12 horas, no qual foi registado o mínimo de actividade peroxidásica. Este decréscimo foi seguido por um incremento na actividade específica no final do dia 1 de indução. Este padrão de comportamento foi em tudo similar aos rebentos do controlo.

A partir do dia 2, registou-se um aumento da actividade específica, com um acréscimo significativamente diferente entre os dois métodos. Assim, para os rebentos induzidos com AIB3, o aumento da actividade específica foi, até ao dia 6, significativamente menor comparativamente à actividade específica dos rebentos induzidos por imersão (Fig. 3.9). No entanto, a partir do dia 6, a actividade específica dos rebentos induzidos com AIB3 sofre um forte incremento, de tal forma que no dia 8 as actividades específicas dos dois métodos apresentam valores idênticos. De referir ainda que, no dia 8, a actividade específica dos rebentos controlo é de pouco mais de 50%, comparativamente aos rebentos induzidos.

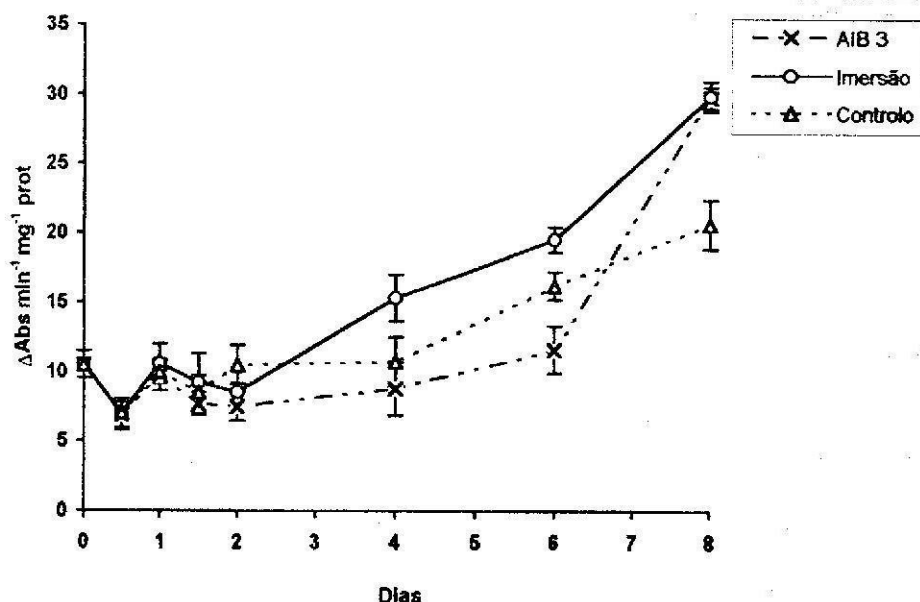


Figura 3.9. Actividade específica das peroxidases solúveis durante os primeiros 8 dias de enraizamento após aplicação dos dois métodos de indução: AIB3 e imersão. Como controlo foram utilizados rebentos sem indução auxínica. Cada ponto é a média de seis valores \pm ep.

O valor da actividade específica é condicionado pelos diferenciais de absorvência e pela proteína solúvel existente nas amostras. Analisando a variação da proteína solúvel total ao longo do enraizamento, verifica-se, às 12 h, um comportamento distinto entre os dois métodos (Fig. 3.10). Enquanto na indução por imersão a concentração de proteína se mantém sensivelmente estável, no método AIB3 regista-se um decréscimo. Às 24 horas a concentração proteica é idêntica nos extractos dos dois métodos indutores, seguindo-se um aumento equivalente até ao dia 2 de indução. A partir do dia 2 registou-se um

decréscimo gradual e constante até ao dia 8, para o método de indução por imersão; para o método AIB3, o decréscimo foi menor até ao dia 6, registando-se depois uma quebra acentuada até ao dia 8, atingindo um valor significativamente menor que o dos extractos dos rebentos induzidos por imersão (Fig. 3.10). Em relação ao controlo, registou-se um decréscimo gradual até ao dia 2, seguido de um incremento até ao dia 4, após o que a concentração de proteína solúvel nos extractos se manteve estável tendo-se medido, no dia 8, valores significativamente superiores aos dos rebentos induzidos (Fig. 3.10).

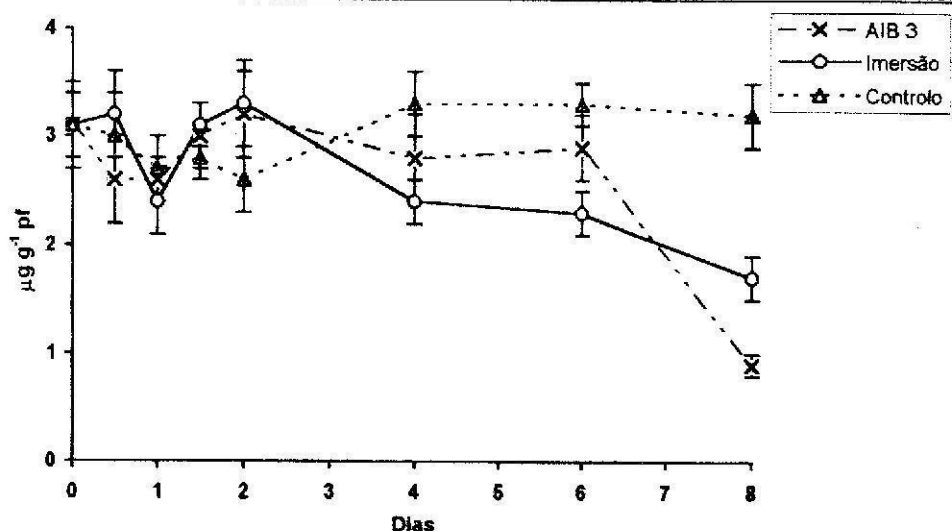


Figura 3.10. Evolução da concentração de proteína solúvel durante os primeiros 8 dias de enraizamento após aplicação dos dois métodos de indução: AIB3 e imersão. Como controlo foram utilizados rebentos sem indução auxínica. Cada ponto é a média de seis valores $\pm ep$.

Exprimindo a actividade peroxidásica por unidade de peso fresco ($\Delta Abs \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ pf}$), registou-se novamente um mínimo de actividade às 12 horas (Fig. 3.11). A este valor mínimo de actividade segue-se um acréscimo gradual até ao dia 8 de registo para os rebentos induzidos por imersão. O mesmo acontece para os rebentos com indução por AIB3 até ao dia 6, seguindo-se um decréscimo significativo (Fig. 3.11). Os rebentos do controlo seguiram um padrão de comportamento em tudo semelhante aos rebentos induzidos por imersão.

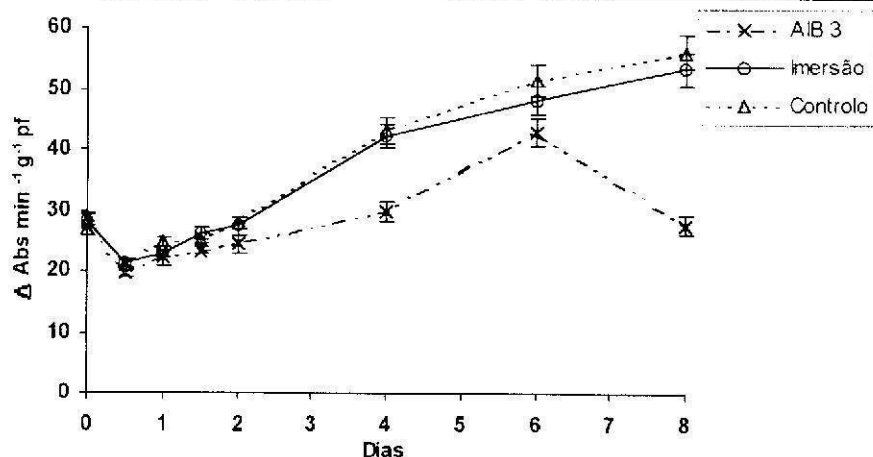


Figura 3.11. Evolução da actividade peroxidásica expressa por unidade de peso fresco durante os primeiros 8 dias de enraizamento após aplicação dos dois métodos de indução: AIB3 e imersão. Como controlo foram utilizados rebentos sem indução auxínica. Cada ponto é a média de seis valores \pm ep.

Para melhor compreender o comportamento da actividade peroxidásica quando expressa por unidade de peso fresco, apresenta-se na Figura 3.12 a evolução do peso fresco das amostras ao longo do período em análise.

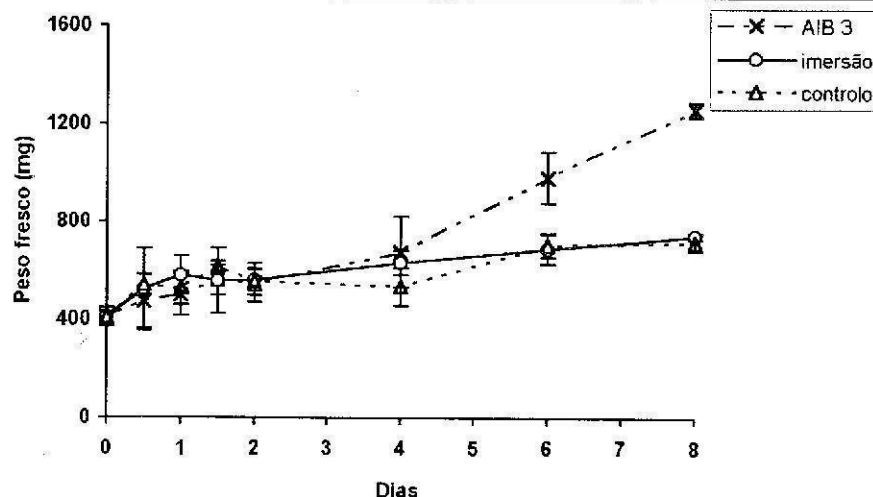


Figura 3.12. Evolução do peso fresco das amostras durante os primeiros 8 dias de enraizamento após aplicação dos dois métodos de indução: AIB3 e imersão. Como controlo foram utilizados rebentos sem indução auxínica. Cada ponto é a média de seis valores \pm ep.

Nos rebentos controlo e induzidos por imersão, registou-se um ligeiro acréscimo do peso fresco ao longo dos dias de tratamento. Nos rebentos com indução por AIB3

verificou-se, até ao dia 4, um aumento gradual semelhante ao controlo e indução por imersão. A partir deste dia os rebentos induzidos por AIB3 apresentam um acréscimo significativo do peso fresco até ao dia 8 de tratamento. De um valor médio no dia 0 de 408 ± 38 mg, os rebentos induzidos com AIB no meio atingiram 1260 ± 30 mg, contra 741 ± 13 mg dos rebentos induzidos por imersão e 717 ± 33 mg para os do controlo (Fig. 3.12). Este aumento de peso fresco deve-se, em grande parte, ao desenvolvimento de uma estrutura calosa na base do rebento durante o processo de enraizamento, o qual assume especial significado nos rebentos induzidos com AIB no meio (Fig. 3.13).

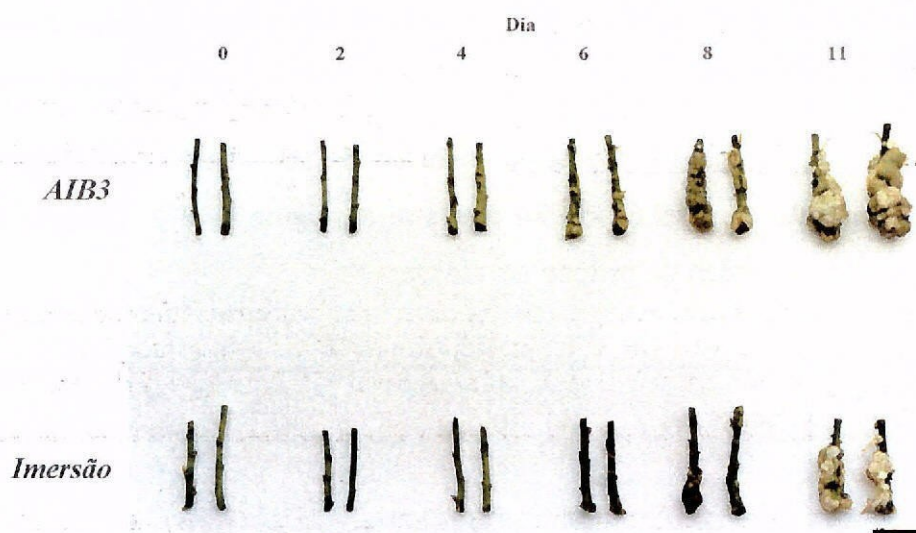


Figura 3.13. Aspecto morfológico da base dos rebentos durante os primeiros 11 dias de enraizamento após aplicação dos dois métodos de indução: AIB3 e imersão. A barra representa 1 cm.

3.4.2. Variação nas concentrações de AIA, AIAsp e AIB

Os rebentos de castanheiro estão totalmente dependentes da presença de uma auxina exógena para apresentarem capacidade rizogénica. Rebentos sem indução não manifestam qualquer actividade meristemática indiciadora de competência rizogénica (ver ponto 3.3 deste capítulo), podendo assim ser utilizados como referenciais comparativos com o que sucede nos rebentos induzidos.

A concentração de AIA nos rebentos controlo manteve-se sensivelmente constante ao longo dos 8 dias de cultura, quer na metade basal dos rebentos (Fig. 3.14A) quer na metade apical (Fig. 3.14B) com valores absolutos relativamente semelhantes entre as duas metades, mas sempre significativamente menores comparativamente aos rebentos induzidos.

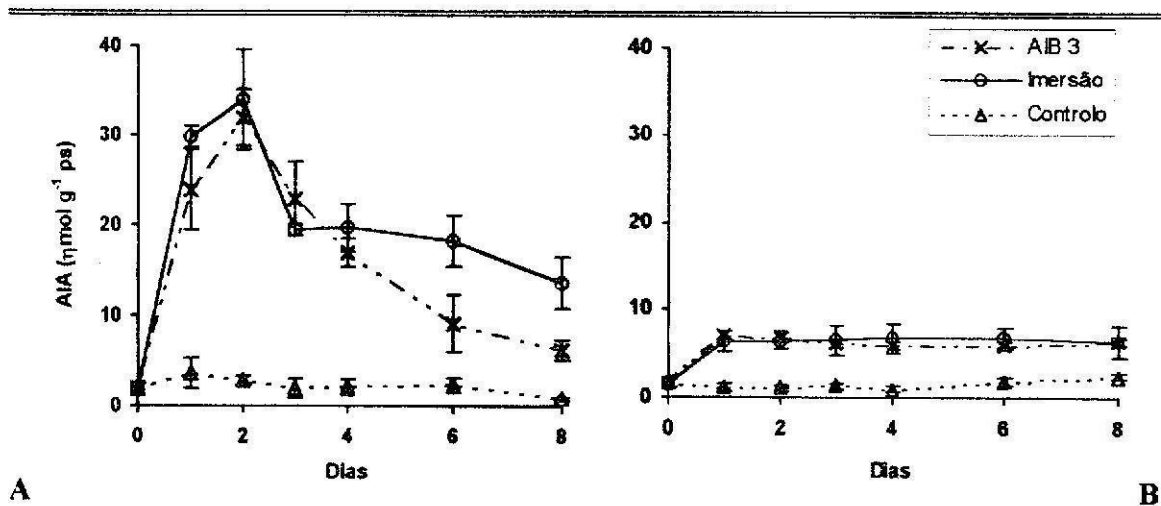


Figura 3.14. Evolução das concentrações de AIA durante os primeiros 8 dias de enraizamento após aplicação dos dois métodos de indução: AIB3 e imersão. Como controlo foram utilizados rebentos sem indução auxínica. (A) Parte basal do rebento. (B) Parte apical do rebento. Cada ponto é a média de 4 valores \pm ep.

Na metade basal dos rebentos tratados com AIB (Fig. 3.14A), a concentração de AIA sofreu um forte incremento, observando-se um pico no dia 2 de cultura, independentemente do método utilizado para a indução rizogénica, ao qual se seguiu um decréscimo gradual mais acentuado nos rebentos induzidos por AIB3, em especial a partir do dia 4. Na parte apical dos rebentos (Fig. 3.14B), registou-se um ligeiro aumento na concentração de AIA após 1 dia no meio de cultura, ao qual se seguiu um período estável nas concentrações ao longo do tempo. Também nos rebentos induzidos, as concentrações de AIA são muito menores nos ápices em relação às bases.

No controlo, a evolução das concentrações de AIAsp apresentaram uma tendência de comportamento semelhante à verificada para o AIA, ao contrário dos rebentos induzidos onde se verificaram algumas diferenças (Fig. 3.15). Na metade basal dos rebentos induzidos por AIB3, registou-se um incremento constante com um máximo após 6 dias de cultura, ao qual se seguiu um decréscimo (Fig. 3.15A). Já os rebentos induzidos

por imersão mostraram um incremento mais acentuado até ao dia 2, após o que os níveis de AIAsp se mantiveram com ligeiras flutuações ao longo do restante tempo de cultura.

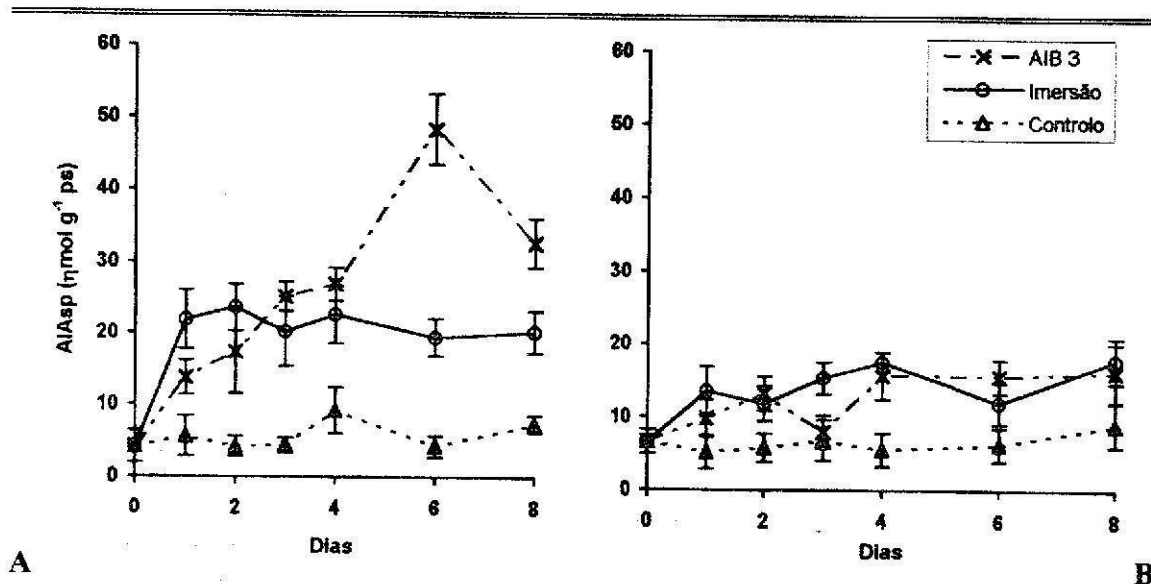


Figura 3.15. Evolução das concentrações de AIAsp durante os primeiros 8 dias de enraizamento após aplicação dos dois métodos de indução: AIB3 e imersão. Como controlo foram utilizados rebentos sem indução auxínica. (A) Parte basal do rebento. (B) Parte apical do rebento. Cada ponto é a média de 4 valores \pm ep.

Na metade apical dos rebentos, os valores absolutos são inferiores aos registados na metade basal, registando-se ligeiros picos após 1 e 4 dias nos rebentos induzidos por imersão e no caso dos rebentos induzidos por AIB3, registou-se um leve incremento no dia 2 e 4, após os quais os valores estabilizaram (Fig. 3.15B).

As concentrações de AIB presentes nos extractos em análise revelaram a capacidade de absorção e translocação desta substância por parte dos rebentos de castanheiro durante o período de indução radicular. Assim, registou-se um significativo acréscimo no nível de AIB nas metades basais, o qual atingiu um valor máximo no dia 1 de cultura no método por imersão e no dia 2 no método AIB3 (Fig. 3.16A). Nos rebentos induzidos por imersão, assistiu-se depois a uma rápida descida da concentração de AIB até ao dia 4, mantendo-se nesses valores com ligeiras flutuações. Nos rebentos induzidos por AIB3 ao valor máximo verificado no dia 2 segue-se um decréscimo ligeiro até ao dia 4, seguido de uma quebra acentuada entre o dia 4 e o dia 6 (Fig. 3.16A). Na metade apical dos rebentos, e para ambos os métodos, assiste-se a um ligeiro acréscimo no dia 1 de

cultura, após o que se segue uma estabilização nos níveis de AIB no caso dos rebentos induzidos por imersão e um gradual e leve decréscimo nos rebentos induzidos por AIB3 (Fig. 3.16B).

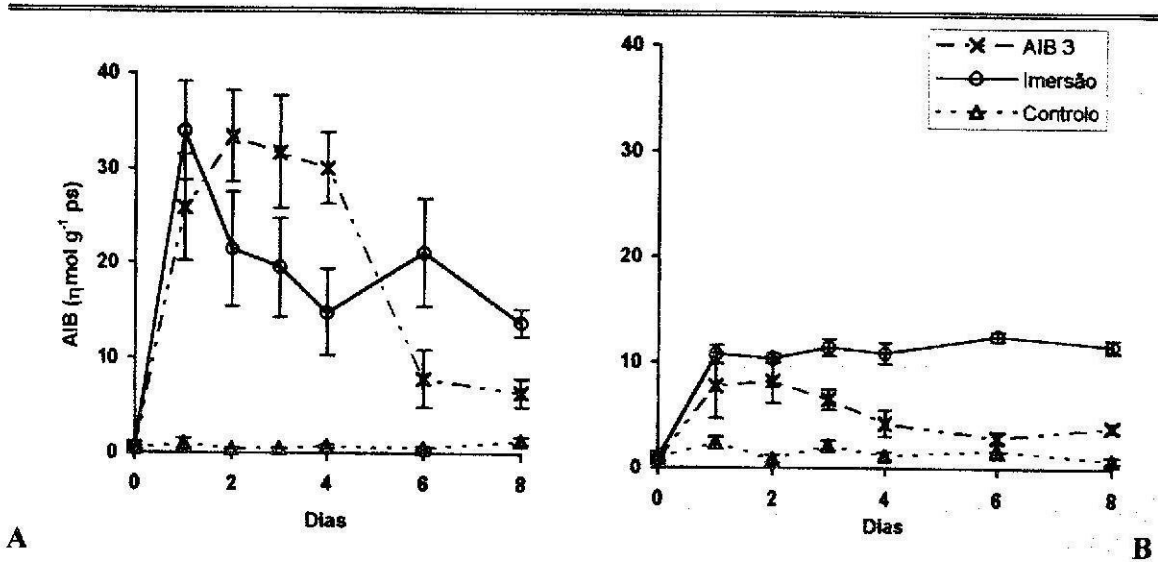
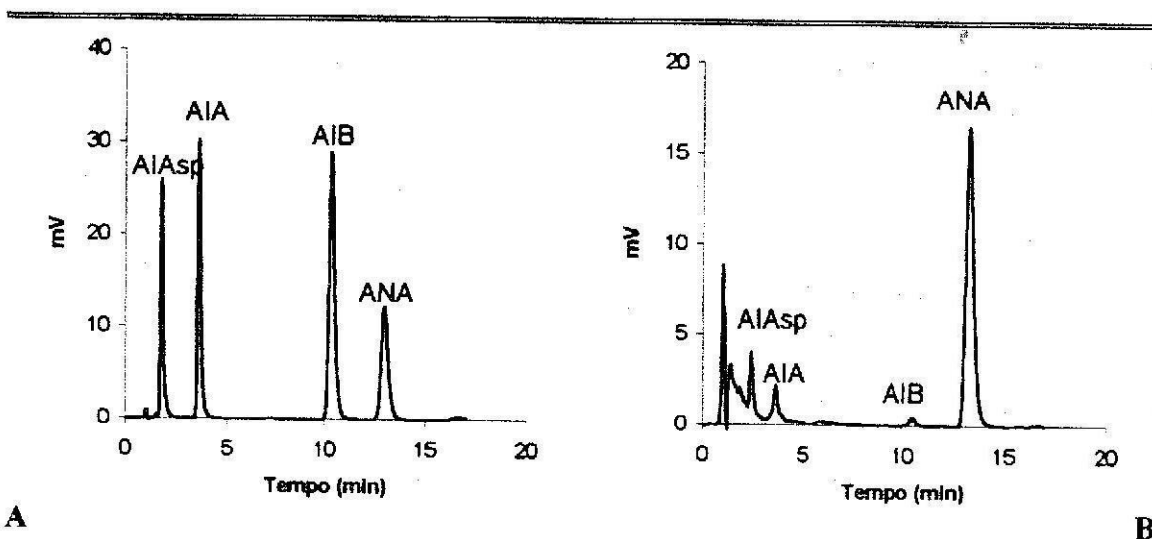


Figura 3.16. Evolução das concentrações de AIB durante os primeiros 8 dias de enraizamento após aplicação dos dois métodos de indução: AIB3 e imersão. Como controlo foram utilizados rebentos sem indução auxínica. (A) Parte basal do rebento. (B) Parte apical do rebento. Cada ponto é a média de 4 valores \pm ep.

Na Figura 3.17, apresentam-se, a título exemplificativo, alguns cromatogramas obtidos no processo de separação e quantificação das concentrações de AIA, AIAsp e AIB.



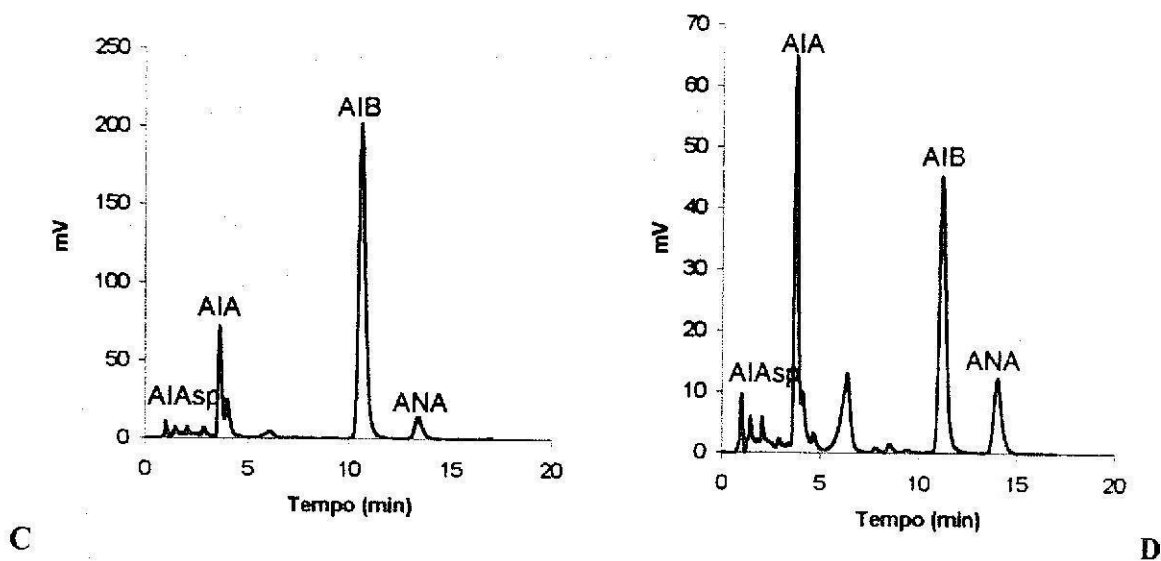


Figura 3.17. Perfis de cromatogramas obtidos na quantificação das concentrações endógenas de AIA, AIB e ANA na metade basal de rebentos do clone M3 durante o enraizamento. (A) Cromatograma de standard. (B) Cromatograma de rebentos controle no dia zero. (C) Cromatograma de rebentos induzidos por imersão no dia um. (D) Cromatograma de rebentos induzidos por AIB3 no dia dois.

4. DISCUSSÃO

4.1. Condições de enraizamento e sobrevivência

A formação do sistema radicular em espécies lenhosas micropropagadas pode ter importantes consequências em termos de qualidade e características fisiológicas das microplantas, durante e após a aclimatização. Quando as plantas regeneradas *in vitro* apresentam um sistema radicular funcional após o transplante, ou se possuírem capacidade de formarem novas raízes *ex vitro*, o crescimento da planta poderá não apresentar limitações. Caso contrário, são notórias as dificuldades de sobrevivência e/ou de desenvolvimento, por mais controladas que sejam as condições de aclimatização. A sobrevivência das microplantas enraizadas obriga, assim, que o sistema radicular formado manifeste capacidades que permitam o crescimento da planta, formação de novas folhas e alongamento do caule durante a aclimatização (Németh, 1986).

A definição de protocolos de enraizamento/aclimatização que viabilizem a utilização comercial das técnicas de micropropagação é um dos importantes objectivos definidos por muitos investigadores (Debergh & Maene, 1981; Debergh & Read, 1991; Sanchez *et al.*, 1997). Os resultados obtidos nos ensaios que agora se apresentam, continuam a mostrar uma percentagem de enraizamento mais elevada para os rebentos com expressão radicular *in vitro*; no entanto, as percentagens obtidas com a expressão *ex vitro*, 87 e 77%, indiciam a rentabilidade desta modalidade. Vários autores referem que as taxas de enraizamento *ex vitro* apresentam uma variabilidade acentuada associada à espécie e aos métodos de enraizamento usados. Por exemplo, Edson *et al.* (1994) obtiveram, em rebentos de *Cornus mitchellii*, 62% de enraizamento com métodos *ex vitro*, tendo sobrevivido apenas 70% das microplantas durante a aclimatização. A transferência de plantas ou microestacas, de um meio estéril e com açúcares, para um meio não estéril e sem uma fonte de carbono reduzido, são as duas principais razões para a baixa sobrevivência associada a sistemas de expressão *ex vitro*. De facto, a formação do sistema radicular em simultâneo com uma fase de pré-aclimatização, deverá representar um stress acrescido, uma vez que se inicia o processo de crescimento autotrófico de uma planta desenvolvida em condições heterotróficas (Donnelly & Vidaver, 1984b; Grout, 1988). Para além desta dificuldade assiste-se também a uma reduzida capacidade de regulação hídrica (Lewandowski, 1991). É, assim, compreensível, que o enraizamento *in vitro* conduza muitas vezes a taxas de enraizamento mais elevadas. Em videira (*Vitis vinifera*), Rebordão (1994) obteve 100% de enraizamento e sobrevivência em plantas cujo sistema radicular que foi induzido e desenvolvido *in vitro*. Em *Vitis rotundifolia*, Gray & Benton (1991) obtiveram 77% de plantas enraizadas *in vitro*, contra 46% quando as plantas foram enraizadas *ex vitro*. Já em cinco cultivares de *Corylus avellana*, Yu & Reed (1995), obtiveram idênticas percentagens de enraizamento (entre 64 e 100%) e idênticas taxas de sobrevivência (entre 78 e 100%) independentemente das metodologias de expressão radicular usadas.

No entanto, a percentagem de enraizamento nem sempre constitui um bom indicador quantitativo do número final de plantas obtidas após todo o processo de micropropagação, incluindo a aclimatização. Os resultados apresentados vêm comprovar plenamente esta afirmação. As vantagens da utilização da metodologia proposta,

expressão e desenvolvimento radicular *ex vitro*, comparativamente com a metodologia de expressão e desenvolvimento radicular *in vitro* são indiscutíveis (Debergh & Read, 1991). Todo o trabalho de manipulação é muito mais reduzido e menos especializado, já que se pode desenvolver em condições não assépticas; é substituída a preparação de meio de cultura pela preparação de substrato com todas as vantagens de custo e tempo; os rebentos, em simultâneo com a expressão e desenvolvimento radicular, iniciam um processo de pré-aclimatização com a conseqüente adaptação a condições autotróficas sem necessidade de equipamento especializado e com conseqüências muito positivas na sobrevivência final das microplantas; torna-se possível fazer a acclimatização final sem necessidade de nova transferência das microplantas, o que permite o seu crescimento até entrarem em repouso vegetativo, podendo então ser transferidas para contentores individuais, para crescimento em estufa na Primavera seguinte.

Lakso *et al.* (1986) obtiveram taxas de sobrevivência de 96% em microestacas de videira (*Vitis* L. híbrido 'Remaily Seedless') cuja indução, emergência e alongamento das raízes foi feita *ex vitro*. Também Welander (1983) obteve uma taxa de sobrevivência de 90% em rebentos de *Malus pumila* Mill. com a indução da rizogénese *in vitro* e desenvolvimento radicular *ex vitro*. Em *Telopea speciosissima*, Offord & Campbell (1992) induziram rizogénese em 70% dos rebentos, tanto em condições *in vitro* como em condições *ex vitro*, mas nenhuma das plantas enraizadas *in vitro* sobreviveu à acclimatização, enquanto 80 a 90% das plantas enraizadas *ex vitro* resistiram a esta fase. Em castanheiro, Miranda & Fernandez (1992) referem uma percentagem de sobrevivência próximo dos 100% quando as microplantas possuíam sistema radicular desenvolvido em condições *ex vitro*. Já nas taxas de enraizamento e número de raízes formadas por rebento enraizado, aqueles autores referem, quando utilizaram a imersão basal do rebento numa solução concentrada de AIB como método de indução, valores mais elevados que os obtidos neste trabalho: cerca de 99% de enraizamento e um número médio de $11,5 \pm 1,4$ raízes por rebento enraizado. Estas diferenças poderão ser conseqüência não só das características genéticas do material vegetal, mas também do tipo de substrato utilizado.

As causas macroscópicas que podemos apontar para a reduzida taxa de sobrevivência das microplantas de castanheiro com sistema radicular *in vitro*, terão a ver com a falta de ramificação destas raízes, não permitindo assim a diferenciação de

estruturas radiculares com capacidade de absorção, bem como a quase total ausência de pêlos radiculares. Muitos investigadores têm igualmente referido estas razões para justificarem a falta de funcionalidade verificada (Yie & Liaw, 1977; Debergh & Maene, 1981; Ziv, 1986; McClelland *et al.*, 1990), embora Apter *et al.* (1993a), em *Trachelospermum asiaticum*, refiram não ter encontrado diferenças aparentes na densidade de pêlos radiculares entre raízes *in vitro* e raízes produzidas por estacaria convencional, mas tão só no comprimento desses pêlos radiculares. No entanto, a organização interna em termos anatômicos pode, também, ser responsável pelas fracas taxas de sobrevivência, já que registámos uma menor organização em termos de tecidos vasculares, nomeadamente xilema, nas raízes desenvolvidas *in vitro*, comparativamente às desenvolvidas *ex vitro* (Fig. 3.4 e 3.5). Grout & Aston (1977a) demonstraram que, em couve-flor, as plantas com as raízes formadas *in vitro* apresentavam conexões vasculares muito incompletas entre raiz e caule que, como consequência, estrangulavam a capacidade de translocação de água da raiz para o caule. Também as anomalias anatômicas têm sido referidas nas raízes *in vitro* de outras espécies (Grout & Aston, 1977a; Yie & Liaw, 1977). Num estudo comparativo entre raízes de *Trachelospermum asiaticum* formadas *in vitro* e raízes produzidas por estacaria convencional, Apter *et al.* (1993b) confirmam a menor capacidade de translocação de ^{32}P por parte das raízes formadas *in vitro*, apesar de não terem registado diferenças significativas entre as taxas de translocação de ^{32}P da raiz para o caule entre os tratamentos. Concluem estes autores que a reduzida capacidade de absorção de ^{32}P pelas raízes formadas *in vitro* não é limitante da sua translocação, bem como da sobrevivência das plantas durante e após a sua aclimatização. Resultados semelhantes foram obtidos por Díaz-Pérez *et al.* (1995) em macieira, quando procuraram verificar a capacidade das raízes formadas *in vitro* absorverem água.

Não está muito esclarecido se as raízes formadas *in vitro* continuam o seu desenvolvimento quando as microplantas são colocadas em condições de aclimatização, ou se são integralmente substituídas por novas raízes (Debergh & Maene, 1981; Torrey, 1986; Gribaudo *et al.*, 1995). Nos nossos ensaios foi possível observar as duas situações: raízes já formadas *in vitro* que continuavam o seu crescimento durante a aclimatização, aspecto de observação relativamente fácil, já que a coloração da raiz se altera, de um branco quase translúcido para um branco opalino, ou raízes não manifestando qualquer

actividade acabando, no final da aclimatização, com um aspecto atrofiado e definhado. A formação *de novo* de raízes foi referida por Donnelly *et al.* (1985) em plantas de *Rubus*, cinco semanas após o transplante para o solo, onde observaram verdadeiras raízes *in vitro*, e raízes com características de transição entre as raízes *in vitro* e as raízes formadas por plantas controlo estabelecidas no solo. Apesar destas referências sobre a maior ou menor funcionalidade das raízes formadas *in vitro*, muitos são os autores que referem elevadas percentagens de enraizamento e elevadas taxas de sobrevivência de microplantas com este tipo de sistema radicular, além de uma maior uniformidade morfológica, o que os leva a defenderem este procedimento em sistemas de produção (Donnelly *et al.*, 1985; Hicks, 1987; Mohammed & Vidaver, 1990; Stimart & Harbage, 1993; Sutter & Luza, 1993).

Os nossos resultados não nos permitem avaliar qual ou quais das causas referidas, serão as principais responsáveis pela morte durante a aclimatização das plantas com sistema radicular *in vitro*, mas o facto de morrerem durante as duas primeiras semanas de aclimatização, período após o qual não se registaram mais mortes, leva-nos a admitir a falta de funcionalidade radicular ao nível da absorção ou ao nível da translocação raiz/caule. A apoiar esta segunda hipótese está o facto de, no castanheiro, as raízes *in vitro* se desenvolverem a partir de zonas com uma formação de *callus* bastante pronunciadas (Fig. 3.2A e 3.3A). Sabendo-se que as conexões vasculares nestas zonas são particularmente fracas e deficientes (McClelland *et al.*, 1990), este facto constitui à partida uma desvantagem durante o transplante e aclimatização, em consequência da limitação no transporte de água (Grout & Aston, 1977a). Comparando com as microplantas de castanheiro com sistemas radiculares formados *ex vitro* (Fig. 3.2B e 3.3B), onde esta estrutura calosa não atinge as proporções dos sistemas *in vitro*, pode prever-se uma melhor organização anatómica nesta região e, como consequência, uma melhor funcionalidade. É ainda de referir as dimensões relativas entre o cilindro vascular e o córtex das raízes *ex vitro*, comparativamente à proporção em raízes *in vitro*. De facto a maior proporção do cilindro vascular para as primeiras indicia uma maior capacidade de transporte de água, bem como uma menor distância a percorrer pela água ao longo do córtex.

A menor capacidade das plantas enraizadas *in vitro*, com razões raiz/caule mais baixas que as plantas enraizadas *ex vitro* (aspecto focado no capítulo IV, ponto 3.1)

reagirem a uma situação de stress, sempre presente na fase de aclimatização, pode indicar um certo desequilíbrio persistente durante períodos mais ou menos longos de crescimento. Estas deficiências podem não ser tão evidentes enquanto as plantas se encontram ainda em condições ambientais favoráveis, mas poderão vir a manifestar-se após o transplante, ou durante o seu crescimento no exterior em condições de déficit hídrico.

As implicações da funcionalidade do sistema radicular no desenvolvimento da parte aérea das microplantas durante a fase de aclimatização, independentemente do seu crucial contributo para a sobrevivência das mesmas durante a aclimatização, como se acabou de discutir, serão analisadas no capítulo IV deste trabalho.

4.2. Aspectos anatômicos da rizogénese

O estudo anatómico do processo de rizogénese em rebentos de castanheiro regenerados *in vitro* mostrou que os constituintes do meio de cultura, em especial o AIB, responsáveis por induzir a formação de raízes, actuam por forma a desencadear o processo de divisão celular, levando à formação de primórdios radiculares em regiões onde tal não era previamente visível. O tipo de tratamento e tempo de aplicação da auxina parecem pouco correlacionados com alterações anatômicas específicas uma vez que não se registaram diferenças assinaláveis entre os dois métodos de indução utilizados. A análise ao longo do tempo da fase de indução indica que são as células derivadas do câmbio vascular as primeiras a responder ao tratamento de indução, permitindo a diferenciação de meristemóides que evoluem rapidamente para primórdios radiculares, visíveis ao fim de 3 a 4 dias de indução. O número e a localização destes primórdios permanece inalterável até ao final do processo de rizogénese.

A análise da fase de pós-indução, designada por expressão e desenvolvimento, traduz-se no crescimento, aumento em número, e diferenciação das células dos meristemóides, por forma a desenvolverem um sistema organizado de tecidos radiculares. Raízes com uma anatomia organizada, com sistemas vasculares contínuos conectados com os do caule, podem ser observadas a partir do dia 8 de indução, isto é, muito próximo da sua emergência para o exterior.

O desencadear do processo de divisão celular pelo tratamento de indução ocorre, como atrás se referiu, nas células indiferenciadas produzidas pelo câmbio e ainda muito próximo deste. Este modo de iniciação de um sistema radicular adventício igualmente observado em outras espécies lenhosas micropropagadas como, camélia (Samartin *et al.*, 1986), macieira (Hicks, 1987; Zhou *et al.*, 1992) e cerejeira (Ranjit *et al.*, 1988), tendo sido também referido por Vieitez & Vieitez (1983) em *Castanea sativa* Miller, não parece, no entanto, ser o único possível.

White & Lovell (1984a) apresentaram um estudo em que referem as diferenças no modo de iniciação de raízes adventícias entre estacas de hipocótilo e estacas de plantas adultas de *Griselinia littoralis*. No primeiro caso, as raízes adventícias originavam-se a partir de células derivadas do câmbio vascular e muito próximo deste; já no segundo caso, o enraizamento adventício tinha início a partir de células das camadas mais externas das células produzidas pela contínua divisão celular das células cambiais. No entanto, quer num caso quer noutro, não deixam de ser as células que primeiro se originam, logo após o início do tratamento de indução, que readquirem actividade meristemática para originar os sistemas radiculares adventícios.

As células de parênquima do floema tem sido outro dos tecidos de origem da actividade meristemática iniciadora da formação de raízes adventícias (Hicks, 1987; Harbage *et al.*, 1993). De facto, Harbage *et al.* (1993) referem que apesar de se registar uma actividade meristemática em vários tecidos logo após a indução, nomeadamente no parênquima cortical e medular e na região cambial, só as divisões das células de parênquima do floema resultam em regiões meristemáticas que levam à formação de primórdios radiculares.

O aparecimento dos meristemóides num local relativamente afastado da zona cambial, onde se haviam observado as primeiras células meristemáticas (Fig. 3.6D), sugere que a actividade cambial não cessa de imediato. White & Lovell (1984b) sugerem que uma das razões para o aparecimento dos meristemóides na periferia das fiadas internas de células derivadas do câmbio se deve ao facto de estas fiadas internas serem empurradas para o exterior pelas novas células do câmbio que permanece em actividade. Como consequência, algumas células de floema e de córtex são destruídas podendo, eventualmente, libertar estimulantes da divisão celular, como por exemplo AIA.

Neste estudo, em termos anatômicos, a primeira alteração visível ocorreu 24 horas após o início do tratamento de indução e nos dias 2 e 3 estas alterações eram já bem patentes ao longo de todo o corte do caule. No entanto, o tempo requerido para a iniciação de um processo de enraizamento adventício varia de acordo com a espécie e mesmo entre clones e a determinação de actividades meristemáticas precoces não está ainda muito esclarecida. Actividade meristemática em resposta a tratamentos de indução foi observada após 8 dias em *Camellia japonica* L. (Samartin *et al.*, 1986), 5 dias no porta enxerto EMLA 9 (Zhou *et al.*, 1992), 4 dias em *Rosa x hybrida* (Bressan *et al.*, 1982), 2 dias em *Prunus avium* L. x *Prunus pseudocerasus* Lindl. 'Colt' (Ranjit *et al.*, 1988), *Castanea sativa* Miller (Vieitez & Vieitez, 1983) e no porta enxerto M26 (Zhou *et al.*, 1992) e apenas 1 dia em *Malus domestica* Borkh. 'Gala' (Harbage *et al.*, 1993).

4.3. Actividade peroxidásica e concentração de AIA, AIAsp e AIB

O comportamento da actividade específica das peroxidases solúveis, presentes nos extractos de rebentos de castanheiro submetidos a dois sistemas de indução de rizogénese, mostrou-se sem grandes diferenças entre si, sendo talvez a mais significativa um certo desfasamento no incremento da actividade peroxidásica entre o dia 2 e 4 de indução (Fig. 3.9). O padrão de variação, apresentado pelos dois métodos até ao dia 3-4 de indução, mostrou ser semelhante ao referido por outros autores noutras espécies, nomeadamente por Gaspar *et al.* (1992, 1994) em videira. De acordo com estes autores, a actividade peroxidásica registou também um mínimo de actividade após 12 horas de indução, ao qual se seguiu um progressivo aumento que culmina no dia 3-4. Este aumento na actividade peroxidásica pode ser explicada pela presença de auxina no meio, uma vez que é sabido que em tecidos verdes a adição de AIA incrementa a actividade peroxidásica, embora este incremento não pareça ser uma verdadeira indução enzimática da AIA-oxidase, mas mais uma consequência do incremento generalizado de novas sínteses (Moore, 1989). Este pico de actividade peroxidásica é seguido de uma queda mais ou menos acentuada nos dias seguintes. Este decréscimo não se registou nos nossos resultados. Contudo, também muitos são os autores que referem a não existência deste

pico de actividade peroxidásica (Gebhart, 1985; Pythoud & Bouchala, 1989; De Klerk *et al.*, 1990). Em *Quercus robur*, uma espécie da mesma família do castanheiro, San-José *et al.* (1992) registaram um incremento constante na actividade peroxidásica durante todo o processo de rizogénese, isto é, também não registaram um pico de actividade peroxidásica ao longo do tempo de registo. A explicação para estes resultados pode residir no facto de a maioria destes autores utilizarem extractos purificados, ou mesmo devido ao facto de não expressarem os resultados por unidade de proteína (Gaspar *et al.*, 1994). A purificação dos extractos traz como consequência a remoção de muitas substâncias de natureza fenólica que, como é sabido, são responsáveis por modelarem o tipo de actividade das peroxidases (Druart *et al.*, 1982; Mato *et al.*, 1988; Berthon *et al.*, 1990; Caboni *et al.*, 1994). No nosso caso, os extractos não foram purificados, no entanto a extracção das peroxidases foi feita na presença de polivinilpolipirrolidina (PVPP), uma substância conhecida pela sua capacidade de inactivar substâncias de natureza fenólica e, como tal, poder ter influenciado os resultados de forma algo semelhante aos extractos purificados. Outra explicação possível poderá estar na já referida assincronia observada nas diferentes fases de enraizamento entre os rebentos. Hicks (1987) ao estudar o enraizamento do porta enxertos de *Malus KSC-3*, refere que a falta de sincronismo pode levar a dificuldades no estabelecimento de modelos fisiológicos que marquem com precisão as primeiras fases do enraizamento.

A expressão da actividade peroxidásica por peso fresco (Fig. 3.11) revelou um padrão de comportamento semelhante ao acabado de descrever, tendo-se registado também um mínimo de actividade às 12 h de tratamento, seguido de um progressivo incremento.

Trabalhos pioneiros na área da correlação entre auxinas e enraizamento sugeriram que o número de raízes capazes de se iniciarem numa estaca poderia ser consequência da quantidade de substâncias de natureza auxínica presentes na região rizogénica (Hemberg, 1954; Bastin, 1966). Desde então, apesar do desenvolvimento e utilização de técnicas sofisticadas para a quantificação endógena de reguladores de crescimento, poucas são ainda as certezas entre os níveis endógenos que são quantificados e aqueles que deverão possibilitar a formação de um sistema rizogénico adventício.

É muito pouca a informação existente acerca das concentrações endógenas de auxinas em tecidos de castanheiro cultivado *in vitro*. Recentemente, o AIA foi identificado como constituinte endógeno de rebentos de castanheiro por GC-MS (A. Ballester, comunicação pessoal) e quantificado em rebentos cultivados *in vitro* no final da fase de multiplicação (Vidal *et al.*, 1994). Também a avaliação da variação dos níveis endógenos em tecidos de rebentos de castanheiro durante o processo de rizogénese não tem, até à data, sido referenciada.

Os níveis mais elevados de AIA, quer na forma livre quer na forma conjugada de AIAsp, foram determinados na metade basal dos rebentos (Fig. 3.14 e 3.15), o que sugere desde logo a possibilidade de conversão de algum do AIB absorvido em AIA durante o período de cultura. A apoiar esta possibilidade de conversão está o facto de nos rebentos controlo (sem qualquer contacto com AIB) os níveis de AIA se manterem ao longo do tempo sem alterações significativas. Assim, podemos referir, que a maior parte do AIA presente nos rebentos de castanheiro cultivados em meio de cultura com AIB, poderá ser resultado da transformação de AIB absorvido. A conversão de AIB aplicado no meio de cultura em AIA foi já demonstrada em oliveira (*Olea europaea*) e videira (*Vitis vinifera*) por Epstein & Lavee (1987) e em macieira (*Malus cv "Jork"*) por Van der Krieken *et al.* (1992). Os valores determinados para o AIA no dia 0 ($1,827 \pm 0,627 \text{ } \eta\text{mol g}^{-1} \text{ ps}$ na metade basal e $1,529 \pm 0,419 \text{ } \eta\text{mol g}^{-1} \text{ ps}$ na metade apical), são idênticos ao referidos por Vidal *et al.* (1994) que quantificou o rebento por inteiro, incluindo caule e folhas. Em relação ao AIAsp o valor quantificado nestes ensaios ($4,167 \pm 2,237 \text{ } \eta\text{mol g}^{-1} \text{ ps}$ na metade basal e $6,547 \pm 1,648 \text{ } \eta\text{mol g}^{-1} \text{ ps}$ na metade apical) é sensivelmente superior ao referido por aqueles autores que, inclusivamente, não detectaram a sua presença em dois dos três clones utilizados.

Através da avaliação das alterações anatómicas que se processam durante o período de rizogénese a que anteriormente fizemos referência, mostrámos que a formação dos meristemóides, que irão originar os futuros primórdios radiculares, ocorre entre os dias 3 e 4 de cultura. Assim, não será de estranhar que alterações hormonais relacionadas com este processo se registem antes e durante este período. Os acréscimos significativos registados nas concentrações de AIA e AIB durante os dois primeiros dias de cultivo poderão ser fortes indicadores das transformações bioquímicas ocorridas ao nível celular,

por forma a que algumas das células derivadas do câmbio possam adquirir competência rizogénica. A diminuição da concentração de AIA, que se regista depois do pico referido no dia 2, reflecte a necessidade de menores níveis de auxinas nas células, permitindo o continuar do processo rizogénico, uma vez que, como sabemos, a presença continuada de AIB no meio de cultura se torna inibidora do desenrolar do processo. Também Heloir *et al.* (1996) referem a existência deste pico transitório do AIA em rebentos de nogueira após tratamento indutor com AIB.

A descida dos níveis de AIA poderá processar-se através da sua transformação em AIAsp bem como resultado da actividade da AIA-oxidase (Gaspar *et al.*, 1994), ao passo que a descida dos níveis de AIB poderão ser consequência do relativo curto espaço de tempo em que os rebentos estão em contacto com ele, 1 minuto para o método por imersão e 5 dias no método AIB3. Um período de exposição mais longo poderá justificar o facto de no método AIB3 os níveis de AIB se terem mantido relativamente estáveis entre os dias 2 e 4 e terem registado um acentuado decréscimo entre os dias 4 e 6, isto é, quando os rebentos deixam, a partir do dia 5, de estar em contacto com aquela substância, já que são transferidos para meio livre de auxina. Também o facto das concentrações de AIAsp continuarem a aumentar até ao dia 6 no caso do método AIB3, contrariamente ao que sucede com o método por imersão, onde, após um subida de níveis até ao dia 2 se registam apenas ligeiras flutuações, poderão confirmar a transformação da forma livre do AIA na sua forma conjugada (Fig. 3.15A).

O AIB é, sem dúvida, o mais efectivo promotor da formação de raízes em castanheiro (Vieitez *et al.*, 1983, 1986). As concentrações desta auxina atingidas pelos dois métodos de indução são idênticos, com a diferença de que para o método por imersão o máximo foi registado 24 h após a sua aplicação e no caso do método AIB3 este pico aparece às 48 h. A explicação para este facto poderá estar na elevada concentração utilizada no método por imersão (1 g l^{-1}) e no reduzido tempo em que a substância esteve em contacto com o rebento (1 min), pelo que é provável que os mecanismos de absorção sejam mais activos nestas condições comparativamente com os mecanismos de absorção dos rebentos que estão no meio agarizado, com uma concentração de AIB disponível 333 vezes menor, mas que, por outro lado, está em contacto com os rebentos durante muito mais tempo (5 dias).

As quantificações agora apresentadas mostram que a presença de AIB no meio de cultura leva à obtenção de níveis elevados de AIA nos rebentos, em especial, na sua parte basal, onde se formam as raízes. É também conhecida a capacidade do AIA em promover rizogénese (James, 1983). Neste caso, pensamos que o efeito promotor do AIB na formação *de novo* de raízes em rebentos de castanheiro cultivados *in vitro* poderá ser explicada através da sua influência nos níveis endógenos do AIA. Label *et al.* (1989), ao quantificarem as concentrações endógenas de AIA no decorrer do período de enraizamento de cerejeira (*Prunus avium* L.), registaram valores crescentes destas concentrações ao longo de todos os 8 dias de cultura, não tendo registado nenhum pico. A explicação para a diferença entre estes e os nossos resultados poderá estar no facto de os rebentos se manterem em permanência num meio de cultura com AIB, não se verificando decréscimo nas suas concentrações. Estes autores admitem também que o AIB exógeno possa ser transformado em AIA, pelo menos na parte basal dos rebentos.

Outro possível contributo para explicar a significativa descida dos níveis de AIB a partir do dia 1 no método por imersão e do dia 4 no método AIB3, consiste em admitir uma rápida capacidade de metabolizar esta auxina por parte das células e tecidos de castanheiro. Esta metabolização poderá passar pela sua transformação ou conjugação com diferentes compostos, tais como o ácido aspártico (Nordström *et al.*, 1991). A capacidade de metabolização e transformação do AIB foi confirmada por Wiesman *et al.* (1989) em estacas de *Vigna radiata* onde, 24 h após a aplicação de AIB, menos de 20% permanecia na forma livre, e os seus níveis decresceram continuamente ao longo do período de enraizamento.

A variação das concentrações de AIA e AIB que registámos entre os dois métodos de indução, com algumas diferenças particulares e que foram anteriormente discutidas, poderão ser uma explicação para o facto de nos ensaios de enraizamento, bem como nas observações histológicas (anteriormente discutidos), o factor método de indução não ter provocado diferenças significativas quer ao nível das percentagens de enraizamento quer nas alterações anatómicas que se registaram durante a rizogénese.

Face à discussão que acabou de ser feita, podemos afirmar que os factores que condicionam a expressão e desenvolvimento dum sistema radicular em rebentos de castanheiro regenerados *in vitro* têm significativas consequências em termos de qualidade e desempenho fisiológico das microplantas durante a aclimatização. As taxas de sobrevivência são indicadoras das diferenças funcionais que se registaram nos sistemas radiculares formados nas microplantas de castanheiro, de 100% para as plantas com raízes *ex vitro* e de apenas 50% para as plantas com raízes *in vitro*. Este facto, para além do impacto directo que tem em termos de rentabilidade de todo o processo, tem por trás de si toda uma série de vantagens que vão desde a diminuição de custos relacionados com mão de obra necessária para a manipulação das plantas, até à possibilidade de alterar o rigoroso controlo das condições físicas de aclimatização que geralmente são exigidas. As causas próximas para explicar esta maior funcionalidade do sistema radicular *ex vitro*, comparativamente com o sistema radicular *in vitro*, e que foram demonstradas nestes ensaios, vão desde aspectos morfológicos do sistema radicular, até aspectos anatómicos. Estas características morfológicas e anatómicas dão às raízes desenvolvidas *ex vitro* uma mais eficaz capacidade de absorção e translocação de solutos para o caule, com consequências directas em toda a actividade metabólica da planta, permitindo-lhe assim, reagir mais favoravelmente a uma situação de stress, sempre presente na fase de aclimatização.

O desencadear do processo de divisão celular pelo tratamento de indução ocorreu nas células indiferenciadas produzidas pelo câmbio vascular e ainda muito próximas deste. Esta alteração anatómica foi registada 24 h após o início do tratamento indutor, apesar deste estado de retorno meristemático se tornasse de todo evidente às 48 horas. O comportamento da actividade peroxidásica durante este período não foi de modo a permitir uma relação directa com esta resposta anatómica. Já o comportamento das concentrações endógenas de AIA, AIA_{sp} e AIB permitiu uma directa correlação destas substâncias no processo. As significativas diferenças entre as concentrações da parte basal e parte apical dos rebentos com os respectivos controlos, é mais do que garantia para se poder afirmar que o processo de rizogénese está directamente relacionado com alterações ao nível destas substâncias. O aumento da concentração endógena de AIA é um forte indicador das transformações bioquímicas que se deverão dar ao nível celular, por forma a

III. *Enraizamento: sobrevivência e morfologia radicular, alterações anatômicas e bioquímicas*

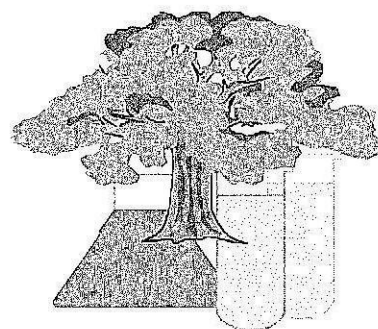
que algumas das células derivadas do câmbio possam adquirir competência meristemática orientada para a formação de futuros meristemóides radiculares. Este dado está de acordo com a observação anatômica que se tem ao dia 2, em que a visualização de células que readquiriram capacidade meristemática é já uma evidência segura. A significativa descida dos níveis de AIA após o dia 2, reflecte a necessidade de menores níveis de AIA nas células por forma a que a sua concentração não se torne inibidora da continuidade deste processo.

A Tabela 3.2 pretende reflectir os resultados mais significativos dos processos de rizogénese estudados e seus efeitos ao nível das percentagens de enraizamento e de sobrevivência na aclimatização.

Tabela 3.2. Características dos sistemas radiculares formados pelos dois métodos de indução e expressão, e seus efeitos na sobrevivência durante a aclimatização.

Indução	Expressão	Morfologia	Anatomia	Enraizamento (%)	Sobrevivência (%)
AIB3	<i>In vitro</i>	+ espessas - ramificação 2ª + <i>callus</i>	córtex desorganizado + espaços intercelulares < razão cilindro vascular / diâmetro total tecidos vasculares 1 ^{os}	93 a 97	50
Imersão	<i>Ex vitro</i>	+ finas + ramificação 2ª - <i>callus</i>	córtex organizado - espaços intercelulares > razão cilindro vascular / diâmetro total tecidos vasculares 2 ^{os}	77 a 87	100

**ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS
DE CASTANHEIRO
REGENERADAS IN VITRO**



1. INTRODUÇÃO

O processo de multiplicação *in vitro* desenvolve-se num micro-ambiente caracterizado por elevada humidade relativa, baixa intensidade de fluxo fotónico, trocas gasosas limitadas e com disponibilidade de açúcar e nutrientes que garantem um crescimento heterotrófico. Como consequência destes factores, o material vegetal que aí se desenvolve apresenta, comparativamente às plantas obtidas por semente, alterações ao nível morfológico, anatómico e fisiológico que condicionam fortemente a sua capacidade de adaptação às futuras condições naturais de crescimento.

Para que o processo de adaptação às condições naturais permita obter uma elevada taxa de sobrevivência das microplantas regeneradas *in vitro*, torna-se necessário um período de transição, conhecido por aclimatização, durante o qual se devem desenvolver adaptações anatómicas e fisiológicas às condições de cultura em autotrofia, sendo este processo muito dependente das espécies (Grout, 1988).

Este processo de aclimatização é tanto mais complexo quanto, na maioria dos casos, as microplantas passam de um sistema totalmente heterotrófico para um sistema autotrófico, isto é, o crescimento e desenvolvimento deixa de utilizar o açúcar metabolizável disponível no meio, passando a sintetizá-lo através do processo de redução de CO₂, característico de autotrofia.

O principal factor que condiciona a sobrevivência das microplantas é o défice hídrico a que ficam sujeitas logo após a sua remoção das condições *in vitro*, em consequência da excessiva transpiração estomática e cuticular em comparação com a capacidade de absorção hídrica do sistema radicular (Preece & Sutter, 1991). A prática mais comum para evitar esta deficiência fisiológica consiste em colocar as plantas numa atmosfera com elevada humidade relativa (HR), seguida de uma progressiva e gradual redução até se equilibrar com a HR ambiente. Este procedimento permite às novas folhas, que entretanto se vão formando e desenvolvendo, passem a apresentar estruturas anatómicas e mecanismos fisiológicos mais próximos dos normais, em simultâneo com o acréscimo de área e funcionalidade do sistema radicular.

A funcionalidade do sistema radicular adventício é, assim, uma condição essencial para a sobrevivência da planta durante a fase de aclimatização, como também para o

crescimento e desenvolvimento da planta no seu local definitivo (Mohammed & Vidaver, 1991; Van Telgen *et al.*, 1992; Díaz-Pérez *et al.*, 1995). Se, como se referiu anteriormente, o balanço hídrico da planta depende em muito da funcionalidade estomática, não é menos verdade que esse balanço pode ser condicionado pela capacidade de absorção do sistema radicular. Esta capacidade de absorção é controlada pela área de exposição radicular, pelas propriedades hidráulicas que se estabelecem entre raiz e substrato, pelo potencial de água do solo, bem como por outros factores, tais como, salinidade, baixas temperaturas e fraco arejamento do substrato (Kramer, 1983). As raízes formadas em condições *in vitro* têm sido consideradas, para algumas espécies, como funcionalmente deficientes, quer pela sua hipertrofia quer pela ausência de pêlos radiculares (Debergh & Maene, 1981; Ziv, 1986; McClelland *et al.*, 1990), bem como por apresentarem deficientes conexões vasculares com o caule, o que resulta numa restrição na capacidade de translocação de água entre a raiz e o caule (Grout & Aston, 1977a). Também a elevada mortalidade destas raízes durante as primeiras horas ou dias de aclimatização foi referida como sendo uma desvantagem destes sistemas radiculares (Debergh & Read, 1991). A somar a tudo isto está o facto de a formação de raízes *in vitro* requerer mais um passo adicional no processo de regeneração da microplanta, o que resulta num acréscimo de custos (Debergh & Read, 1991). Em oposição a estes sistemas radiculares *in vitro* estão os sistemas radiculares adventícios cujos processos de expressão e desenvolvimento ocorrem em condições *ex vitro*, isto é, em condições de autotrofia. Estes sistemas, para além da vantagem de possibilitarem a formação de raízes em contacto directo com um substrato natural, permitem também à microplanta saírem das condições heterotróficas para as condições autotróficas, com as evidentes vantagens que esse facto deverá trazer à planta quando for colocada em condições de aclimatização.

A situação de stress hídrico a que as microplantas ficam sujeitas como resultado da excessiva transpiração estomática e cuticular relativamente à quantidade de água absorvida pelas raízes é resultado, para além do deficiente controlo estomático (Brainerd & Fuchigami, 1982; Donnelly *et al.*, 1985; Sutter *et al.*, 1988; Blanke & Belcher, 1989; Diettrich *et al.*, 1992; Santamaria *et al.*, 1993), da reduzida espessura e estrutura anómala da cutícula (Grout, 1975; Grout & Aston, 1977a; Sutter & Langhans, 1979, 1982; Sutter, 1984, 1985; Capellades *et al.*, 1990; Diettrich *et al.*, 1992; Wardle *et al.*, 1983), de uma

anatomia foliar anormal (Donnelly & Vidaver, 1984a; Donnelly *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1988), de alterações na morfologia e frequência estomática (Brainerd *et al.*, 1981; Wetzstein & Sommer, 1983; Conner & Conner, 1984; Donnelly & Vidaver, 1984a; Dhawan & Bhojwani, 1987; Capellades *et al.*, 1990), resultando ainda do reduzido número de tricomas que as folhas recém formadas geralmente apresentam (Donnelly, 1986; Ritchie *et al.*, 1991).

Do ponto de vista da morfologia dos estomas é frequente observarem-se estomas com maior desenvolvimento das células guarda, apresentando uma disposição sobreelevada, com uma forma arredondada, conferindo-lhe uma maior abertura do ostíolo (Wetzstein & Sommer, 1983; Conner & Conner, 1984; Donnelly & Vidaver, 1984a; Marín & Gella, 1988; Capellades *et al.*, 1990). A sua frequência, avaliada pelo número de estomas por unidade de área foliar, é também alterada, sendo em geral muito mais elevada comparativamente a folhas desenvolvidas em condições naturais, mas o mesmo já não acontece quando se quantifica a frequência estomática através do índice estomático¹ em que normalmente não se regista alteração de valor pelo facto de as folhas desenvolvidas em condições *in vitro* aumentarem também o seu número de células epidérmicas (Brainerd *et al.*, 1981; Conner & Conner, 1984; Dhawan & Bhojwani, 1987; Capellades, 1990). Em relação à fisiologia estomática, as condições *in vitro* levam à sua deficiente regulação, pelo que as microplantas apresentam normalmente estomas completamente abertos e com dificuldade de adaptação a novas condições de humidade (Fuchigami *et al.*, 1981; Marín *et al.*, 1988; Sutter, 1988; Shackel *et al.*, 1990).

Em relação à cutícula, para além das alterações quantitativas no conteúdo em ceras, também as alterações qualitativas se reflectem na sua menor capacidade de controlo da transpiração, sendo referido, nomeadamente, a menor proporção de componentes hidrofóbicos, hidrocarbonetos de cadeia longa, e maior proporção de componentes pouco hidrofóbicos, ésteres e componentes polares (Sutter, 1985; Capellades, 1989). No entanto, alguns autores referem que a dificuldade de controlo na perda de água nas plantas micropropagadas não será tanto consequência do fraco desenvolvimento cuticular, mas

¹ Índice estomático = [número de estomas / (número de estomas + número de células epidérmicas)]

sim do funcionamento estomático (Fuchigami *et al.*, 1981; Conner & Conner, 1984; Shackel *et al.*, 1990; Santamaria *et al.*, 1993; Santamaria & Kerstiens, 1994).

Ao nível anatómico, as folhas formadas *in vitro* têm geralmente mesófilo pouco diferenciado, com uma só camada de células de parênquima em paliçada que se apresentam alteradas quer no tamanho quer na forma, para além de se observarem maiores espaços intercelulares no mesófilo (Grout & Aston, 1978; Brainerd *et al.*, 1981; Wetzstein & Sommer, 1982; Donnelly & Vidaver, 1984a; Lee *et al.*, 1988). A diferenciação celular dos tecidos vasculares é, em geral, limitada (Donnelly *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1986). A área da secção das nervuras assim como a área vascular dos pecíolos apresenta-se reduzida, podendo observar-se conexões vasculares mal estruturadas (Smith *et al.*, 1986). Ao nível ultraestrutural, Wetzstein & Sommer (1982) referem que em *Liquidambar styraciflua* as células foliares apresentavam pouco conteúdo celular e cloroplastos pouco desenvolvidos, comparativamente com folhas de plantas crescendo no campo.

Durante a aclimatização as folhas desenvolvidas *in vitro* acabam, normalmente, por senescer e apenas as folhas formadas durante o processo conseguem resistir às condições de stress, adquirindo progressivamente características próximas das folhas que se desenvolvem em condições de estufa ou de campo (Grout & Aston, 1978; Brainerd & Fuchigami, 1981; Wetzstein & Sommer, 1982; Donnelly *et al.*, 1985).

A intensidade da luz durante a aclimatização é outro factor que pode condicionar o êxito da fase de aclimatização. Sabe-se que a intensidade luminosa tem efeitos significativos na diferenciação foliar e pode influenciar certas características, tais como a espessura da folha, a diferenciação do mesófilo, o desenvolvimento vascular, a divisão celular e a diferenciação estomática (Lichtenthaler, 1981). Como consequência destes efeitos, e por um efeito directo, também a actividade fotossintética é condicionada pela luz (Donnelly & Vidaver, 1984; Lee *et al.*, 1985; Matysiak & Nowak, 1994). Acréscimos na intensidade de luz durante a aclimatização têm sido referenciados como vantajosos para o acelerar do processo de adaptação (Lee *et al.*, 1985; Kozai *et al.*, 1990; Reuther, 1991; Dubé & Vidaver, 1992) desde que não se verifiquem condições de fotoinibição (Dubé & Vidaver, 1992).

Em consequência da transição de um sistema heterotrófico para um sistema autotrófico, as microplantas são forçadas a uma significativa mudança de características

funcionais. Nestas condições o processo fotossintético assume-se como determinante para a capacidade de sobrevivência das microplantas. Em couve-flor, Grout & Aston (1977b) referem um consumo insignificante de CO₂ por parte das plantas em condições *in vitro*. Mesmo após duas semanas das plantas terem sido transferidas para condições *ex vitro*, persistia um balanço negativo no consumo de CO₂. As plantas apresentavam também baixos teores de clorofilas comparativamente com plantas seminais com quatro semanas (Grout & Aston, 1977b). Resultados semelhantes são referidos por Grout & Millam (1985) em morangueiro. Nesta espécie, após o transplante, a maioria das folhas persistentes senescia rapidamente. As que permaneciam não apresentavam acréscimos na fixação de CO₂, o que indicava uma incapacidade no desenvolvimento de competência fotossintética. Lee *et al.* (1985) referem elevadas taxas fotossintéticas em plantas regeneradas *in vitro* de *Liquidambar styraciflua*, comparativamente a taxas de plantas seminais crescendo *ex vitro*, e em condições similares de temperatura e luz. As razões apontadas para estes resultados estão, provavelmente, relacionadas com o facto de as plantas seminais, ao crescerem sob baixas irradiâncias, não terem condições para expressar toda a sua competência fotossintética. Também Rebordão (1994) refere que as folhas de plantas de videira cultivadas *in vitro* têm competência fotossintética, revelando acréscimos de taxa fotossintética a CO₂ saturante em resposta ao aumento de irradiância. Ainda segundo este autor, durante a fase de aclimatização, as folhas persistentes têm, provavelmente, um balanço de carbono positivo, enquanto as folhas formadas *de novo* apresentam, a CO₂ e luz saturantes, taxas fotossintéticas superiores, verificando-se um aumento da densidade de fluxo fotónico a que ocorre saturação para a luz, o que indica uma melhoria de competência fotossintética. No entanto, as diferenças de comportamento fotossintético, expressas por várias espécies regeneradas em condições *in vitro*, podem ser atribuídas a diferenças de natureza genética, bem como às metodologias utilizadas para medição das taxas de fotossíntese (Preece & Sutter, 1991).

As baixas taxas de fotossíntese das plantas *in vitro* têm sido atribuídas à baixa actividade da enzima ribulose bi-fosfato carboxilase oxigenase (Rubisco) (Grout & Price, 1987; Grout, 1988), às baixas intensidades luminosas e ao desajustamento de trocas gasosas no interior dos contentores de multiplicação (Desjardins *et al.*, 1987; Fujiwara *et al.*, 1987; Fujiwara & Kozai, 1995). A baixa actividade da Rubisco estaria relacionada com

a presença da sacarose durante a fase de desenvolvimento foliar já que quando as folhas se formam em ambientes *in vitro* mas na ausência de sacarose, a actividade da enzima é significativamente maior (Lees *et al.*, 1991). Outro factor que condiciona a actividade desta enzima são as concentrações de CO₂ que se registam durante um ciclo diário de cultura *in vitro* com 16 h de luz e 8 h de noite. Em *Ficus lyrata*, Fujiwara *et al.* (1987) verificaram que a concentração de CO₂ decrescia rapidamente, de valores de 3.000 a 9.000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (equivalente a ppm volumétrico) no final do período de escuro para valores inferiores a 90 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ duas horas após o início do período de dia. Este valor permanecia inalterável até ao início de novo período de escuro; cabe aqui referir que 90 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ é um valor aproximado do ponto de compensação para o CO₂ de plantas C₃. Em videira, o aumento na concentração de CO₂ de 350 para 1200 ppm, durante a aclimatização, mantendo um nível de irradiância relativamente baixo (10-100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), resultou num acréscimo da percentagem de sobrevivência e também no aumento em alguns parâmetros de crescimento (Lakso *et al.*, 1986). Resultados semelhantes foram obtidos por Desjardins *et al.* (1987) durante a aclimatização de morangueiro.

O objectivo deste trabalho foi o estudo comparativo de dois sistemas de expressão e desenvolvimento radicular, *in vitro* e *ex vitro*, e sua influência no desenvolvimento das microplantas durante a aclimatização, bem como o estudo da influência de duas intensidades luminosas a que as microplantas foram sujeitas durante a aclimatização. A avaliação destes factores foi feita através do estudo de índices de crescimento, de parâmetros de histologia e anatomia foliar, de parâmetros fisiológicos que foram a variação de perda de água e parâmetros fotossintéticos. Quantificaram-se ainda os níveis de hidratos de carbono solúveis e amido e proteína solúvel total como parâmetros bioquímicos.

2. MATERIAL E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Todos os aspectos relacionados com o material vegetal, condições de cultura e delineamento dos ensaios da fase de aclimação das plantas de castanheiro regeneradas *in vitro*, estão descritas no ponto 4 do capítulo II. Para uma mais fácil e rápida visualização apresenta-se na Figura 4.1 um esquema ilustrativo dos ensaios realizados e respectivos momentos de avaliação.

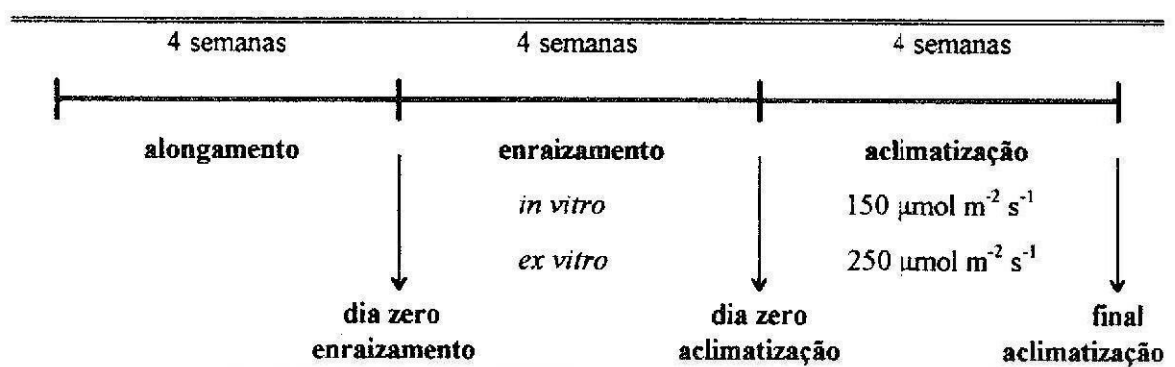


Figura 4.1. Esquema dos ensaios de enraizamento e aclimação e respectivos momentos de avaliação.

2.1. Parâmetros de crescimento

Os parâmetros de crescimento foram determinados por planta. Para cada um dos tratamentos de enraizamento, *in vitro* e *ex vitro*, as plantas foram avaliadas após 4 semanas, sendo este momento considerado como dia zero de aclimação; a segunda avaliação teve lugar 4 semanas após o dia zero, isto é, no final da fase de aclimação a que foram sujeitas as plantas provenientes do enraizamento *in vitro* e *ex vitro* e submetidas a dois níveis de irradiância, 150 e $250 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.1). Os parâmetros registados foram: comprimento do caule, área da folha, peso seco da folha, peso seco do caule e peso seco da raiz. Nas plantas aclimatizadas a área foliar e o peso seco das folhas foram determinados separadamente em folhas persistentes (*fP*), folha um (*f1*), folha dois (*f2*), folha três (*f3*) e restantes.

A área foliar foi obtida por amostragem destrutiva, medida com um planímetro electrónico portátil (LI-3000A, LI-COR, Inc., Lincoln, Nebraska, USA). A quantidade de biomassa acumulada durante o enraizamento e a aclimatização foi obtida por amostragem destrutiva das plantas e posterior determinação do peso seco das diferentes partes da planta. A secagem do material vegetal foi feito em estufa com ventilação forçada de ar a 80 °C, durante um mínimo de 48 horas, até à obtenção de peso constante. Após o arrefecimento do material vegetal, num excicador com sílica gel, a pesagem foi feita em balança analítica digital com quatro casas decimais (AE260, Metler Instruments AG, Switzerland).

Os parâmetros e índices de crescimento¹ calculados foram:

- ◆ crescimento relativo em altura (RG), dado pela expressão: $(a_f - a_i) / a_i$

[a_f = altura final; a_i = altura inicial]

- ◆ peso seco total (mg)
- ◆ peso seco foliar (mg)
- ◆ peso seco radicular (mg)
- ◆ razão parte aérea / parte radicular
- ◆ razão de peso foliar (LWR) dada por:

$$\text{LWR} = \text{peso seco foliar} / \text{peso seco total}$$

- ◆ área foliar (cm^2)
- ◆ área foliar específica (SLA) dada por:

$$\text{SLA} (\text{cm}^2 \text{g}^{-1}) = \text{área foliar} / \text{peso seco foliar}$$

¹ Os parâmetros, índices e taxas de crescimento são frequentemente referidos pelas respectivas iniciais, ou apenas por uma letra maiúscula para a quantidade derivada. Em ambos os casos optámos pela designação por extenso em português, mas no que respeita às iniciais optou-se pelas iniciais anglo-saxónicas face à vulgarização na prática destas designações.

♦ taxa de crescimento relativo (RGR) dada pela expressão:

$$\text{RGR (g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}) = \frac{1}{\bar{ps}_0} \frac{\bar{ps}_f - \bar{ps}_0}{t}$$

[\bar{ps}_0 = peso seco médio das plantas no dia 0; \bar{ps}_f = peso seco médio das plantas após o tratamento; t = número de dias do tratamento]

♦ razão de área foliar (LAR) dada por:

$$\text{LAR (m}^{-2} \text{ g}^{-1}) = \text{SLA} \times \text{LWR}$$

♦ taxa líquida de assimilação (NAR) dada por:

$$\text{NAR (g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}) = \frac{1}{\bar{A}_{f0}} \frac{\bar{ps}_f - \bar{ps}_0}{t}$$

[\bar{A}_{f0} = área foliar média das plantas no dia 0; \bar{ps}_f = peso seco médio das plantas após o tratamento; t = número de dias do tratamento]

Cada determinação foi feita a partir plantas distintas e casualizadas tendo sido utilizadas 30 amostras ($n=30$) e as experiências foram repetidas duas vezes para cada tratamento.

2.2. Histologia e anatomia foliar

Os estudos para a caracterização histológica e anatômica das folhas durante o processo de aclimatização foram feitos nas folhas do dia zero de aclimatização (*fD0*) para os dois tratamentos de enraizamento, *in vitro* e *ex vitro*, e nas folhas persistentes (*fP*), folha dois (*f2*) e folha três (*f3*) após os dois tratamentos de aclimatização (Fig. 4.1).

Para os estudos de anatomia e histologia foliar, feitos a partir de cortes transversais, a preparação do material vegetal foi feita de acordo com as seguintes fases:

- i) Obtenção do material vegetal. Fragmentos de $\pm 3 \times 5$ mm foram cortados do limbo das folhas, com e sem nervura central.
- ii) Fixação. Logo após o corte, o material vegetal foi fixado em FAA (formaldeído a 35%:ácido acético glacial:etanol absoluto:água, 2:1:10:7, v:v:v:v) durante pelo menos 24 horas.
- iii) Desidratação. Após a fixação, o material vegetal foi lavado por duas vezes com etanol a 50% durante duas horas, após o que as amostras foram desidratadas numa série crescente de etanol (60, 70, 80, 90 e 99%), permanecendo 1 hora no mínimo em cada uma das soluções e 24 horas na concentração de 99%.
- iv) Infiltração. Feita com hidroxietilmetacrilato (LKB Historesin®, Leica Comercial, Kit 70-2218-500) no vácuo; o material esteve previamente na solução de infiltração diluída a 50% durante 2 horas, passando depois para a solução de infiltração pura durante 3 horas.
- v) Inclusão. Foi feita em hidroxietilmetacrilato (LKB Historesin®, Leica Comercial, Kit 70-2218-500) ao qual se adicionou um agente polimerizante (dimetilsufóxido). A polimerização foi feita em pequenos alvéolos dos moldes de teflon durante 2 horas à temperatura ambiente; durante o período inicial de polimerização foi necessário proceder a orientação do material vegetal.
- vi) Montagem. Foi feita com os respectivos suportes plásticos dos moldes de teflon utilizado.
- vii) Cortes. Os cortes do material foram feitos num micrómetro rotativo (American Optical Company, modelo 820), com espessuras de 5 a 7 μm .
- viii) Coloração. Após a montagem dos cortes sobre lâmina de vidro e secagem, a coloração foi feita com uma solução aquosa de azul de toluidina a 0,05% (p/v) durante cerca de 5 min ou por safranina fast-green (Jensen, 1962). Após lavagem em água corrente e secagem, foi colocada a lamela e fixa com Entellan®.

As observações foram feitas num microscópio Leitz, Laborlux K, com sistema de fotografia Wild MPS 45; as medições foram feitas em microscópio Leitz Wetzlar, associado a uma câmara B&D Electronic, com imagem em écran e acoplada a uma mesa de medição computadorizada Leitz, ASM 68K.

Para cada folha foram quantificados os seguintes parâmetros:

- ◆ diâmetro da nervura central (medido perpendicularmente ao mesófilo);
- ◆ espessura total da folha;
- ◆ espessura da epiderme da página superior e inferior;
- ◆ espessura do parênquima em paliçada;
- ◆ espessura do parênquima lacunoso;
- ◆ número de células por 100 μm de comprimento do corte transversal.

As observações e contagens de estomas foram feitas na página inferior das folhas das plantas enraizadas *ex vitro* e submetidas aos dois níveis de irradiância. As folhas foram pinceladas com verniz incolor para obtenção de uma película fina que, após secagem, foi destacada e montada entre lâmina e lamela para observação ao microscópio óptico.

Para as observações dos estomas sob microscópio electrónico de varrimento, as folhas foram fixadas e desidratadas como anteriormente descrito, secas ao ar entre papel de filtro durante 24 h e mantidas na estufa a 25 °C. O material foi depois montado em suportes próprios do microscópio e coberto com ouro num metalizador Polaron (Bio-Rad SEM Coating System E5100). As observações foram efectuadas num microscópio JEOL modelo JSM 840 a 20 kV e as imagens registadas em película fotográfica Polaroid HP125 Plus.

As observações de histologia e anatomia foliares foram feitas nas plantas com enraizamento *in vitro* e *ex vitro* e sob os dois níveis de irradiância a que se submeteram as plantas durante a aclimatização, 150 e $250 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.1). Foram também feitas observações em folhas de plantas micropropagadas a crescer em vaso sob condições de campo (*fC*).

Cada observação foi feita a partir de folhas de plantas distintas e casualizadas tendo sido utilizadas 6 amostras ($n=6$) para os parâmetros quantitativos dos aspectos anatómicos, sendo cada uma delas a média de 3 registos por cada preparação.

2.3. Variação do conteúdo relativo em água

A variação do conteúdo relativo em água (RWC) foi quantificada em folhas persistentes (*fP*), folha dois (*f2*) e folha três (*f3*), no final do período de aclimatização das microplantas com enraizamento *ex vitro* e submetidas aos dois níveis de irradiância (Fig. 4.1). Foi também determinada a variação do conteúdo relativo em água em folhas de plantas micropropagadas com um ano a crescer em vaso sob condições campo (*fC*).

As determinações foram feitas por folha inteira e em discos foliares de Ø7 mm. As folhas destacadas, ou os discos, foram imediatamente imersos em água destilada, com a página abaxial virada para baixo, mantidos a temperatura ambiente (22 ± 1 °C), sob luz difusa durante 3 horas, para assim atingirem o estado máximo de turgescência. Findo este período, foram retirados destas condições; a água superficial foi absorvida com papel, tendo sido colocados em papel de alumínio com a página abaxial virada para cima e determinado o peso fresco inicial (*Pfi*). O ensaio durou 3 horas, sendo o registo de pesos feito de 10 em 10 minutos durante a primeira hora e de 20 em 20 minutos durante a segunda e terceira horas (*Pft*). Durante o ensaio, as folhas ou discos foram mantidas sob condições ambientais de interior, temperatura 22 ± 1 °C, luz difusa e humidade relativa ambiente de $60 \pm 2\%$. A secagem do material vegetal, para a determinação do peso seco (*Ps*) foi feito em estufa com ventilação forçada de ar a 80 °C, durante um mínimo de 48 h, até à obtenção de peso constante. Após o arrefecimento do material vegetal, num excicator com sílica gel, a pesagem foi feita em balança analítica digital com quatro casas decimais (AE260, Metler Instruments AG, Switzerland). Para cada tempo (*t*) calculou-se o respectivo conteúdo relativo em água (RWC) dado por:

$$RWC(\%) = \frac{Pft - Ps}{Pfi - Ps} \times 100$$

[*Pft*: peso fresco no tempo *t*; *Pfi*: peso fresco inicial; *Ps*: peso seco final]

A partir destes valores representou-se a variação da perda de água ao longo do tempo. Para as folhas persistentes foram utilizadas todas as folhas que a planta possuía no final da aclimatização por forma a obter uma área mais comparável com as folhas dois e

três e assim reduzir o erro. No caso das determinações feitas com os discos foliares, foram utilizados 10 discos com \varnothing 7 mm de cada tipo de folha analisado. Foram utilizadas 4 amostras por cada tipo de folha ($n=4$) e a experiência foi repetida 2 vezes.

2.4. Quantificação de clorofilas

A primeira quantificação das concentrações de clorofilas foi feita nas folhas de plantas no final da fase de enraizamento a que correspondeu o dia zero de aclimatização (*fD0*) (Fig. 4.1). A segunda avaliação teve lugar 4 semanas após o dia zero, isto é, no final da fase de aclimatização a que foram sujeitas as plantas provenientes do enraizamento *in vitro* e *ex vitro* e submetidas a dois níveis de irradiância, 150 e $250 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.1). Foram quantificadas as concentrações de clorofilas nas folhas persistentes (*fP*), folha um (*f1*), folha dois (*f2*) e folha três (*f3*). Foram também determinadas as concentrações de clorofilas em folhas de plantas micropropagadas a crescer em vaso sob condições de campo (*fC*).

A extração foi feita em acetona a 80% de acordo com o método de Arnon (1949) a partir do material vegetal fresco. As absorvências dos extractos foram lidas no espectrofotómetro (Shimadzu, UV-2100) para os comprimentos de onda de máxima absorvência das Cl_a e Cl_b em acetona a 80% (663 e 645 nm respectivamente) e aplicaram-se as seguintes fórmulas de cálculo (Mackinney, 1941):

$$Cl_a \text{ (g m}^{-2}\text{)} = [(0.0127 \times Abs_{663} - 0.00269 \times Abs_{645}) \times V \times 10] / S$$

$$Cl_b \text{ (g m}^{-2}\text{)} = [(0.0229 \times Abs_{645} - 0.00468 \times Abs_{663}) \times V \times 10] / S$$

$$Cl_{total} \text{ (g m}^{-2}\text{)} = [(0.0202 \times Abs_{645} + 0.00802 \times Abs_{663}) \times V \times 10] / S$$

[Abs_{645} e Abs_{663} : absorvência a 645 e 663 nm, respectivamente; V : volume final do extracto (ml); S : área dos discos foliares (cm^2)]

Cada determinação foi feita a partir do extracto de dois discos de tecido foliar com \varnothing 7 mm ($0,77 \text{ cm}^2$ de área), recolhidos em plantas distintas e casualizadas tendo sido

usadas 8 amostras ($n=8$) para cada tipo de folha; as experiências foram repetidas duas vezes para cada tratamento.

Os resultados foram expressos em mg de clorofila por unidade de peso seco foliar ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$). Nestas determinações foi utilizado um valor médio de peso seco por disco para cada um dos tipos de folhas referenciadas. Esse valor foi determinado como a média de 20 amostras ($n=20$), repetido por 3 vezes.

2.5. Fotossíntese

2.5.1. Taxa de fotossíntese aparente

A taxa de fotossíntese aparente (A), a taxa de transpiração (E) e a condutância estomática (G)² foram medidas nas folhas persistentes (fP), folha um ($f1$), folha dois ($f2$) e folha três ($f3$) de plantas com enraizamento *ex vitro* e submetidas aos dois níveis de irradiância, 150 e $250 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e nas folhas dois ($f2$) e folhas três ($f3$) de plantas com enraizamento *in vitro*, igualmente submetidas aos dois níveis de irradiância durante a aclimatização (Fig. 4.1). Estes parâmetros foram também quantificados em folhas de campo (fC). Para as plantas aclimatizadas, as medições foram realizadas nos estufins de aclimatização sensivelmente a meio do período de luz, em condições de luz e temperatura idênticas às que se registaram durante toda a fase de aclimatização para cada um dos tratamentos. A humidade relativa era de $40 \pm 5\%$ e a concentração de CO_2 atmosférico de 350 ± 5 ppm. Nas plantas de campo, as condições ambientais no momento de registo, feito entre as 10 e as 12 h solares, eram de $1800 \pm 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente activa (PAR), 340 ± 5 ppm de CO_2 , HR do ar de $30 \pm 5\%$, temperatura de 25°C e com o substrato bem humedecido.

O equipamento utilizado foi um porómetro portátil com sistema de aquisição de dados integrado (CO_2 Gas Analyzer, Model CI-301 - CID, Inc., USA), acoplado a uma

² A , E e G são símbolos usados internacionalmente para a taxa de fotossíntese líquida ou aparente, taxa de transpiração e condutância estomática, respectivamente.

cuvete circular com 2,5 cm² de área, a funcionar em sistema aberto. A taxa de fluxo de ar foi de 0,5 litros min⁻¹ e os registos feitos em modo manual. A taxa de fotossíntese líquida, ou aparente, é determinada através da taxa de CO₂ fixado por unidade de área foliar e por unidade de tempo (μmol m⁻² s⁻¹)³, a taxa de transpiração é dada pelo fluxo de vapor de água por unidade de área foliar e por unidade de tempo (mmol m⁻² s⁻¹)⁴ e a condutância estomática é dada pelo inverso da resistência estomática, que é calculada pela fórmula:

$$R_{folha} = \frac{\frac{e_f - e_o}{e_o - e_i} \times \frac{P - e_o}{P}}{W} - R_b$$

[*e_f*: pressão de vapor de água saturada à temperatura da folha nos espaços intercelulares e *R_b* é a resistência da camada limite.]

conhecendo a transpiração e temperatura da superfície da folha e expressa em mmol m⁻² s⁻¹.

Por cada folha efectuaram-se 5 leituras consecutivas, sendo o valor considerado a média dessas cinco leituras. Para a folha dois (f2) e folha três (f3) foram utilizadas 15 plantas (n=15), para as folhas persistentes (fP) e folhas de plantas de campo (fC) foram utilizadas 10 plantas (n=10) e a experiência foi repetida 2 vezes.

2.5.2. Curvas de resposta à luz, capacidade fotossintética, rendimento quântico e ponto de compensação para a luz

A taxa fotossintética máxima (*A_{max}*) e o rendimento quântico máximo aparente (*φ*) foram medidos pela taxa de libertação de O₂ em condições de CO₂ saturante. A

³ $A = W \times (C_o - C_i)$ onde *W*: fluxo molar por unidade de área (mol m⁻² s⁻¹) calculado em função da temperatura do ar, da pressão atmosférica, do volume de fluxo e da área da folha; *C_o* e *C_i*: concentrações de CO₂ na saída e entrada da cuvete.

⁴ $E = \frac{e_o - e_i}{P - e_o} \times W \times 10^3$ onde *e_o* e *e_i*: pressões de vapor de água à saída e entrada da cuvete; *P*: pressão atmosférica.

densidade do fluxo fotónico fotossinteticamente activo (PPFD) foi saturante para o caso da determinação de A_{max} ($1120 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e variou dentro de um intervalo de baixas PPFD's (8 a $70 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para o cálculo de ϕ . Para a sua determinação utilizou-se um sistema constituído por um eléctrodo de oxigénio na fase gasosa (Hansatech Ins. Ltd, Modelo LD2, Norfolk, UK) e uma caixa de controlo do eléctrodo (Hansatech Ins. Ltd, Modelo CB1-D, Norfolk, UK). A luz foi emitida por uma lâmpada Björkman (Hansatech Ins. Ltd, LS2), com sistema de filtros neutros que, por associação entre si, permitem fornecer a PPFD pretendida. A unidade principal do sistema é construída em alumínio anodizado, a fim de criar a inércia térmica suficiente para evitar as pequenas oscilações de temperatura às quais o eléctrodo de oxigénio é muito sensível, e é constituída por três secções. As secções superior e inferior são ocas e no seu interior circula água à temperatura definida (no caso presente de 25°C), proveniente de um banho-maria termostaticado (Julabo Labortechnik, Modelo F10-UC). No topo da secção superior existe uma janela acrílica transparente, onde se ajusta a lâmpada, que possibilita a iluminação do material vegetal. A secção central é ocupada pela câmara de reacção em que se coloca o material vegetal, discos foliares, e que está equipada com adaptadores para as torneiras de entrada e saída da mistura gasosa. O sensor de O_2 é um eléctrodo do tipo Clark (Clark, 1956) integrado num disco de resina (disco do eléctrodo) por forma a que o cátodo de platina ocupe a abóbada saliente central e o ânodo de prata o fundo do sulco circular que o rodeia. Sobre a abóbada e no sulco deitam-se algumas gotas de uma solução aquosa saturada de cloreto de potássio (electrólito), cobre-se com um película de papel, tipo mortalha de cigarro, por forma a assegurar a formação de uma camada uniforme de electrólito entre o cátodo e o ânodo e, finalmente, cobre-se com uma película fina de teflon. O disco do eléctrodo é montado entre as secções central e inferior, de modo que a abóbada saliente, ao encaixar na parede inferior da câmara de reacção, ponha o cátodo em contacto com a atmosfera interna através de um orifício que as atravessa.

Por intermédio da caixa de controlo, é possível induzir diferenças de potencial entre os dois eléctrodos, provocando polarização, isto é, o cátodo torna-se negativo e o ânodo positivo. O oxigénio molecular libertado durante o processo fotossintético, e que se difunde através da membrana de teflon, é então reduzido nas proximidades do cátodo, dando origem a um fluxo de electrões que atravessa o circuito pela ponte do electrólito; a

prata é oxidada e o cloreto de prata deposita-se no ânodo. A intensidade de corrente gerada é, assim, proporcional à quantidade de oxigénio reduzida, sendo então convertida num sinal de voltagem pela caixa de controlo, que por sua vez é transmitida a um registador de papel (Walker, 1990).

A câmara de reacção é preenchida por discos de metal, feltro e espuma, dispostos uns sobre os outros, permitindo o suporte dos discos foliares. Estes são colocados com a página adaxial para cima sobre o último disco de feltro, devendo ficar dispostos em círculo e equidistantes. O sistema é então fechado com a secção superior que assim comprime os discos contra a janela transparente, através da qual irão receber a irradiância definida e são mantidos à temperatura da água que circula no sistema.

Após ajustamento do sinal, escolhendo o factor de amplificação apropriado na caixa de controlo, procede-se então à calibração do eléctrodo. A finalidade é a de estabelecer a equivalência entre o sinal eléctrico lido no registador e o número de μmoles de O_2 geradas pela injeção de 1 ml de ar, feita através de uma seringa adaptável numa das entradas. Nas condições padrão de temperatura e pressão ($25\text{ }^\circ\text{C}$, 1 atm), 1 ml de ar atmosférico⁵ contém cerca de 210 μl de oxigénio. Considerando que uma mole de gás ocupa 22,414 litros, verifica-se que este volume de oxigénio contém 9,37 μmol de O_2 . No entanto, nos ensaios efectuados a mistura gasosa continha 5% de CO_2 , pelo que esse valor é de 8,15 μmol de O_2 .

Retirado o mililitro de ar injectado, após a estabilização do sinal, fecham-se as torneiras de saída e entrada, acende-se a lâmpada de iluminação e acompanha-se a taxa de libertação do oxigénio durante, em média, 10 a 15 minutos para cada densidade de fluxo fotónico fotossinteticamente activo (PPFD).

As taxas foram determinadas no mesmo tipo de folhas das utilizadas para a determinação da taxa de fotossíntese aparente, à temperatura constante de $25\text{ }^\circ\text{C}$. A concentração de CO_2 foi de aproximadamente 5%, fornecido pela libertação de CO_2 a partir de uma solução tampão saturada de NaHCO_3 .

Para a determinação das curvas de resposta à luz, a CO_2 saturante, após um período inicial de escuro, a densidade de fluxo fotónico (PPFD) variou progressivamente

⁵ com 21% de O_2 e 0,035% de CO_2

para 8, 18, 28, 70, 140, 370, 700 e 1120 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante o qual as taxas de libertação de O_2 por área foliar e por unidade de tempo ($\mu\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram calculadas pela seguinte expressão:

$$A = k \frac{(I_f - I_i)}{(I_c - I_i)} \times \frac{1}{\Delta t} \times \frac{1}{s} \qquad k = 15,62 \times (100 - \text{CO}_2) \times \frac{273}{273 + T}$$

[I_f e I_i são as leituras finais e iniciais dos valores da unidade LD2, de medida (m) ou de calibração (c) respectivamente; Δt é o intervalo de tempo entre I_m e I_f (min); s é a área foliar usada (cm²); CO₂ é a concentração de CO₂ na câmara (%) e T é a temperatura do ar na câmara (°C). A constante 15.62 é o factor de conversão de unidades em que é expressa A]

Em geral as curvas de resposta da fotossíntese aparente (A) à densidade de fluxo fotónico fotossinteticamente activo (PPFD) podem ser descritas por funções hiperbólicas, a partir das quais se podem estimar as taxa de respiração às escuras (R), as taxas de fotossíntese a luz saturante (A_{max}) e o rendimento quântico aparente (ϕ), com a transição da fase de PPFD limitante para a fase saturante, ajustada pela estimativa da convexidade da curva de resposta (θ) (Prioul & Charter, 1977; Olsson & Leverenz, 1994). O valor de θ varia entre 0 (hipérbole quadrada) e 1 (hipérbole não quadrada ou curva de Blackman) em função dos teores de clorofila (Leverenz, 1987, 1988), da aclimação ao regime luminoso, e à concentração de CO_2 (Olsson & Leverenz, 1994). Assim, a A_{max} pode ser modelada pela equação:

$$A_{\text{max}} = \frac{\phi I + A_{\text{max}} - \sqrt{(\phi I + A_{\text{max}})^2 - 4 A_{\text{max}} \phi I \theta}}{2\theta} - R \quad (\mu\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1})$$

*[ϕ : rendimento quântico da fotossíntese; A_{max} : taxa máxima de fotossíntese;
 θ : convexidade da curva de resposta; R: taxa de respiração no escuro; I: valor da PPFD]*

A utilização deste modelo matemático permite fazer o melhor ajustamento da curva de resposta à PPFD e, em simultâneo, calcular os parâmetros da equação através de um sistema de regressão não linear⁶.

O rendimento quântico aparente máximo da fotossíntese (ϕ), que traduz os gastos na conversão de energia luminosa em energia química na fotossíntese, e que foi quantificado como sendo o número de moles de O₂ libertado por mole de quanta de radiação fotossinteticamente activa absorvida (λ entre 400-700 nm), foi calculado como o valor do declive inicial da curva de resposta da fotossíntese à luz, dado pela equação da recta de regressão linear no intervalo de 0 a 70 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PPFD.

O ponto de compensação para a luz (I_0) para cada tipo de folhas foi calculado a partir do ajustamento da recta de regressão linear para a determinação do rendimento quântico e corresponde ao valor da intersecção da recta com o eixo dos xx's.

Para cada determinação foram utilizados 7 discos foliares de \varnothing 7 mm (2,695 cm² de área) destacados da mesma folha a partir de plantas casualizadas, excepto das folhas persistentes que, devido à sua reduzida área se tornou necessário utilizar duas a três folhas da mesma planta. Para cada tipo de folha foram feitas três determinações ($n=3$) e a experiência foi repetida duas vezes.

2.6. *Parâmetros bioquímicos*

A determinação dos parâmetros bioquímicos, hidratos de carbono solúveis, amido e proteína solúvel total foi feita no mesmo tipo de folhas e plantas anteriormente referidas para as clorofilas, seguindo as mesmas condições de delineamento (ponto 2.4).

⁶ [Parâmetros]

Amax=20 (taxa de fotossíntese para PPFD infinita)

Q=0.09 (rendimento quântico aparente)

R=0.9 (taxa de respiração no escuro)

C=0.9 (convexidade da curva de resposta)

[Variáveis]

x=col (1)

y=col ()

f=((Q*x+Amax-SQRT(Q*x+Amax)**2-4*Amax*Q*C*x))/(2*C) - R

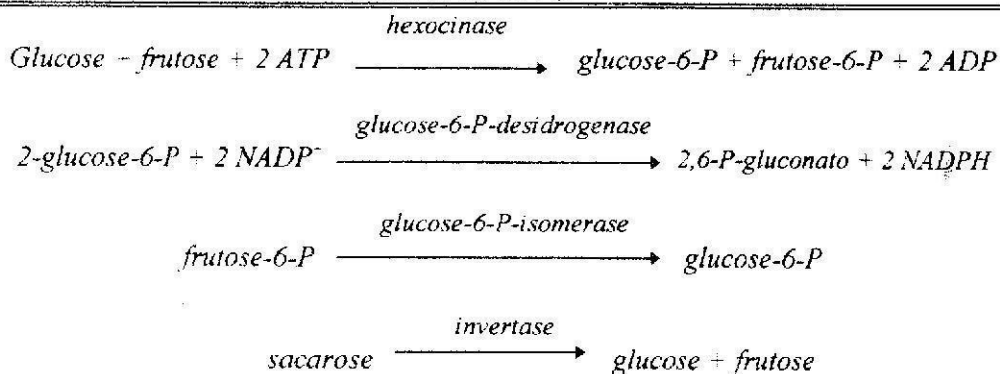
Ajuste x a y

2.6.1. Hidratos de carbono solúveis e amido

A quantificação dos teores de glucose, frutose, sacarose e amido foi feita pelo método enzimático descrito por Jones *et al.* (1977). As amostras dos discos foliares foram colhidas a meio do período de luz e de imediato congeladas em azoto líquido e conservados a -80 °C até ao momento da extracção.

A extracção da fracção solúvel dos hidratos de carbono (glucose, frutose e sacarose) foi efectuada em 5 ml de etanol 80% em banho-maria a 80 °C, durante 20 min e sob agitação. A quantificação baseia-se na fosforilação da glucose e hexoses livres na presença de ATP, hexocinase e NADP⁺. A posterior adição de 6P-GDH leva à redução do NADP⁺ ocorrendo uma variação de absorvência a 340 nm, que corresponde à formação de NADPH; esta variação de absorvência entre o início e o final da reacção permite quantificar a glucose presente. A adição sequencial de 6P-GI leva à isomerização da frutose em glucose efectuando-se uma redução adicional do NADP⁺ ainda presente, permitindo assim a quantificação da frutose. A concentração de sacarose foi determinada após acção da invertase, que hidrolisa a sacarose em glucose e frutose conduzindo à redução de duas moléculas de NADP⁺ (Tab. 4.1).

Tabela 4.1. Sequência de reacções enzimáticas em que se baseia o método de quantificação de açúcares não estruturais solúveis (Jones et al., 1977).



A sequência de reacções descrita decorreu em meio tamponizado com imidazol (Sigma Chemical Co.) 100 mM pH 6,9 na presença de ATP e NADP (Boehringer Corporation) numa concentração final de 0,033 M e 0,015 M, respectivamente. Todas as

enzimas usadas, excepto a invertase, foram da Boehringer Corporation, tendo as soluções enzimáticas sido preparadas em tampão imidazol nas seguintes concentrações: hexocinase (EC 2.7.1.1, 140 u/mg) 1:1 (v.v); glucose 6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49, 500 u/mg) 1:1 (v.v); glucose 6-fosfato isomerase (EC 5.3.1.9, 350 u/mg) 1:3 (v.v); invertase (EC 3.2.1.26 da Sigma, 852 u/mg) 4 mg para 50 µl de tampão.

A mistura de reacção, contida em cuvete acrílica descartável, continha 825 µl de tampão, 30 µl de ATP e 30 µl de NADP, à qual foi adicionada 30 µl de extracto etanólico de cada uma das amostras e 1,05 u de hexocinase, após o que se esperou 5 minutos a fim de permitir a fosforilação da glucose e da frutose na presença de ATP e da hexocinase. Seguiu-se a adição de 1,875 u de glucose-6-fosfato desidrogenase para quantificar a glucose. A adição sequencial de 1,312 u de glucose-6-fosfato isomerase permite quantificar a frutose livre por redução adicional do NADP. Finalmente adicionou-se a invertase (1,278 u) para quantificação da sacarose presente.

Para a quantificação do amido, hidrato de carbono insolúvel, foi executada a mesma sequência de reacções enzimáticas atrás descritas para a quantificação da glucose, sendo previamente necessário proceder à sua hidrólise. Para isso, os discos utilizados para a extracção dos açúcares solúveis foram passados por água destilada, macerados em almofariz com 1 ml de água, centrifugados a 13.600g durante 3 minutos e aproveitado o sedimento. Este foi re-suspendido em 1 ml de água e de novo centrifugado, tendo esta operação sido repetida 3 vezes. Após a última re-suspensão, os eppendorfs foram perfurados na tampa, envolvidos em papel de alumínio e colocados em autoclave a 120 °C durante 3 horas. A hidrólise foi feita para cada 100 µl de amostra juntamente com 500 µl de tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,4 e na presença de 0,007 u de amiloglucosidase (EC 3.2.1.3, Boheringer 140 u/ml de suspensão) e 2 u α-amilase (EC 3.2.1.1, Boheringer 10000 u/ml suspensão) a 37 °C durante 12 horas. Após a hidrólise foi feita nova centrifugação a 13.600 g durante 3 minutos. O amido foi então quantificado por doseamento da glucose formada após a hidrólise e presente na fracção solúvel.

A quantificação destes metabolitos foi feita usando a seguinte fórmula de cálculo:

$$A = \frac{\frac{\Delta A b s}{\epsilon_M} \times \frac{V_c \times V_t}{V_a}}{P s}$$

[A: glucose ou frutose, para a sacarose o resultado final é dividido por 2, para o amido introduziu-se o factor de diluição; ΔAbs : variação da absorvência; ϵ_M : coeficiente de extinção molar do NADP; V_c : volume na cuvete de reacção; V_t : volume total de extracção; V_a : volume de amostra; P_s : peso seco da amostra]

Cada determinação foi feita a partir do extracto de dois discos de tecido foliar com \varnothing 7 mm ($0,77 \text{ cm}^2$ de área), recolhidos em plantas distintas e casualizadas tendo sido usadas 8 amostras ($n=8$) para cada tipo de folha sendo as experiências repetidas duas vezes para cada tratamento.

A leitura das absorvências foi feita a 340 nm em espectrofotómetro de duplo feixe e em modo cinético (Shimadzu, UV-2100). Os resultados foram expressos em μmoles por unidade de peso seco foliar ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{ps}$). O peso seco foliar de cada disco foi estimado como descrito em 2.4.

2.6.2. Proteína solúvel total

Os discos obtidos como descrito no ponto 2.4 deste capítulo, foram macerados em almofariz, com 1,5 ml de tampão Tris.HCl 100 mM pH 8,5 e 10 mg de polivinilpolipirrolidina (PVPP), na câmara fria a 4 °C. O extracto foi centrifugado a 13.600g durante 5 minutos, aproveitando-se o sobrenadante para quantificação.

A quantificação foi feita pelo método colorimétrico de Bradford (1976). As determinações foram feitas adicionando 100 μl de extracto a 1 ml de Bio-Rad® diluído (1:4, v:v). Após agitação esperou-se 10 minutos e procedeu-se à leitura da absorvência a 595 nm em espectrofotómetro (Shimadzu, UV-2100). Os valores da concentração de proteína solúvel total nas amostras analisadas foram calculadas por interpolação numa recta padrão, obtida a partir de leituras correspondentes a soluções de albumina de soro bovino de concentração conhecida.

Cada determinação foi feita a partir do extracto de dois discos de tecido foliar com \varnothing 7 mm ($0,77 \text{ cm}^2$ de área), recolhidos em plantas distintas e casualizadas tendo sido usadas 8 amostras ($n=8$) para cada tipo de folha sendo as experiências repetidas duas vezes para cada tratamento. Os resultados foram expressos em mg de proteína por unidade de peso seco foliar ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$). O peso seco foliar de cada disco foi estimado como descrito no ponto 2.4.

2.7. *Quantificação e tratamento estatístico dos dados*

Todas as quantificações foram realizadas a partir de plantas casualizadas, sendo os valores apresentados médias do número de amostras referidas anteriormente para cada determinação.

Os resultados indicados para os parâmetros ou índices de crescimento, morfologia e anatomia foliar, clorofilas, taxa de fotossíntese aparente, transpiração e condutância estomática e parâmetros bioquímicos foram avaliados por análise de variância uni- ou bi-factorial, consoante os casos.

No caso da variação de perda de água os resultados são apresentados sob a forma do valor médio das repetições \pm erro-padrão.

Na análise das taxas de capacidade fotossintética e curvas de resposta à luz os resultados são apresentados após ajustamento das curvas por regressão não linear de modelo hiperbólico e respectivos erros padrão para cada ponto. Para o cálculo do rendimento quântico foram ajustadas rectas de regressão na fase linear das taxas de fotossíntese, sendo o rendimento quântico traduzido pelo declive dessas rectas \pm erro-padrão, tal como para os resultados dos pontos de compensação para a luz.

Nas análises de variância, para valores de F significativos foi feita a separação de médias pelo teste de comparação múltipla de Duncan para $P \leq 0,05$. Para resultados apresentados em tabelas, valores na mesma coluna seguidos por letras diferentes são significativamente diferentes; para resultados apresentados em gráficos, barras com letras diferentes são significativamente diferentes.

3. RESULTADOS

3.1. Análise de crescimento

Os resultados que a seguir se apresentam referem-se aos parâmetros de crescimento, tendo as plantas sido avaliadas no final dos dois tratamentos de enraizamento, *in vitro* e *ex vitro*, a que correspondeu o dia zero de aclimatização, e no final da fase de aclimatização, sob os dois níveis de irradiância, 150 e 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.1).

3.1.1. Crescimento relativo, biomassa total e razão parte aérea / raiz

As plantas com sistema radicular *ex vitro* e aclimatizadas sob o nível de irradiância de maior intensidade (250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram as que apresentaram o valor de crescimento relativo em altura mais elevado (3,14 \pm 0,08), cerca de 2 vezes e meia mais elevado que o das plantas aclimatizadas a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, verificando-se que quer o tipo de sistema radicular, quer a intensidade da luz a que as microplantas estiveram sujeitas durante a aclimatização, provocaram alterações significativas neste parâmetro (Fig. 4.2).

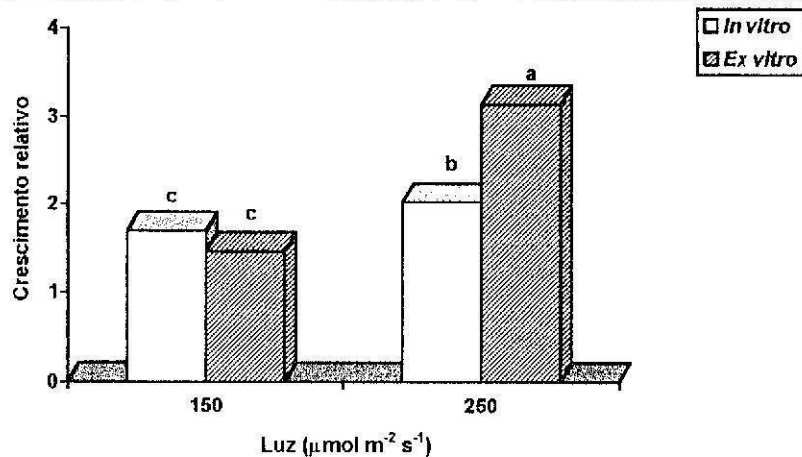


Figura 4.2. Efeito da intensidade de luz durante a fase de aclimatização no crescimento relativo em altura, em plantas de castanheiro micropropagadas com o sistema radicular desenvolvido *in vitro* e *ex vitro*.

Os valores mais baixos de crescimento relativo em altura foram apresentados pelas plantas aclimatizadas no regime de menor irradiância, independentemente do tipo de sistema radicular que possuíam no início da aclimatização, com $1,69 \pm 0,09$ para as enraizadas *in vitro* e $1,46 \pm 0,11$ para as enraizadas *ex vitro*. As plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com enraizamento *in vitro* apresentaram um valor intermédio entre os grupos de plantas referidos (Fig. 4.2).

A biomassa total por planta, dada pelo somatório do peso seco da raiz, do caule e das folhas no final das 4 semanas de aclimatização, foi influenciada pelos dois factores em estudo, tendo-se verificado que as microplantas com raízes *ex vitro* e aclimatizadas sob $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância foram as que apresentaram o valor de biomassa mais elevado, com $974,6 \pm 74,9$ mg, diferindo significativamente dos restantes grupos de plantas (Fig. 4.3). Este valor foi o triplo do apresentado pelas plantas com enraizamento *in vitro* ($335,9 \pm 14,1$ mg) e mais do dobro das plantas com raízes *ex vitro* e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($432,2 \pm 26,9$ mg). Assim, por efeito do factor luz, nas plantas com raízes *ex vitro*, o acréscimo foi de 372 mg nas plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e de 915 mg nas plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, cerca de duas vezes e meia mais.

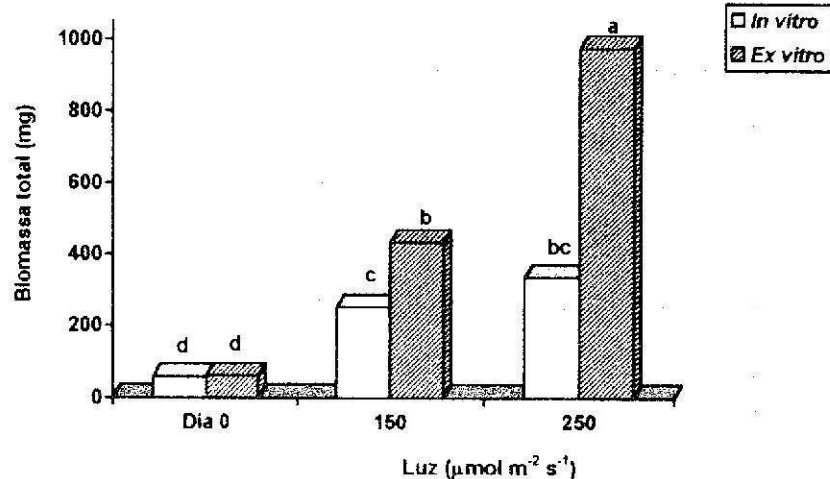


Figura 4.3. Efeito da intensidade de luz durante a fase de aclimatização na biomassa total em plantas de castanheiro micropropagadas com o sistema radicular desenvolvido *in vitro* e *ex vitro*, comparativamente com o dia zero de aclimatização.

Quando comparados cada um dos tratamentos de enraizamento com o respectivo dia zero foi possível registar os acréscimos que as microplantas obtiveram como

consequência do factor luz. Assim, para ambos os tratamentos de enraizamento verificaram-se aumentos significativos de biomassa, dependendo estes do regime luminoso a que as plantas estiveram sujeitas, sendo a maior irradiância a permitir o maior acréscimo (Fig. 4.3).

A razão entre o peso seco da parte aérea e do sistema radicular permite avaliar a relação de desenvolvimento entre estas duas estruturas, tendo-se observado que o tipo de sistema radicular não afecta significativamente este parâmetro, sendo a variabilidade apenas provocada pelo regime luminoso a que as plantas foram aclimatizadas. Assim, verificou-se que a um regime luminoso mais intenso correspondeu uma razão mais baixa, isto é, o aumento da intensidade de luz favoreceu a acumulação de biomassa na parte radicular comparativamente à biomassa da parte aérea (Fig. 4.4). Outro aspecto a referir é o relativo desequilíbrio que se regista nas microplantas com o sistema radicular formado *in vitro* no dia zero de aclimatização, com uma razão de $1,4 \pm 0,1$ contra $4,1 \pm 0,3$ registado nas microplantas com sistema radicular formado *ex vitro* (Fig. 4.4).

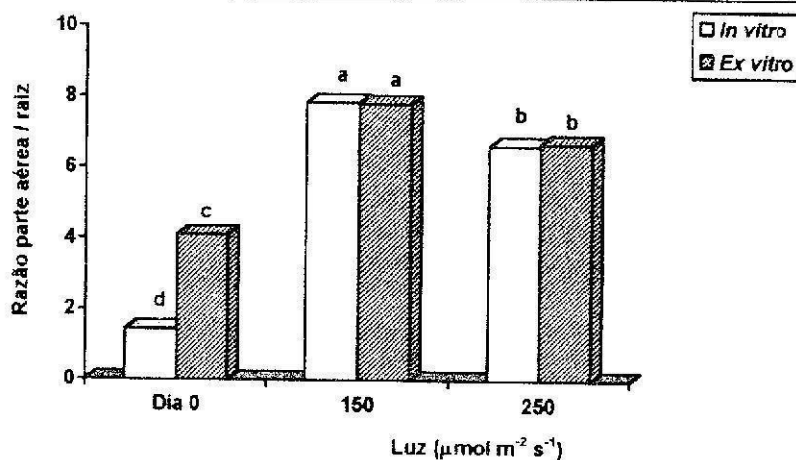


Figura 4.4. Efeito da intensidade de luz durante a fase de aclimatização na razão entre parte aérea e parte radicular em plantas de castanheiro micropropagadas com o sistema radicular desenvolvido *in vitro* e *ex vitro*, comparativamente com o dia zero de aclimatização.

Após a aclimatização verificou-se que para ambas as modalidades de enraizamento, as microplantas sujeitas a uma menor irradiância apresentaram uma razão parte aérea/raiz significativamente superior ($7,8 \pm 0,4$ e $7,7 \pm 0,3$ para as plantas enraizadas *in vitro* e *ex vitro* respectivamente) comparativamente às microplantas aclimatizadas a

maior irradiância ($6,6 \pm 0,4$ e $6,7 \pm 0,2$ para as plantas enraizadas *in vitro* e *ex vitro* respectivamente) (Fig. 4.4).

3.1.2. Biomassa foliar, radicular e razão de peso foliar

A acumulação de biomassa foliar mostrou ser afectada significativamente quer pelo sistema radicular que as plantas possuíam no início da aclimatização, quer pelo regime luminoso que as microplantas tiveram durante a aclimatização. As microplantas com o sistema radicular desenvolvido em condições *ex vitro* e sob o regime de luz mais elevado, apresentaram o valor mais elevado de biomassa foliar ($634,8 \pm 50,9$ mg), comparativamente aos três restantes grupos (Fig. 4.5).

Nas plantas com raízes *in vitro* o regime de maior intensidade permitiu um ganho de biomassa foliar comparativamente com o regime de menor intensidade de luz, embora sem diferença significativa entre si. Neste tratamento, a diferença de biomassa foliar entre os dois níveis de irradiância foi de 63 mg, enquanto que nas plantas com raízes *ex vitro* essa diferença foi de 339 mg (Fig. 4.5).

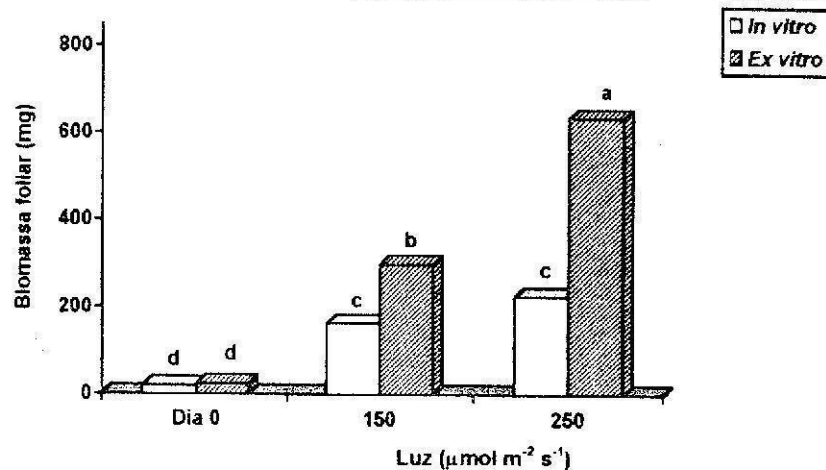


Figura 4.5. Efeito da intensidade de luz durante a fase de aclimatização na biomassa foliar em plantas de castanheiro micropropagadas com o sistema radicular desenvolvido *in vitro* e *ex vitro*, comparativamente com o dia zero de aclimatização.

De referir que a biomassa foliar das microplantas no dia zero de aclimatização apresentava valores relativamente semelhantes, $19 \pm 1,2$ mg nas plantas com enraizamento *in vitro* e $24 \pm 1,8$ mg nas plantas com enraizamento *ex vitro* (Fig. 4.5).

Ao avaliarmos o efeito da intensidade de luz na repartição de biomassa por tipo de folhas, análise feita para as folhas persistentes (*fP*), isto é, folhas formadas durante a fase de multiplicação dos rebentos e que se mantiveram durante as fases de enraizamento e aclimatização; para o conjunto das folhas diferenciadas durante a fase de aclimatização (*fN*) e, finalmente para o total de folhas que a planta possuía no final da aclimatização (*fT*), verificou-se que o acréscimo de biomassa foliar resultou sobretudo do desenvolvimento de folhas novas (*fN*), contribuindo estas com 95% e 90% nas plantas com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas sob 150 e 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância respectivamente, e 95% e 88% nas plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas sob 150 e 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância respectivamente (Fig. 4.6). O peso seco das folhas persistentes não foi influenciado pelo regime de luz, $14,6 \pm 1,3$ e $16,2 \pm 1,5$ mg para as plantas com sistema radicular *in vitro* e $33 \pm 2,9$ e $39,1 \pm 3,3$ mg para as plantas com sistema radicular *ex vitro*, aclimatizadas sob 150 e 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância respectivamente (Fig. 4.6).

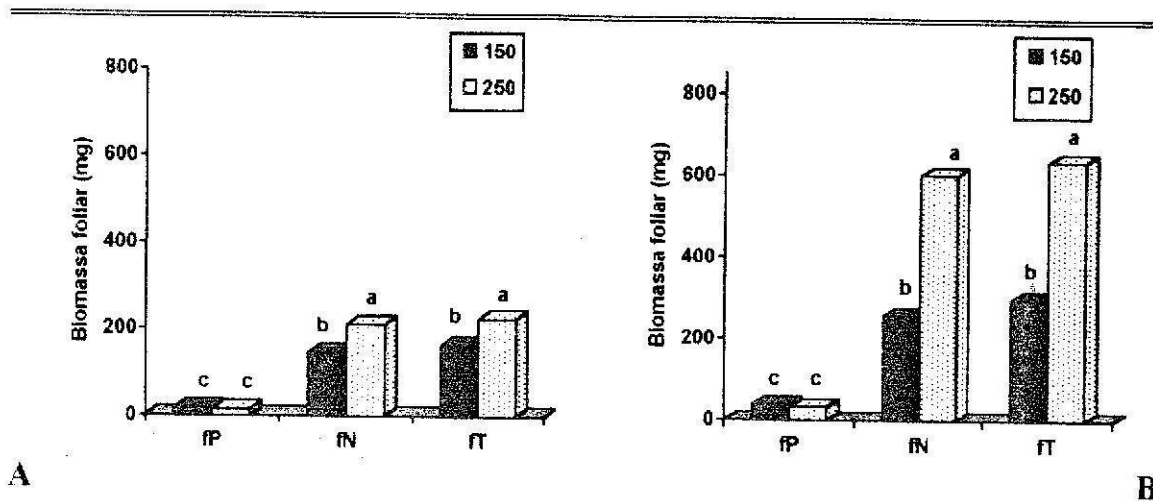


Figura 4.6. Efeito da intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a fase de aclimatização na biomassa das folhas persistentes (*fP*), novas (*fN*) e total de folhas (*fT*) em plantas de castanheiro micropropagadas com o sistema radicular desenvolvido *in vitro* (A) e *ex vitro* (B).

Deve no entanto ser referido que enquanto nas plantas com sistema radicular *in vitro* se verificou um decréscimo na biomassa das folhas persistentes comparativamente

ao dia zero, que era de $19 \pm 1,2$ mg, e nas plantas com sistema radicular *ex vitro* se verificou um ganho de $24,2 \pm 1,8$ mg de peso médio (Fig. 4.6).

O parâmetro biomassa radicular mostrou comportamento semelhante ao descrito para a biomassa foliar. As microplantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a maior irradiância ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) apresentaram um valor significativamente mais elevado, com $127,2 \pm 9,3$ mg (Fig. 4.7). Se analisarmos as variações neste parâmetro para cada um dos tratamentos de enraizamento e comparativamente ao dia zero de aclimação verificamos que, no entanto, esse comportamento foi diferente de acordo com o tipo de sistema radicular. Assim, no caso das microplantas com o sistema radicular desenvolvido *in vitro*, verificamos que só nas aclimatizadas sob intensidade de luz mais elevada, a biomassa radicular diferiu significativamente em relação ao dia zero; de facto as microplantas que estiveram sujeitas a um regime de luz mais baixo, o acréscimo de biomassa radicular que tiveram em relação ao dia zero, de 4,2 mg, não foi significativamente diferente (Fig. 4.7).

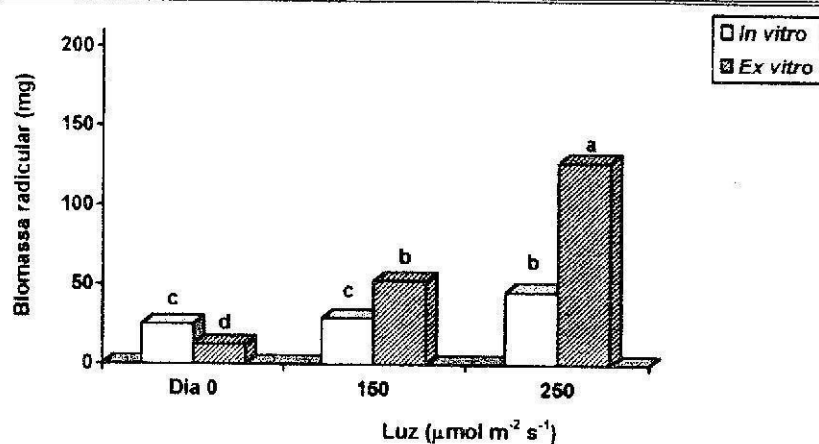


Figura 4.7. Efeito da intensidade de luz durante a fase de aclimação na biomassa radicular em plantas de castanheiro micropropagadas com o sistema radicular desenvolvido *in vitro* e *ex vitro*, comparativamente com o dia zero de aclimação.

Nas plantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro*, ambos os regimes de luz permitiram acréscimos de biomassa radicular significativamente diferentes em relação ao dia zero, bem como entre si (Fig. 4.7). De referir ainda a diferença de peso seco observada no dia zero entre o sistema radicular formado *in vitro*, de $25,2 \pm 1,9$ mg e o sistema radicular formado *ex vitro*, de $12,5 \pm 0,9$ mg (Fig. 4.7).

A razão de peso foliar (LWR) permite avaliar o investimento que a planta faz em biomassa foliar, proporcionalmente à biomassa das estruturas caulinares e radiculares. Nesse sentido, verificamos que não se registaram diferenças significativas entre os tratamentos por influência dos dois factores em estudo (Fig. 4.8).

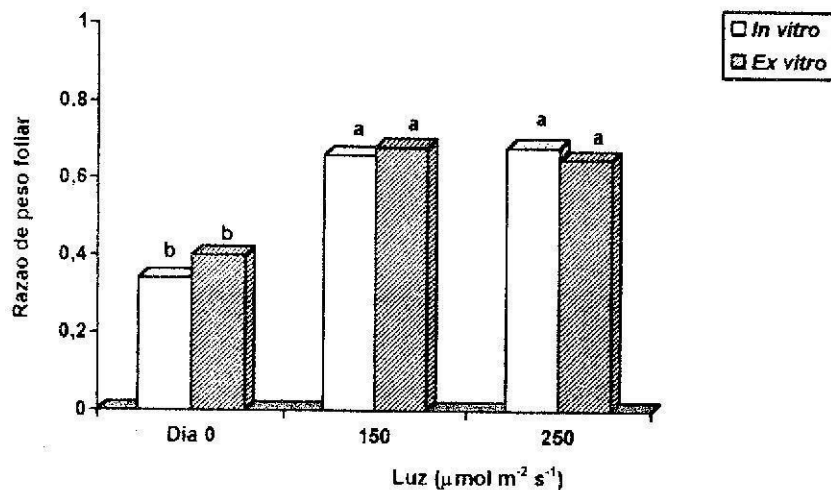


Figura 4.8. Efeito da intensidade de luz durante a fase de aclimatização na razão de peso foliar em plantas de castanheiro micropropagadas com o sistema radicular desenvolvido in vitro e ex vitro, comparativamente com o dia zero de aclimatização.

No entanto, e comparativamente ao início da aclimatização, dia zero, estes valores foram alterados e verificamos que, para qualquer das modalidades de aclimatização de ambos os tratamentos de enraizamento, o investimento em biomassa foliar foi sempre superior a 65%. Nas plantas com enraizamento *in vitro* verificou-se um ligeiro acréscimo na razão de peso foliar nas microplantas que estiveram submetidas ao regime de luz mais elevado ($0,66 \pm 0,03$ e $0,68 \pm 0,03$ respectivamente); nas plantas com enraizamento *ex vitro* registou-se o inverso, isto é, foi a menor intensidade de luz a permitir uma razão de peso foliar ligeiramente superior em relação ao regime de maior intensidade de luz ($0,68 \pm 0,05$ e $0,65 \pm 0,05$ respectivamente), no entanto sem qualquer diferença significativa entre estes valores (Fig. 4.8).

3.1.3. Área foliar, número de folhas e área foliar específica

A área foliar é, sem dúvida, um importante indicador para avaliar a capacidade fotossintética da planta e as suas capacidades de crescimento e desenvolvimento. Verificou-se que, sobre este parâmetro, se exerceu uma influência significativa dos factores rizogénese e intensidade de luz (Fig. 4.9). Registou-se um aumento significativo da área foliar com o regime de maior intensidade de luz, em ambos os tratamentos de rizogénese (Fig. 4.9). Para as microplantas com enraizamento *in vitro*, a área foliar das plantas aclimatizadas sob o regime de maior intensidade de luz ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) atingiu o valor médio de $71,8 \pm 3,3 \text{ cm}^2$ contra o valor de $50,9 \pm 2,3 \text{ cm}^2$ das plantas aclimatizadas sob o regime de menor intensidade de luz ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), o que representou um acréscimo de 40%. Nas plantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro*, a influência da intensidade luminosa foi ainda mais acentuada, de $102,1 \pm 5,4 \text{ cm}^2$ de área foliar média nas plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, passou-se para $183,5 \pm 11,6 \text{ cm}^2$ nas plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o que se traduziu num aumento de 80%.

Comparando estes valores de área foliar no final do período de aclimação com a área foliar que as microplantas possuíam no dia zero de aclimação, verificamos acréscimos significativos para ambos os grupos de plantas (Fig. 4.9).

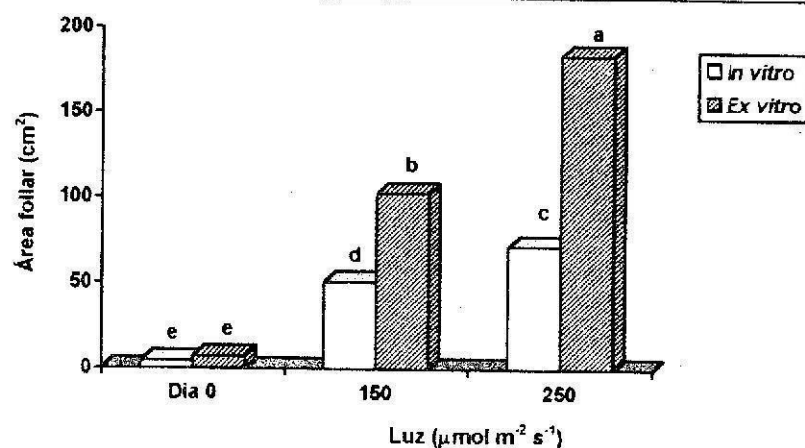


Figura 4.9. Efeito da intensidade de luz durante a fase de aclimação na área foliar de plantas de castanheiro micropropagadas com o sistema radicular desenvolvido *in vitro* e *ex vitro*, comparativamente com o dia zero de aclimação.

Se avaliarmos a proporção entre a área das folhas persistentes (*fP*), a área das folhas novas (*fN*) e a área total das folhas (*fT*), verificamos mais uma vez que é a área das folhas novas que contribui quase na totalidade para a superfície foliar total das microplantas após a aclimatização, não se registando diferenças significativas entre a área das folhas novas e a área do total das folhas (novas + persistentes), verificando-se que as folhas persistentes sofrem pouca expansão foliar durante a aclimatização (Fig. 4.10).

O factor luz influencia a expansão foliar das folhas novas nos dois tratamentos. Nas plantas com sistema radicular desenvolvido *in vitro* verifica-se um acréscimo de 45,6 cm² para 66,3 cm² (Fig. 4.10A), ao passo que nas plantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro* a superfície foliar passou de 88,7 cm² para 172,8 cm², isto é, mais do que duplicou (Fig. 4.10B).

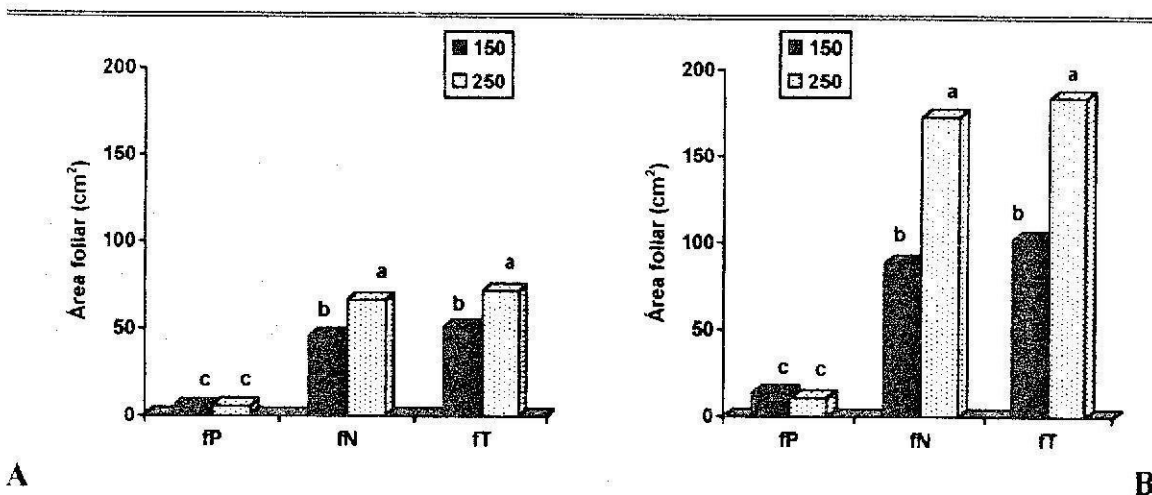


Figura 4.10. Efeito da intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a fase de aclimatização na área foliar de folhas persistentes (*fP*), novas (*fN*) e total de folhas (*fT*) em plantas de castanheiro micropropagadas com o sistema radicular desenvolvido *in vitro* (A) e *ex vitro* (B).

O número de folhas novas (*fN*) formadas no decorrer da aclimatização, mostrou ser influenciado de igual modo que a área foliar pelos factores em estudo (Fig. 4.11). Assim, o maior número de folhas foi obtido nas microplantas com sistema radicular *ex vitro* e aclimatizadas a 250 μmol m⁻² s⁻¹ com 6,6±0,2 folhas, não diferindo significativamente das plantas aclimatizadas a 150 μmol m⁻² s⁻¹ com 6,2±0,3 folhas (Fig. 4.11).

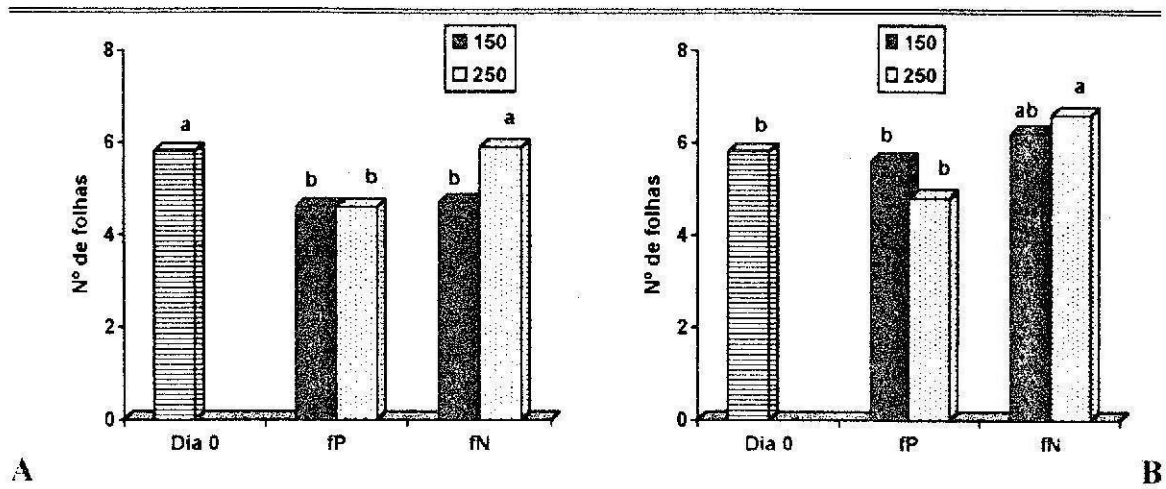


Figura 4.11. Efeito da intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a fase de aclimação no número de folhas formadas em plantas de castanheiro micropropagadas com o sistema radicular desenvolvido in vitro (A) e ex vitro (B), comparativamente com o dia zero de aclimação.

A área foliar específica (SLA) permite avaliar a relação entre o aumento de superfície foliar com o respectivo ganho em peso, sendo possível de afirmar que o significativo aumento de área foliar que tiveram as microplantas com raízes *ex vitro* e aclimatizadas a 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não foi acompanhado do respectivo aumento de peso (Fig. 4.12), pelo que será de admitir uma expansão foliar associada a um possível acréscimo de espaços intercelulares (ver ponto 3.2).

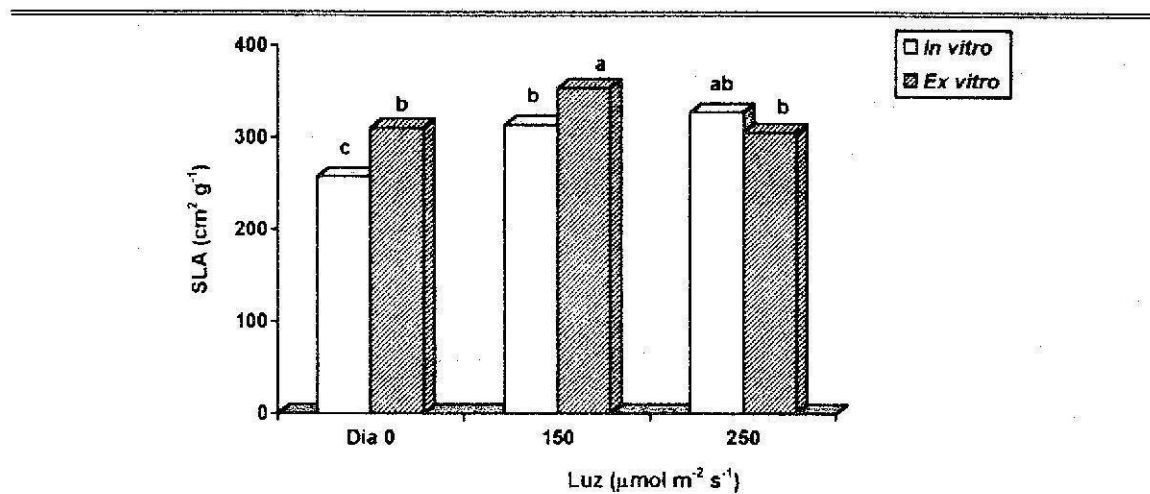


Figura 4.12. Efeito da intensidade de luz durante a fase de aclimação na área foliar específica (SLA) em plantas de castanheiro micropropagadas com o sistema radicular desenvolvido in vitro e ex vitro, comparativamente com o dia zero de aclimação.

Os valores mais elevados na área foliar específica foram obtidos para as microplantas com raízes *ex vitro* e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com $354,7 \pm 7,2 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ (Fig. 4.12).

Quando comparamos os valores de SLA em cada um dos tratamentos de rizogénese com o respectivo valor do dia zero de aclimatização, verificamos que para as plantas com raízes *in vitro* este indicador aumentou significativamente após a aclimatização, embora não se tenham registado diferenças resultantes do regime de luz (Fig. 4.12). Nas plantas com raízes *ex vitro*, verificou-se um aumento significativo nas plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em relação ao dia zero ($354,7 \pm 7,2$ e $310,3 \pm 8,4 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ respectivamente) mas o mesmo não aconteceu com o regime de maior intensidade de luz, que não diferiu significativamente do dia zero de aclimatização ($304,8 \pm 9,8 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ e $310,3 \pm 8,4 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ respectivamente) (Fig. 4.12), o que traduz uma vez mais o relativo equilíbrio na funcionalidade das estruturas foliares das microplantas enraizadas em condições *ex vitro*.

A avaliação da área foliar específica por grupo de folhas, persistentes (*fP*), novas (*fN*) e total (*fT*), permite visualizar mais detalhadamente estas variações (Fig. 4.13).

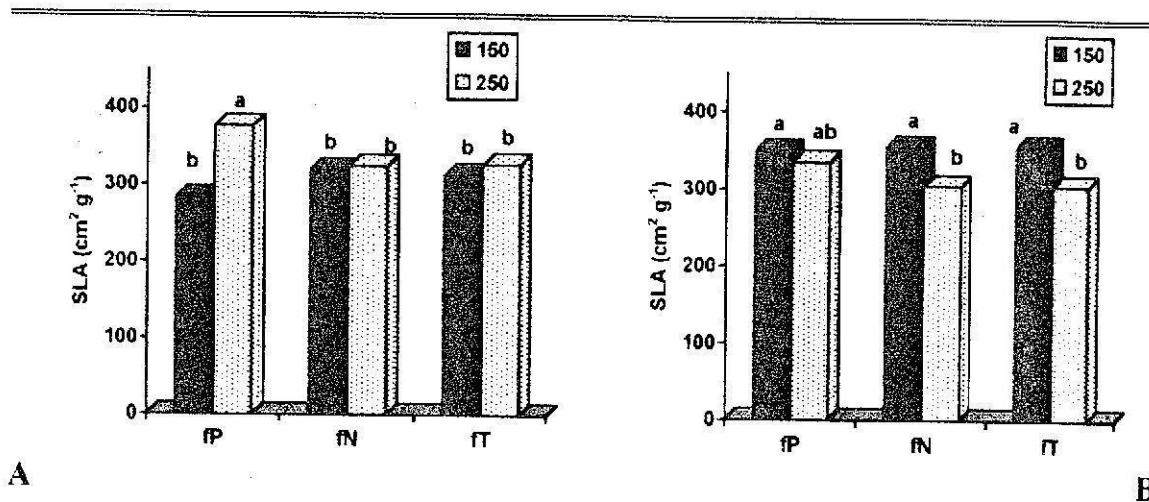


Figura 4.13. Efeito da intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a fase de aclimatização na área foliar específica (SLA) de folhas persistentes (*fP*), folhas novas (*fN*) e total de folhas (*fT*) em plantas de castanheiro micropropagadas com o sistema radicular desenvolvido *in vitro* (A) e *ex vitro* (B).

Assim, verificamos que o valor mais elevado para as plantas com enraizamento *in vitro* foi obtido para as folhas persistentes aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância, não apresentando os restantes valores diferenças significativas entre si

(Fig. 4.13A). Nas plantas com enraizamento *ex vitro* verificaram-se sempre valores significativamente superiores para a modalidade de menor intensidade luminosa, com excepção das folhas persistentes que não diferiram significativamente entre modalidades (Fig. 4.13B).

3.1.4. Taxa de crescimento relativo, taxa de assimilação e razão de área foliar

Os resultados das determinações da taxa de crescimento relativo (RGR), taxa líquida de assimilação (NAR) e razão de área foliar (LAR), sendo valores calculados a partir das médias, não foram sujeitos a análise estatística. Em relação à taxa de crescimento relativo (RGR) verifica-se um acréscimo para as microplantas aclimatizadas a uma maior intensidade de luz, de cerca de 50% para as plantas com sistema radicular *in vitro* (0,106 e 0,153 g g⁻¹ dia⁻¹ respectivamente) e cerca de 370% para as plantas com sistema radicular *ex vitro* (0,138 e 0,512 g g⁻¹ dia⁻¹ respectivamente) (Tab. 4.2).

Tabela 4.2. Influência do tipo de desenvolvimento radicular e da intensidade da luz na taxa de crescimento relativo (RGR), taxa líquida de assimilação (NAR) e na razão de área foliar (LAR) em plantas de castanheiro micropropagadas com o sistema radicular desenvolvido in vitro e ex vitro.

Rizogénese	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	RGR (g g ⁻¹ dia ⁻¹)	NAR (g m ⁻² dia ⁻¹)	LAR (m ² g ⁻¹)
<i>In vitro</i>	150	0,106	10,6	0,0211
	250	0,153	15,3	0,0218
<i>Ex vitro</i>	150	0,138	16,8	0,0241
	250	0,512	41,2	0,0197

Também a taxa líquida de assimilação (NAR) sofreu idêntica evolução, tendo sido positivamente influenciada pelos regimes de luz mais intensos e com maior significado para as plantas com sistema radicular *ex vitro* em que quase triplicou (16,8 para 41,2 g m⁻² dia⁻¹ respectivamente) (Tab. 4.2). Quanto à razão de área foliar (LAR) registaram-se pequenas

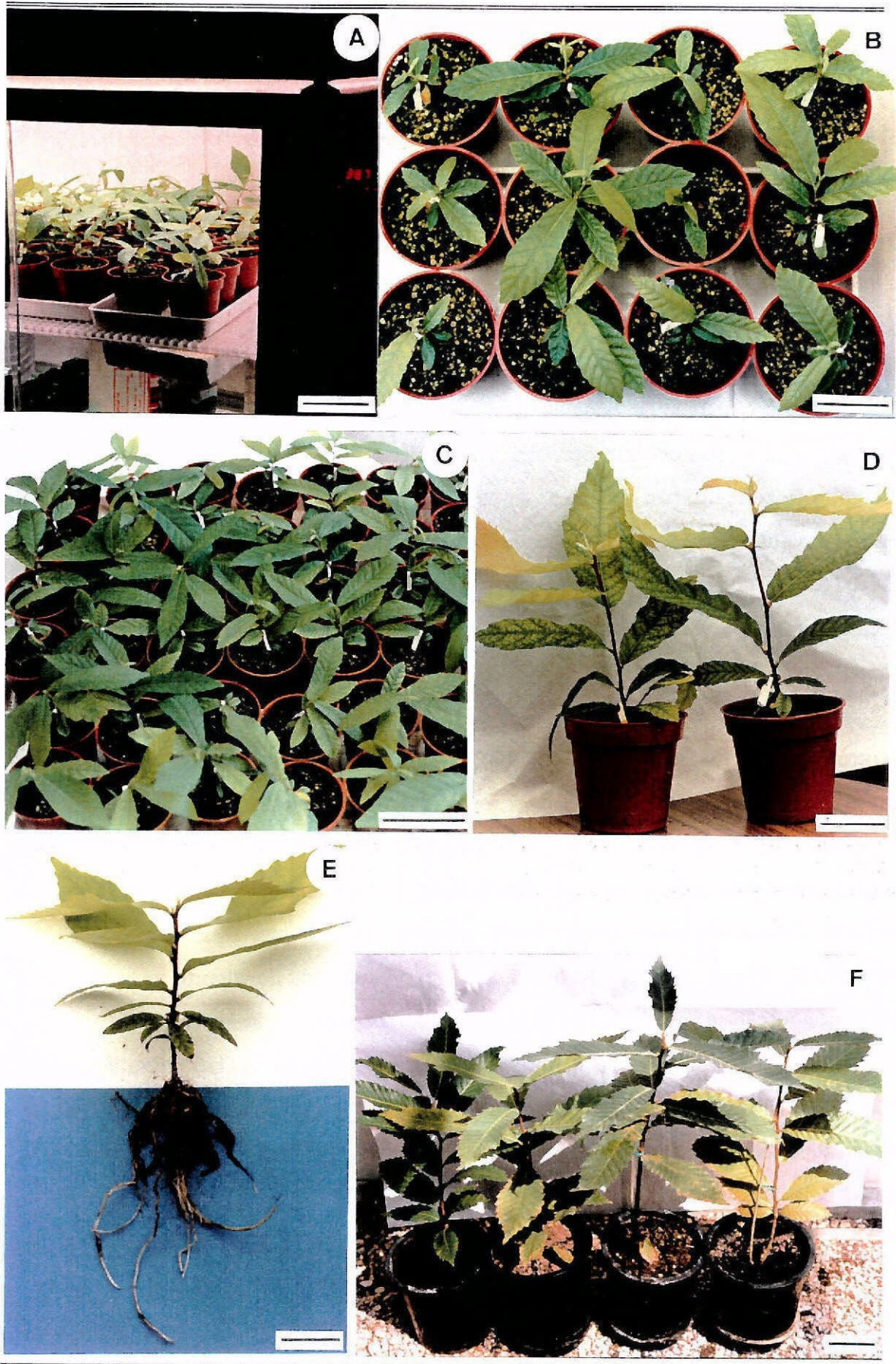
flutuações entre as modalidades dos tratamentos, parecendo não ter sido muito influenciada pelos regimes de luz a que as plantas estiveram sujeitas durante a aclimatização (Tab. 4.2).

A Figura 4.14 representa alguns aspectos de plantas de castanheiro micropropagadas durante e após a fase de aclimatização cujos resultados quantitativos se acabaram de descrever.

Página ao lado:

Figura 4.14. Diferentes aspectos de plantas de castanheiro micropropagadas durante e após a fase de aclimatização sob o regime de luz mais elevado ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). (A) Aspecto das plantas no interior do estufim de aclimatização. (B) Aspecto de plantas com enraizamento in vitro no final da aclimatização. (C, D e E) Aspecto de plantas com enraizamento ex vitro no final da aclimatização. (F) Plantas micropropagadas com seis meses. A barra representa 10 cm em A, C e F e 5 cm em B, D e E.

IV. *Aclimação de plantas de castanheiro regeneradas in vitro*



3.2. Histologia e anatomia foliar

3.2.1. Análise qualitativa

3.2.1.1. Observações histológicas

As secções transversais dos diferentes tipos de folha analisados antes e após os diferentes tratamentos e condições de aclimatização, bem como das folhas de campo de plantas micropropagadas com um ano, apresentaram uma maior ou menor diferenciação dorsiventral do mesófilo em parênquima em paliçada e lacunoso, muito de acordo com as condições ambientais em que decorreu a sua diferenciação e expansão (Fig. 4.15). No entanto não se registaram diferenças susceptíveis de permitirem uma clara diferenciação, em termos qualitativos, entre o mesmo tipo de folha das plantas dos diferentes tratamentos de aclimatização, pelo que a descrição que se segue, feita com base nas folhas das plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se poderá aplicar aos outros tratamentos.

As folhas do dia zero de aclimatização (*fD0*) apresentaram uma espessura reduzida e uma diferenciação muito pouco nítida entre parênquima em paliçada e parênquima lacunoso (Fig. 4.15A). O que deveria ser o parênquima em paliçada, está organizado numa só camada de células com forma ovóide, pouco alongadas. O parênquima lacunoso apresentou-se com poucos espaços intercelulares, apresentando ainda este tipo de folhas reduzido desenvolvimento vascular, como se pode observar através da organização da nervura central (Fig. 4.16A). De referir ainda que os tecidos de suporte, que conferem resistência mecânica ao nível da nervura central, são praticamente inexistentes.

Durante a aclimatização verificaram-se alterações estruturais neste tipo de folhas. Assim, verificou-se que o mesófilo das folhas persistentes apresentou uma redução significativa dos espaços intercelulares, com a formação de novas células clorofilinas, apesar de se manter uma quase inexistente diferenciação entre parênquima em paliçada e lacunoso (Fig. 4.15B). Na nervura principal não se registaram desenvolvimento de novos elementos vasculares, bem como de tecidos de suporte (Fig. 4.16B), sendo o aspecto em tudo semelhante ao já observado na nervura principal no início da aclimatização.

As folhas de campo (*fc*) de plantas micropropagadas desenvolvidas em condições naturais apresentaram estrutura de folhas de sol bem definida, com maior espessura do que as folhas formadas *in vitro* e com uma diferenciação bem nítida entre parênquima em paliçada e lacunoso; o parênquima em paliçada apresentou-se com células alongadas de forma rectangular bem definida, dispostas compactamente em uma a duas camadas e o parênquima lacunoso composto por células esféricas com poucos espaços intercelulares (Fig. 4.15F). A diferenciação de tecidos vasculares, xilema e floema, ao nível da nervura central apresentou-se bem nítida e desenvolvida, para além da presença significativa de tecidos de suporte, em especial colênquima (Fig. 4.16F).

A análise das folhas desenvolvidas durante a fase de aclimatização, folha um, folha dois e folha três, mostrou uma adaptação gradual das estruturas histológicas no decorrer do processo de aclimatização, de acordo com as novas condições de irradiância e progressivas reduções de humidade em que as folhas se foram desenvolvendo (Fig. 4.15C, D e E). O parênquima em paliçada mostrou uma gradual modificação estrutural, traduzida pela aproximação da forma das células a uma forma mais rectangular, bem como ao aparecimento, em algumas observações, de uma segunda camada de células; como consequência a espessura do parênquima lacunoso diminuiu. No entanto não foram significativas as mudanças ao nível da diminuição dos espaços intercelulares. A espessura total das folhas aumentou gradualmente, apresentando valores intermédios entre as folhas persistentes e as folhas de campo. Progressivos foram também a diferenciação e desenvolvimento do sistema vascular ao nível da nervura central apresentando a folha três um desenvolvimento muito aproximado ao que se observa nas folhas de campo (Fig. 4.16C, D e E). De facto, foi possível observar em algumas nervuras a diferenciação de uma segunda série de tecidos vasculares, xilema e floema. Significativa foi também a gradual formação de tecidos de suporte, em especial colênquima, que no caso da folha três se mostram bem desenvolvidos (Fig. 4.16E).

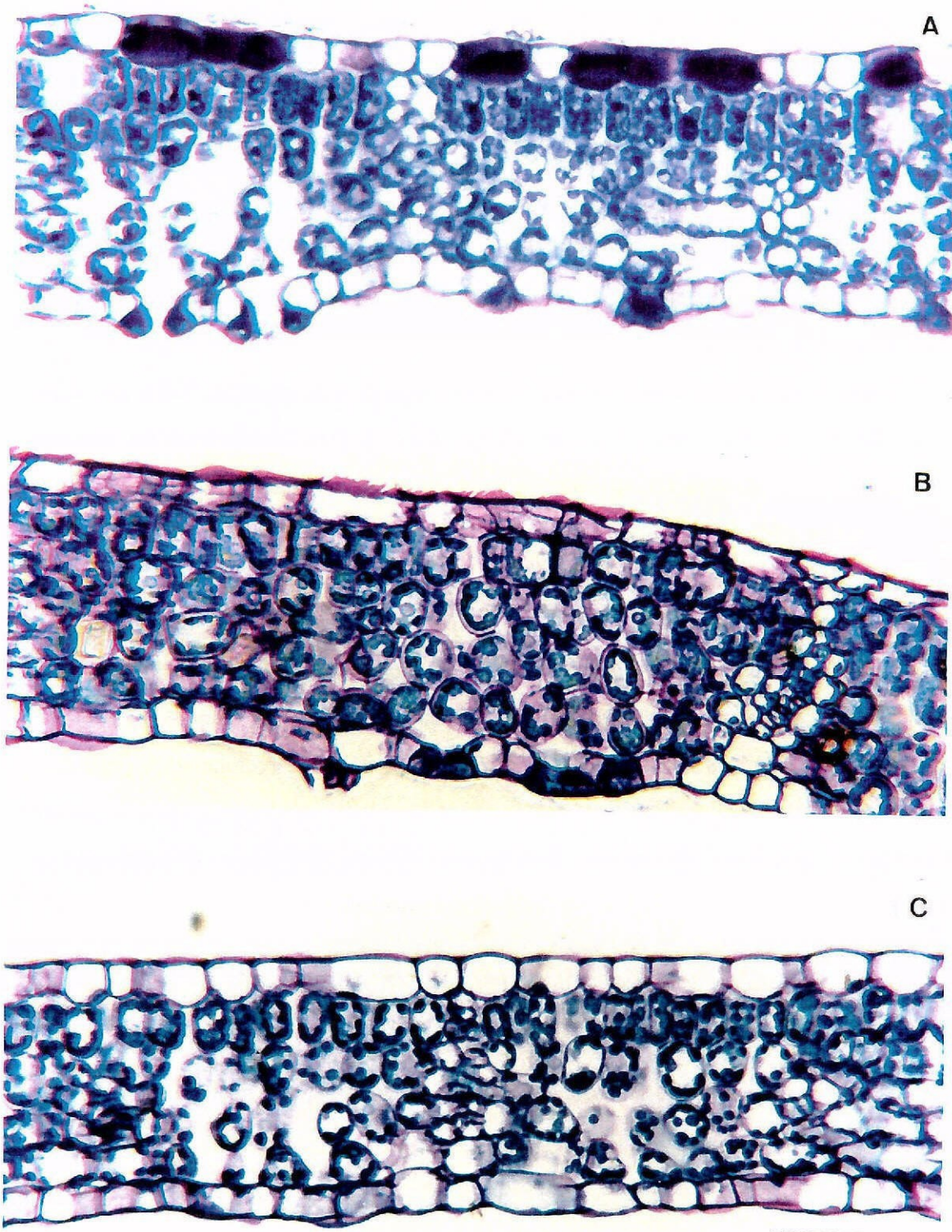


Figura 4.15. Cortes transversais ao nível do mesófilo dos diferentes tipos de folhas analisadas em plantas de castanheiro micropropagadas com enraizamento ex vitro e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (A) Folha do dia zero (fD0). (B) Folha persistente (fP). (C) Folha um (f1). Em todas a barra representa $50 \mu\text{m}$.

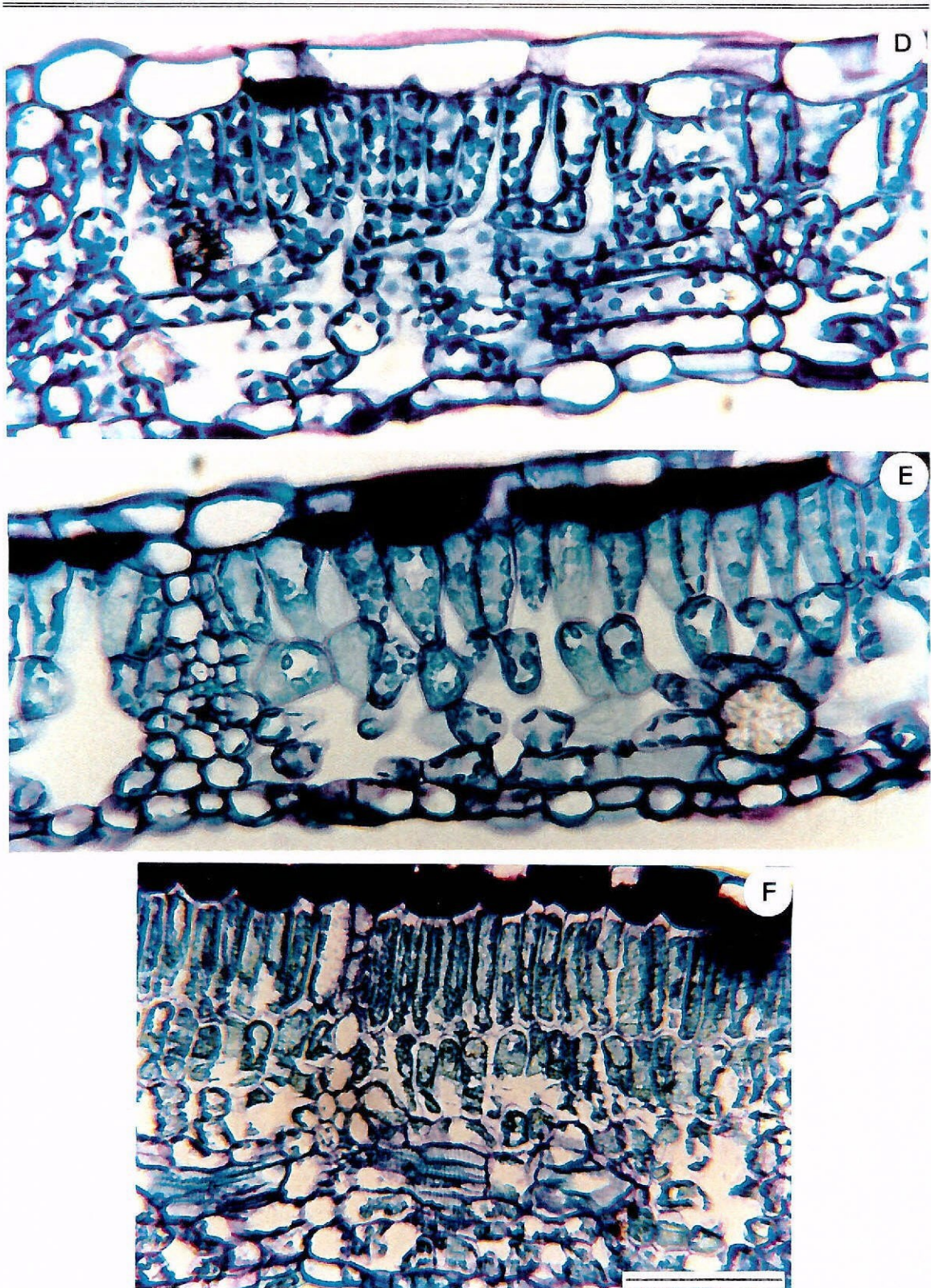


Figura 4.15 (continuação). Cortes transversais ao nível do mesófilo dos diferentes tipos de folhas analisadas em plantas de castanheiro micropropagadas com enraizamento ex vitro e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (D) Folha dois (f2). (E) Folha três (f3). (F) Folha de campo (fC). Em todas a barra representa $50 \mu\text{m}$.

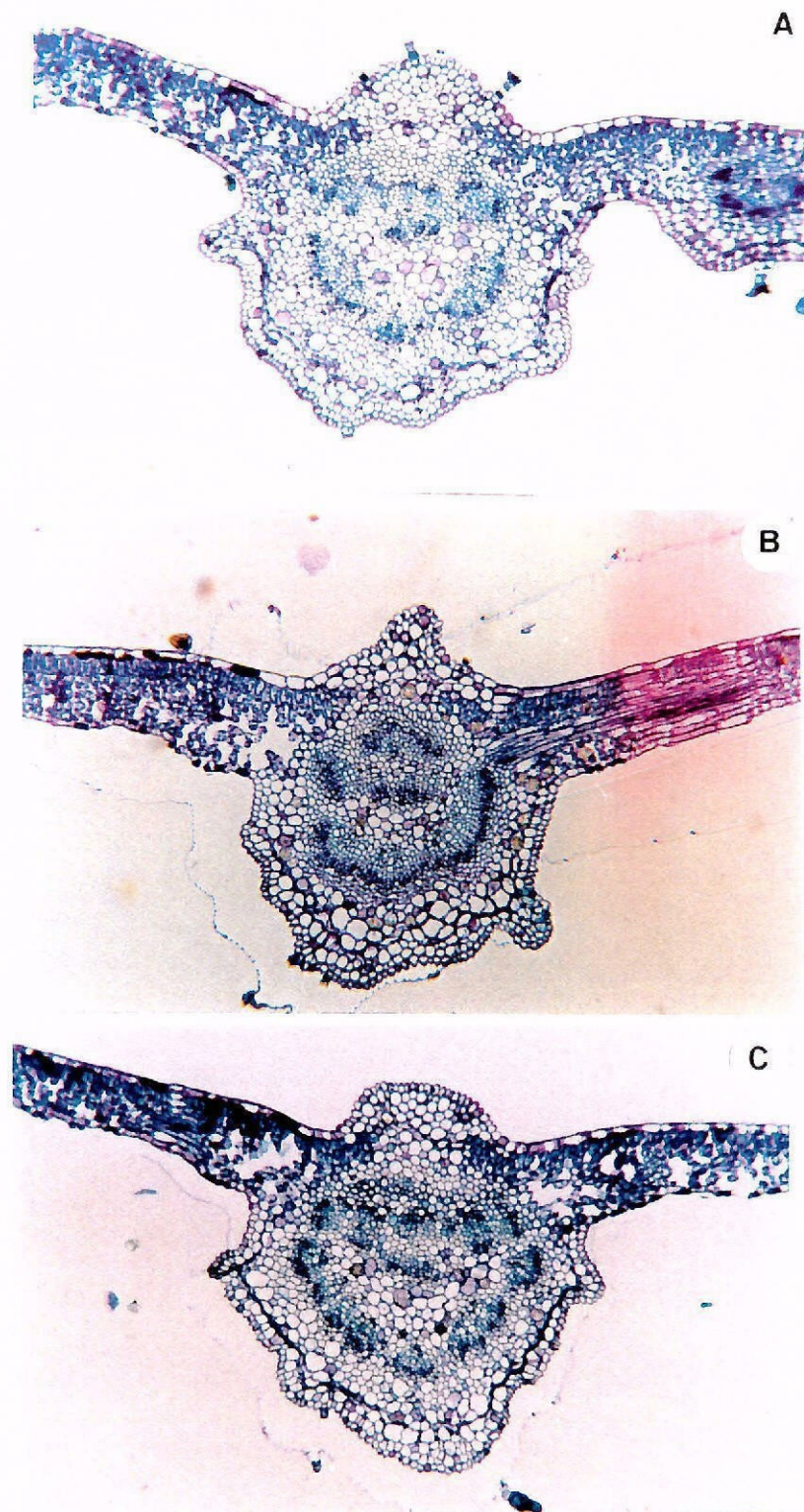


Figura 4.16. Cortes transversais ao nível da nervura central dos diferentes tipos de folhas analisadas em plantas de castanheiro micropropagadas com enraizamento ex vitro e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (A) Folha do dia zero (FD0). (B) Folha persistente (fP). (C) Folha um (f1). Em todas a barra representa $100 \mu\text{m}$

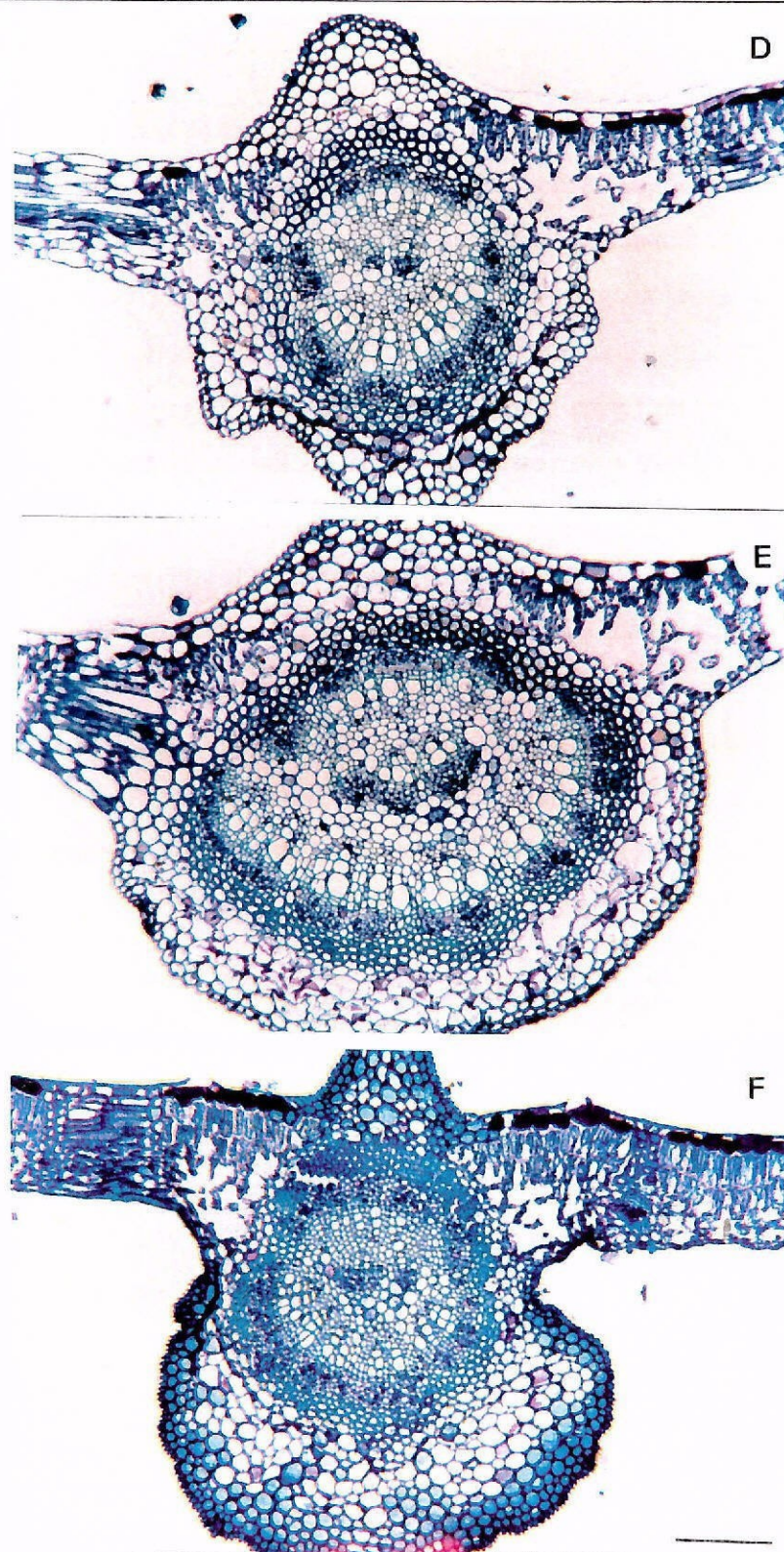
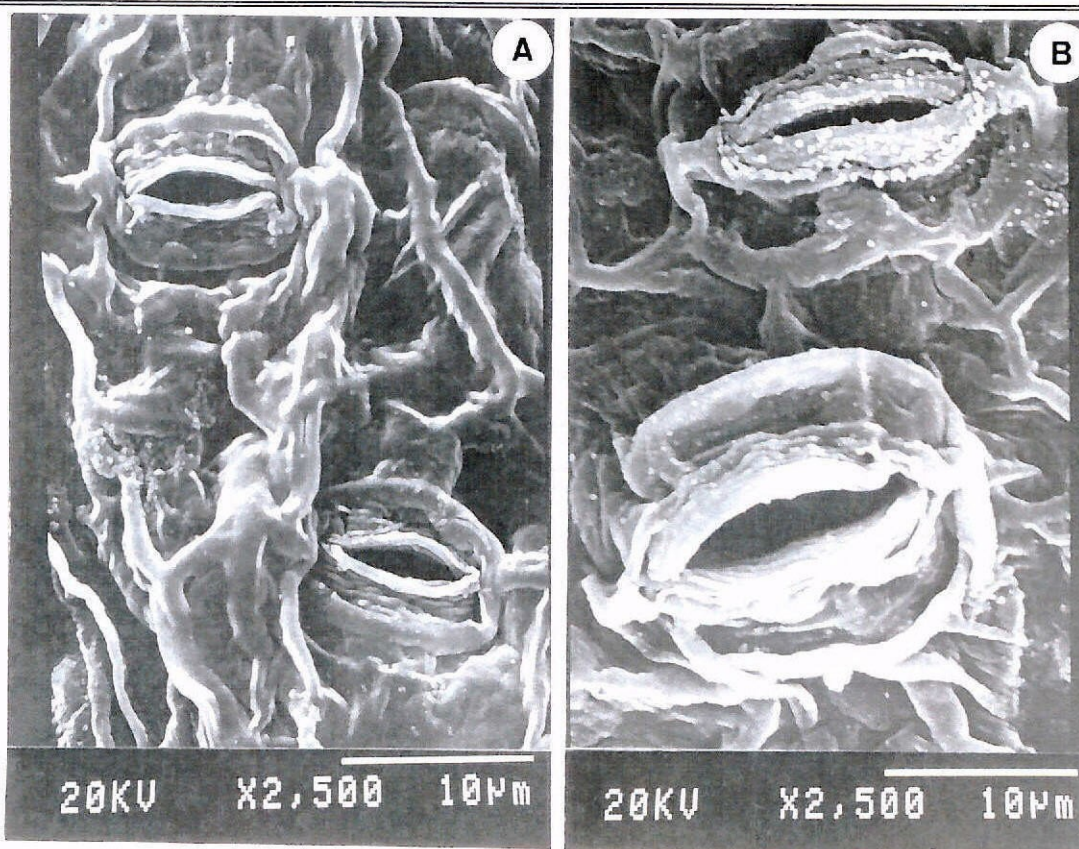


Figura 4.16 (continuação). Cortes transversais ao nível da nervura central dos diferentes tipos de folhas analisadas em plantas de castanheiro micropropagadas com enraizamento ex vitro e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (D) Folha dois (f2). (E) Folha três (f3). (F) Folha de campo (fC). Em todas a barra representa 100 μm .

3.2.1.2. Estomas

A morfologia dos estomas foi outro dos parâmetros que permitiu acompanhar o gradual processo de adaptação das plantas micropropagadas às condições de luz e, particularmente, de humidade, que se registaram durante a fase de aclimatização. Assim, verificou-se que os estomas das folhas persistentes das plantas com enraizamento *in vitro*, se apresentaram completamente abertos, sobrelevados, com um aspecto flácido e deformado e com uma forma quase circular (Fig. 4.17D), em tudo idêntico ao aspecto morfológico apresentado pelos estomas no final da fase de alongamento (Fig. 4.17A). A diferenciação entre células guarda e células companheiras é praticamente inexistente e a sua morfologia em nada se alterou comparativamente à dos estomas diferenciados no final do período de enraizamento (*fD0*) (Fig. 4.17B). Nas plantas que tiveram o seu processo de expressão radicular em condições *ex vitro*, verificamos que as condições ambientais tiveram capacidade de modificar a morfologia estomática. Assim, é já bastante evidente a diferenciação entre células guarda e células companheiras e a forma mais elipsoidal que os estomas começam a apresentar. No entanto continua a ser patente a acentuada abertura estomática (Fig. 4.17C).



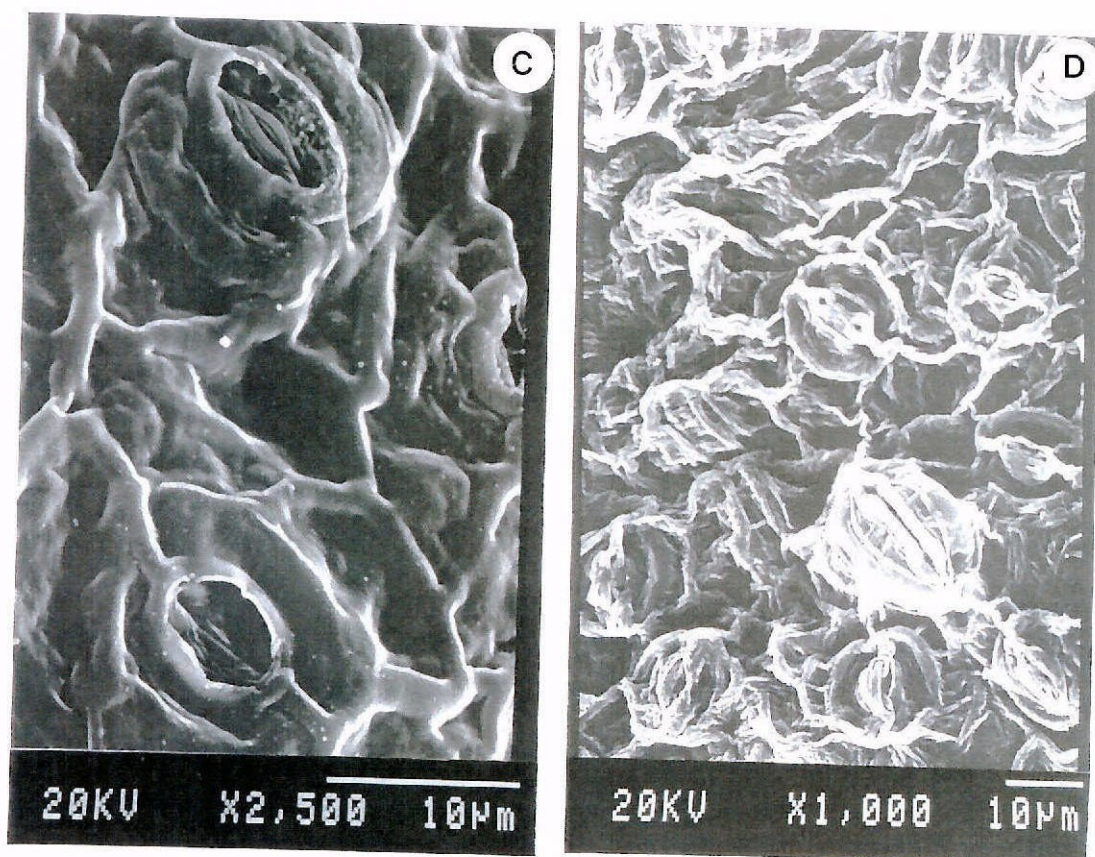


Figura 4.17. Imagens ao MEV da morfologia estomática em diferentes tipos de folhas de plantas de castanheiro micropropagadas. **(A)** Folha in vitro no final da fase de alongamento. **(B)** Folha do dia zero das plantas com enraizamento in vitro (fD0). **(C)** Folha do dia zero das plantas com enraizamento ex vitro (fD0). **(D)** Folha persistente (fP).

A análise da morfologia estomática ao longo do processo de formação de novas folhas no decorrer do processo de aclimatização, mostra também a sua gradual diferenciação e normalização comparativamente com os estomas das folhas de plantas com crescimento no campo (Fig. 4.18). Estas apresentam-se com células guarda e células companheiras bem diferenciadas, com forma elipsoidal característica e com o ostíolo praticamente fechado (Fig. 4.18D). Esta evolução parece ser fundamentalmente condicionada pelas condições de humidade no decorrer da diferenciação, não tendo a irradiância mostrado ser um factor que afectasse este processo, nem tão pouco a origem do sistema radicular que as plantas possuíam no início da aclimatização, já que se puderam observar morfologias estomáticas muito semelhantes para qualquer dos tratamentos, quer de enraizamento quer de luz.

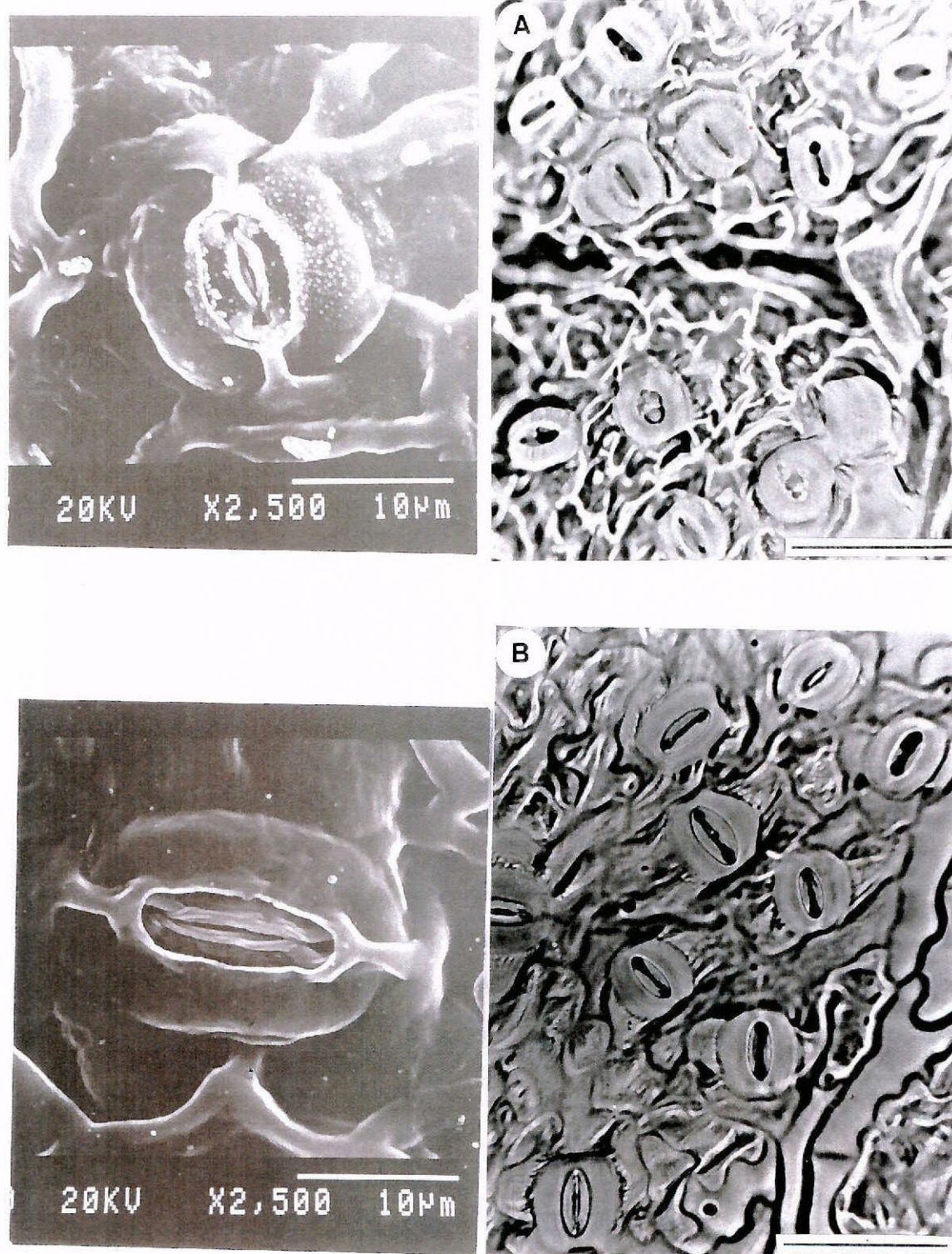


Figura 4.18. Imagens ao MEV (à esquerda) e MO (à direita) da morfologia estomática em diferentes tipos de folhas de plantas de castanheiro micropropagadas com enraizamento ex vitro e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (A) folha um (f1). (B) folha dois (f2). Na MO a barra representa $50 \mu\text{m}$ em A, B e C e $10 \mu\text{m}$ em D.

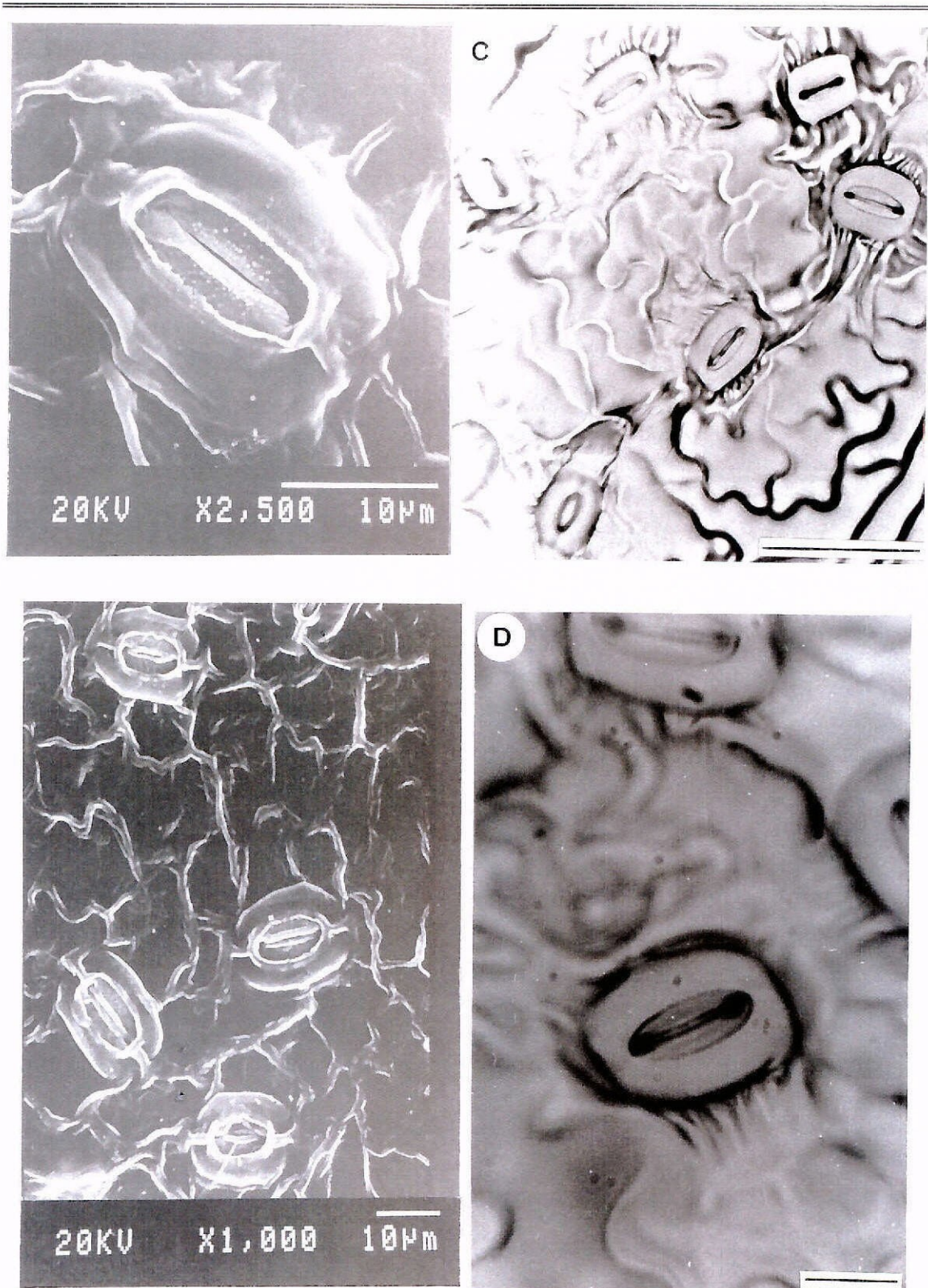


Figura 4.18 (continuação). Imagens ao MEV (à esquerda) e MO (à direita) da morfologia estomática em diferentes tipos de folhas de plantas de castanheiro micropropagadas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (C) Folha três (f3). (D) Folha de campo (fC). Na MO a barra representa 50 μm .

3.2.2. Indicadores quantitativos

3.2.2.1. Espessura da folha, nervura central e número de células

A espessura da folha não foi influenciada significativamente pelos tratamentos de aclimatização, quando se avaliaram as plantas com enraizamento *in vitro* e *ex vitro* e após os dois níveis de irradiância a que estiveram sujeitas, independentemente do tipo de folha (Tab. 4.3).

Tabela 4.3. Influência do tipo de desenvolvimento radicular e da intensidade da luz na espessura da folha e diâmetro da nervura principal no final da fase de aclimatização em plantas de castanheiro micropropagadas.

Rizogénese	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Espessura (μm)	Nervura (μm)
<i>In vitro</i>	150	105,6 a	734,0 a
	250	102,3 a	557,5 c
<i>Ex vitro</i>	150	102,9 a	640,7 b
	250	99,8 a	654,7 b

Já o mesmo não aconteceu com o desenvolvimento e consequente espessura da nervura central, onde o regime de luz a que as microplantas estiveram sujeitas e a interacção entre este e o tipo de sistema radicular, mostraram afectar significativamente este parâmetro, tendo as folhas das plantas com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentado o valor mais elevado e as folhas das plantas com enraizamento *ex vitro* sem apresentarem diferenças significativas entre si (Tab. 4.3).

A análise dos resultados da influência da irradiância luminosa sobre cada um dos tipos de folhas para cada um dos tratamentos de enraizamento e comparativamente com os resultados obtidos nas folhas do dia zero e em folhas de campo, estão apresentados na Figura 4.19. Para a espessura da folha verificamos, em ambos os casos, uma ligeira redução na espessura da folha nas folhas persistentes, comparativamente à espessura que possuíam no dia zero de aclimatização. A folha um e folha dois apresentam um gradual

acréscimo que não é acompanhado, embora sem diferença significativa, pela folha três. As folhas de campo são as que apresentaram uma maior espessura, com $178,5 \pm 4,8 \mu\text{m}$.

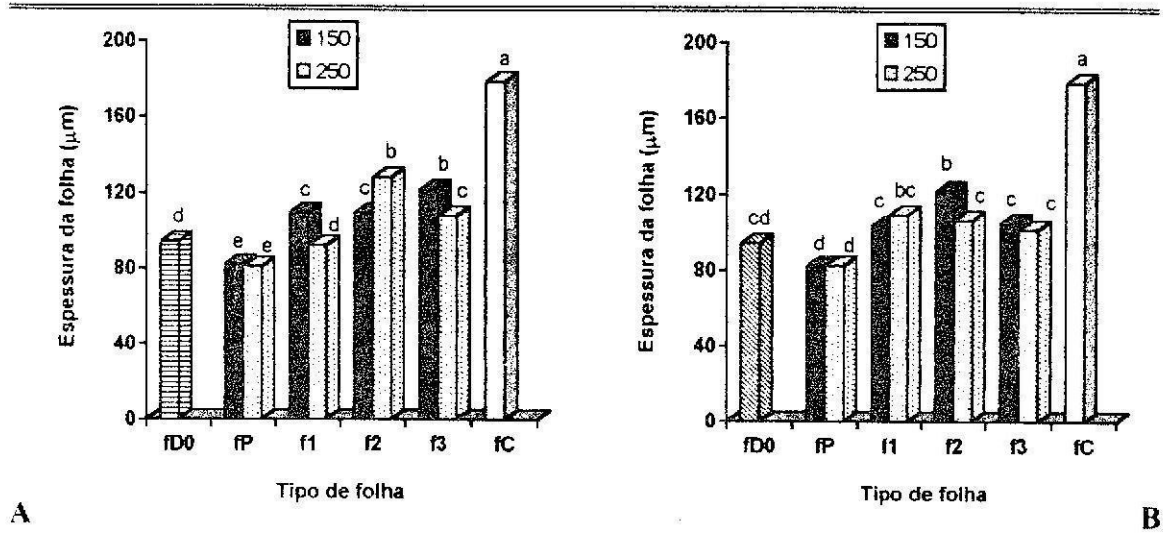


Figura 4.19. Efeito do regime de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a fase de aclimatização de plantas de castanheiro micropropagadas, na espessura da folha para cada um dos tipos de folhas analisadas, folha do dia zero (fD0) e folhas de campo (fC). (A) Plantas com sistema radicular desenvolvido in vitro. (B) Plantas com sistema radicular desenvolvido ex vitro.

Em relação ao diâmetro da nervura central (Fig. 4.20), tal como já havíamos

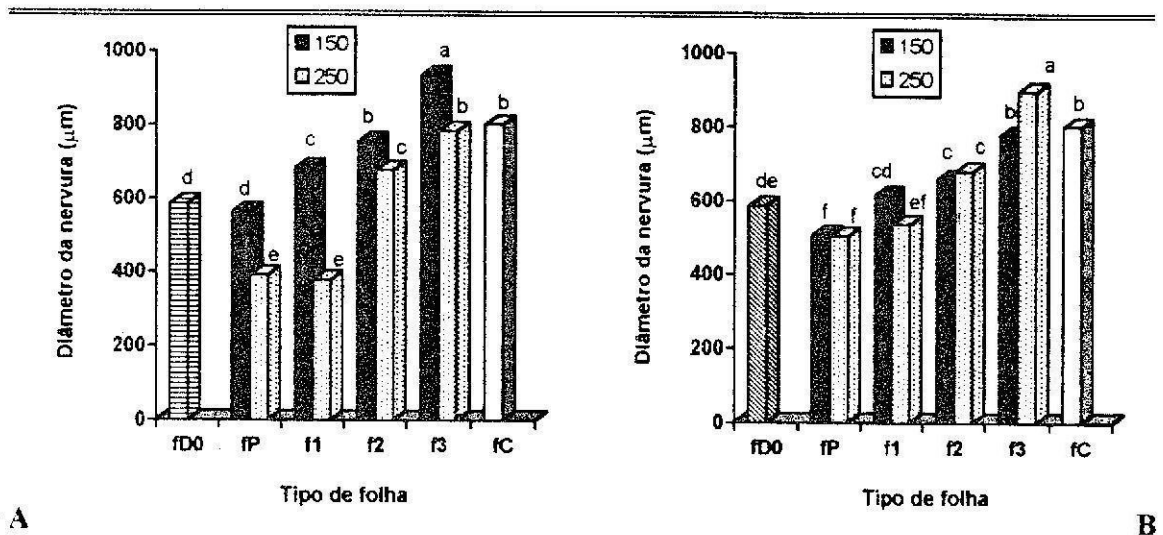


Figura 4.20. Efeito do regime de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), durante a fase de aclimatização de plantas de castanheiro micropropagadas, no diâmetro da nervura principal para cada um dos tipos de folhas analisadas, folhas do dia zero (fD0) e folhas de campo (fC). (A) Plantas com sistema radicular desenvolvido in vitro. (B) Plantas com sistema radicular desenvolvido ex vitro.

referido anteriormente, ele vai gradualmente aumentando nas folhas que se vão diferenciando.

Se no caso das plantas com enraizamento *in vitro* (Fig. 4.20A) se registou sempre um maior diâmetro da nervura principal nas folhas desenvolvidas no tratamento de menor irradiância, já no caso das plantas com enraizamento *ex vitro*, a nervura da folha dois e folha três mostrou ser positivamente influenciada pelo regime de maior irradiância (Fig. 4.20B). Verificou-se ainda, em ambos os casos, que o diâmetro da nervura principal da folha três foi significativamente superior ao registado nas folhas de campo.

A quantificação do número de células por unidade de comprimento nos cortes transversais dos diferentes tipos de folhas analisados foi contabilizada apenas nas plantas com enraizamento *ex vitro* e feita a análise comparativa do efeito do regime luminoso a que as plantas estiveram sujeitas durante a fase de aclimatização. Os resultados obtidos estão indicados nas Tabelas 4.4 e 4.5. Verificou-se que o regime luminoso não provocou diferenças significativas neste parâmetro, tendo as folhas das plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ um valor médio de $36,2 \pm 2,3$ células por $100 \mu\text{m}$ e as folhas das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ uma média de $36,9 \pm 2,8$ células (Tab. 4.4). No entanto, quando a análise é feita com base no tipo de folha analisada verificamos que o número de células é já significativamente afectado (Tab. 4.5), observando-se um decréscimo no número de células por área à medida que as novas folhas se vão diferenciando, confirmando assim aquilo que atrás havíamos referido aquando da descrição da estrutura anatómica dos diferentes tipos de folhas, no final da aclimatização.

Tabela 4.4. Influência do regime luminoso durante a aclimatização no número de células em $100 \mu\text{m}$ de comprimento de corte transversal da folha.

Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Nº de células
150	36,2 a
250	36,9 a

Tabela 4.5. Número de células em $100 \mu\text{m}$ de comprimento de corte transversal nos diferentes tipos de folhas no final da aclimatização.

Folha	Nº de células
fP	45,9 a
f1	37,1 b
f2	31,3 c
f3	31,9 c

Analisando a influência da irradiância sobre o número de células nos diferentes tipos de folhas comparativamente com as folhas do dia zero, verificamos que as folhas persistentes registaram um significativo acréscimo deste parâmetro, o que traduz uma certa funcionalidade deste tipo de folhas durante o processo de aclimação (Fig. 4.21).

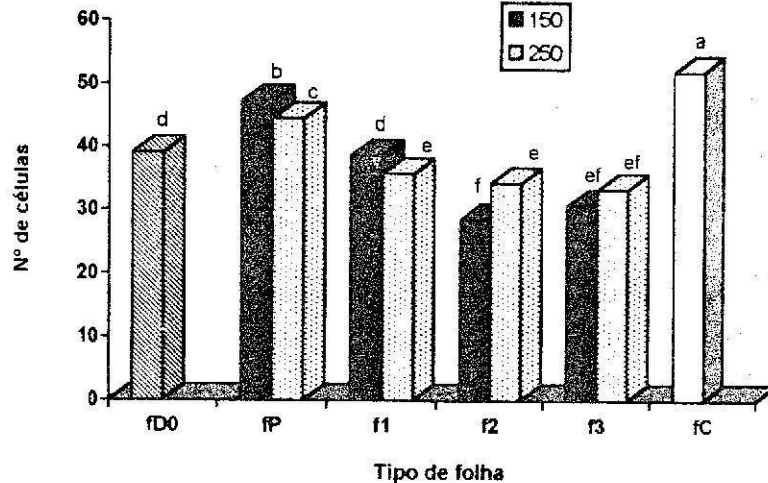


Figura 4.21. Efeito do nível de irradiância durante a fase de aclimação no número de células existentes em 100 µm de comprimento em corte transversal para cada um dos tipos de folhas analisadas folha do dia zero (fD0) e folhas de campo (fC), em plantas de castanheiro micropropagadas com sistema radicular desenvolvido ex vitro e comparadas com os valores de folhas do dia zero (fD0) e folhas de campo (fC).

Quando comparadas com o número de células das folhas de campo, verificamos que a folha dois e a folha três possuem ainda um número de células significativamente inferior (Fig. 4.21). É de registrar ainda que ao nível destas folhas se verifica um ligeiro acréscimo no número de células no tratamento de maior irradiância, diferença essa que é significativa no caso da folha dois mas não da folha três.

3.2.2.2. Estrutura interna e frequência estomática

A análise da estrutura interna da folha foi feita avaliando para cada tecido, epiderme superior, parênquima em paliçada, parênquima lacunoso e epiderme inferior, a sua respectiva espessura. Os resultados são apresentados em percentagem de cada um deles na espessura total da folha e estão referidos na Tabela 4.6.

Da análise da Tabela 4.6 verificamos que os factores tipo de sistema radicular e nível de irradiância nem sempre provocaram diferenças significativas ao nível da diferenciação dos tecidos constituintes das folhas. De facto, no caso da epiderme superior e parênquima em paliçada só o factor sistema radicular provocou diferenças, apresentando as folhas das plantas com enraizamento *in vitro* uma % de tecido epidérmico ligeiramente superior comparativamente às folhas das plantas com enraizamento *ex vitro* e no caso do parênquima em paliçada verificou-se o contrário, isto é, as plantas com enraizamento *ex vitro* apresentaram um maior % deste tecido comparativamente com o das plantas com enraizamento *in vitro*. Em relação ao parênquima lacunoso não se registaram quaisquer diferenças significativas provocadas pelos factores em estudo (Tab. 4.6). A epiderme inferior mostrou ser afectada apenas pelo factor rizogénese (Tab. 4.6).

Tabela 4.6. Influência do tipo de desenvolvimento radicular e do nível de luz durante a aclimatização, no desenvolvimento de cada um dos tecidos constituintes da folha no final da fase de aclimatização. Os valores apresentados referem-se à % de cada um em relação à espessura total da folha.

Rizogénese	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Ep. superior (%)	P. paliçada (%)	P. lacunoso (%)	E. inferior (%)
<i>In vitro</i>	150	14,6 ab	34,3 b	41,7 a	9,4 b
	250	15,0 a	36,0 ab	37,9 a	11,1 a
<i>Ex vitro</i>	150	13,8 b	38,7 a	38,5 a	9,1 b
	250	13,8 b	38,6 a	39,1 a	8,6 b

Os resultados obtidos em cada um dos tratamentos de enraizamento, independentemente, e sob o efeito das duas irradiâncias utilizadas, estão representados nas Figuras 4.22 e 4.23, onde estão também referidas as características histológicas do mesófilo das folhas do dia zero e de folhas de campo. O facto mais significativo, e que é facilmente perceptível nos gráficos das referidas figuras, é o progressivo acréscimo da % do parênquima em paliçada, com o conseqüente decréscimo do parênquima lacunoso, com valores que se vão gradualmente aproximando aos registados nas folhas de campo de plantas micropropagadas que, nos casos da folha três das plantas com enraizamento *ex vitro* não apresenta já diferenças significativas (Fig. 4.22).

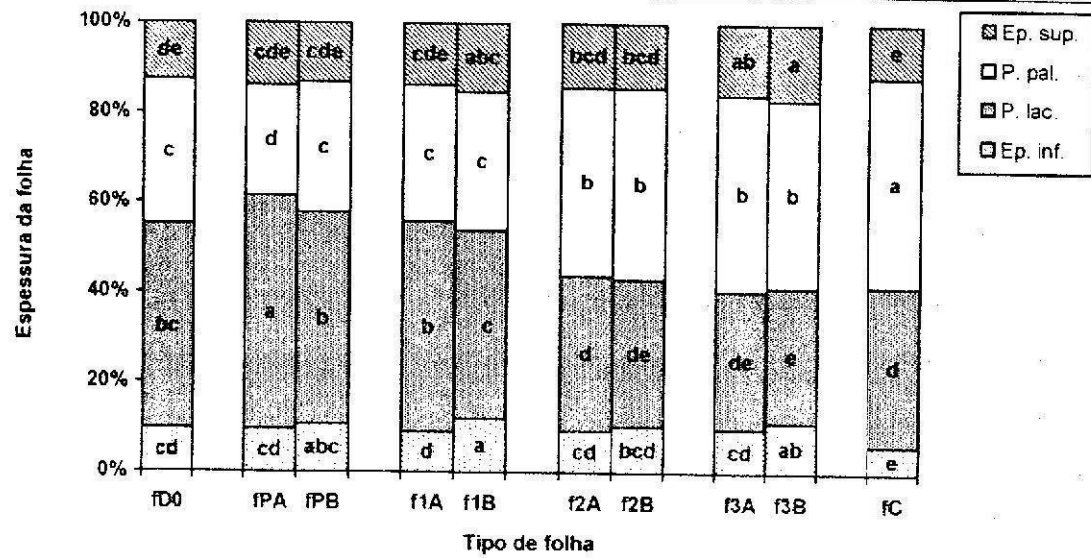


Figura 4.22. Espessura dos diferentes tecidos da folha, epiderme superior (ep. sup.), parênquima em paliçada (p. pal.), parênquima lacunoso (p. lac.) e epiderme inferior (ep. inf.), indicada em % da espessura total da folha, para cada um dos tipos de folhas analisadas, folhas do dia zero (fD0) e folhas de campo (fC). Plantas com enraizamento in vitro e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A) e $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B). Comparação múltipla de médias feita entre cada tecido.

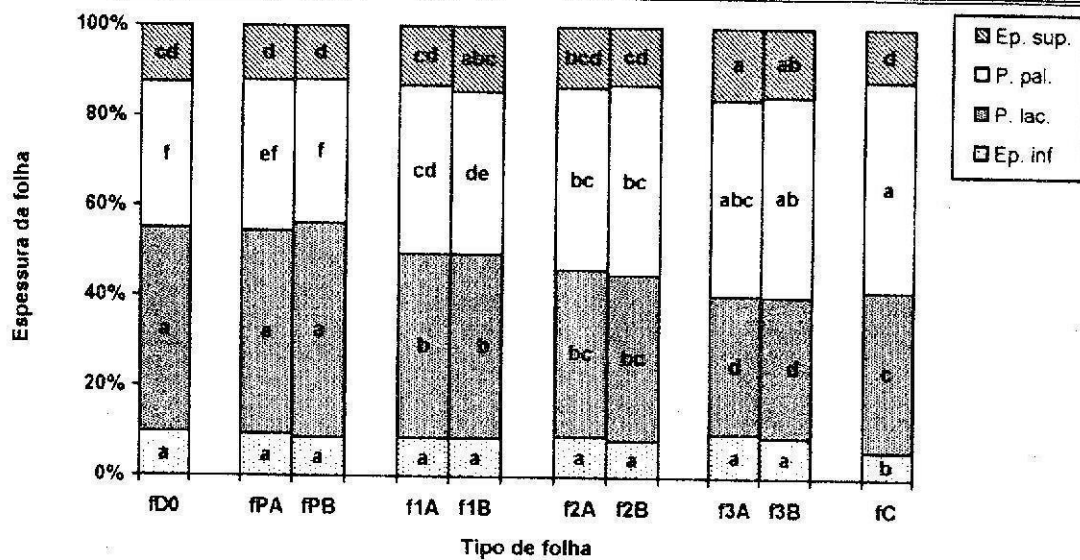


Figura 4.23. Espessura dos diferentes tecidos da folha, epiderme superior (ep. sup.), parênquima em paliçada (p. pal.), parênquima lacunoso (p. lac.) e epiderme inferior (ep. inf.), representada em % da espessura total da folha, para cada um dos tipos de folhas analisadas, folhas do dia zero (fD0) e folhas de campo (fC). Plantas com enraizamento ex vitro e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A) e $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B). Comparação múltipla de médias feita entre cada tecido.

Tal como referimos anteriormente, confirmam-se as poucas diferenças que se registam para cada tipo de folhas em consequência da irradiância a que as microplantas estiveram sujeitas durante o período de aclimatização. Neste aspecto apenas podemos destacar as diferenças ao nível do parênquima em paliçada nas folhas persistentes e do parênquima lacunoso das folhas persistentes e folha um das plantas com enraizamento *in vitro* (Fig. 4.22).

A frequência estomática, expressa pelo número de estomas por mm^2 , determinada nas plantas com enraizamento *ex vitro*, não foi influenciada pelo regime de irradiância a que as plantas estiveram sujeitas durante a aclimatização (Tab. 4.7), tendo-se no entanto registado diferenças em função do tipo de folha (Tab. 4.8). De facto registou-se uma progressiva redução da densidade estomática com o decorrer do processo de aclimatização e de acordo com o desenvolver de novas folhas, com diferenças significativas logo para a folha um, comparativamente às folhas persistentes. De referir ainda que entre a folha dois e folha três já não se registaram diferenças (Tab. 4.8).

Tabela 4.7. Influência do regime luminoso durante a aclimatização na frequência estomática.

Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Frequência estomática
150	295,1 a
250	299,3 a

Tabela 4.8. Frequência estomática nos diferentes tipos de folhas após os tratamentos de aclimatização.

Folha	Frequência estomática
fP	412,4 a
f1	305,8 b
f2	243,8 c
f3	226,8 c

Quando analisamos a frequência estomática para cada um dos tipos de folha das plantas aclimatizadas, verificamos que não se registaram diferenças significativas entre o número de estomas das folhas do dia zero e as folhas persistentes (Fig. 4.24).

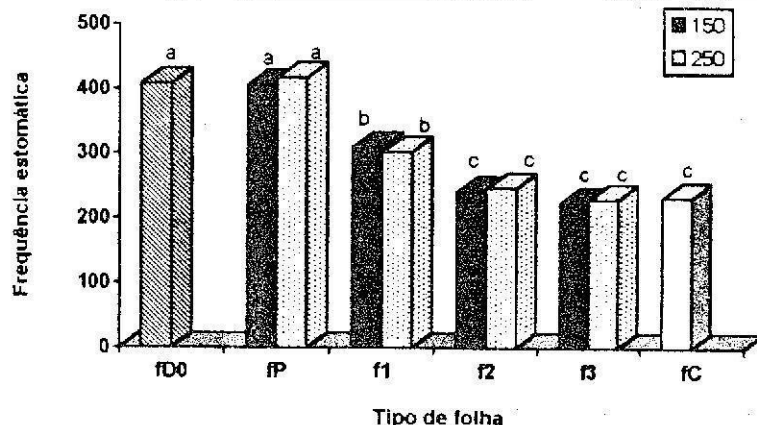


Figura 4.24. Efeito da intensidade de luz durante a fase de aclimatização na frequência estomática para cada um dos tipos de folhas analisadas, em plantas de castanheiro micropropagadas com sistema radicular desenvolvido ex vitro, aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e comparadas com os valores de folhas do dia zero e folhas de campo.

A folha dois e folha três, com valores entre $224,2 \pm 8,9$ e $246,8 \pm 6,1$ estomas mm^{-2} , não se distinguiram do valor registado nas folhas de campo, que apresentaram um valor médio de $231,8 \pm 8$ estomas mm^{-2} (Fig. 4.24).

3.3. Variação da perda de água

A variação do conteúdo relativo em água (*RWC*) foi quantificada nas folhas persistentes (*fP*), folha dois (*f2*) e folha três (*f3*) das plantas com enraizamento *ex vitro* e após os dois tratamentos de irradiância na aclimatização (150 e $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Foi também determinado a variação do conteúdo relativo em água em folhas de campo (*fC*) de plantas micropropagadas a crescer em vaso.

Os resultados dessas determinações são apresentados nas Figuras 4.25 a 4.28, onde se avalia, para cada um dos tratamentos de aclimatização, a influência da irradiância de aclimatização em cada um dos tipos de folha analisada.

Nas plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, quando se quantificou a variação da perda de água através dos discos foliares, não se registaram diferenças significativas entre os diferentes tipos de folhas, verificando-se que após 20 minutos de exposição ao ar, os

discos da folha três tinham perdido 54% da sua água, os discos da folha dois 67,3% e os discos das folhas persistentes 60,3% (Fig. 4.25).

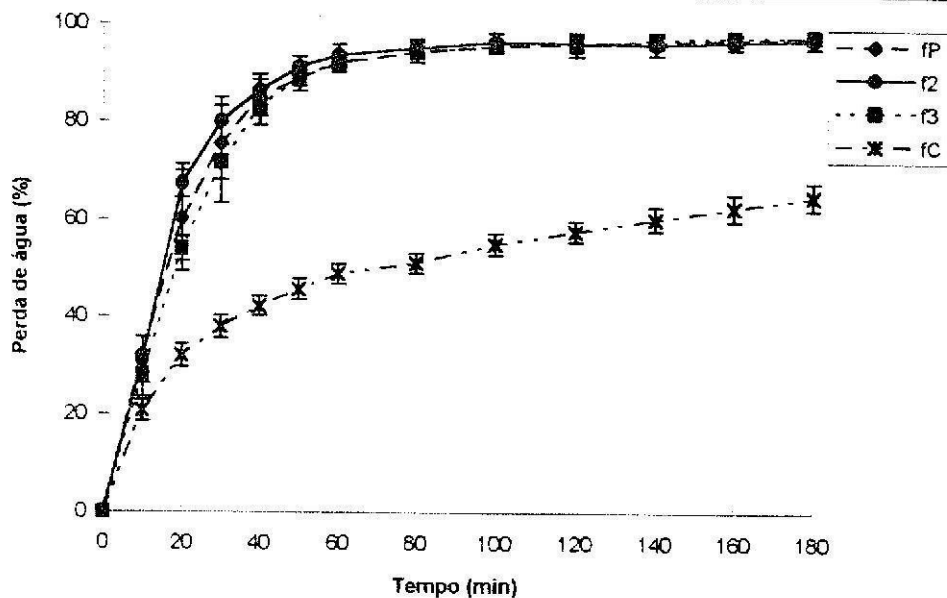


Figura 4.25. Variação da perda de água determinada em discos em folhas persistentes (fP), folha dois (f2) e folha três (f3) de plantas de castanheiro com enraizamento ex vitro no final da aclimatização a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância e em folhas de plantas de campo micropropagadas (fC).

Ao fim de uma hora, todos os tipos de folhas tinham perdido mais de 90% do seu conteúdo relativo em água. Os discos das folhas de campo mostraram um mais eficaz controlo na perda de água, de tal forma que no final do ensaio, após 3 horas de exposição ao ar, apenas tinham perdido 64% do seu conteúdo em água.

O comportamento das percentagens de perda de água, quando a determinação foi feita com as folhas inteiras, apresentou algumas diferenças comparativamente ao que se registou com discos. Assim, verificou-se uma alteração entre o comportamento das folhas persistentes e folha dois, tendo estas apresentado já uma maior capacidade de retenção de água. A folha três, apresentou por sua vez diferenças significativas na % de perda de água comparativamente com as folhas persistentes e folha dois, com 49% contra 60,3% e 60% respectivamente (Fig. 4.26). Também neste caso se verificou uma perda na ordem dos 90%, após uma hora de exposição ao ar. O comportamento das folhas de campo confirmaram esta tendência, de maior capacidade de retenção da folha intacta

comparativamente aos discos, registrando no final do ensaio apenas uma perda de água de 30% (Fig. 4.26).

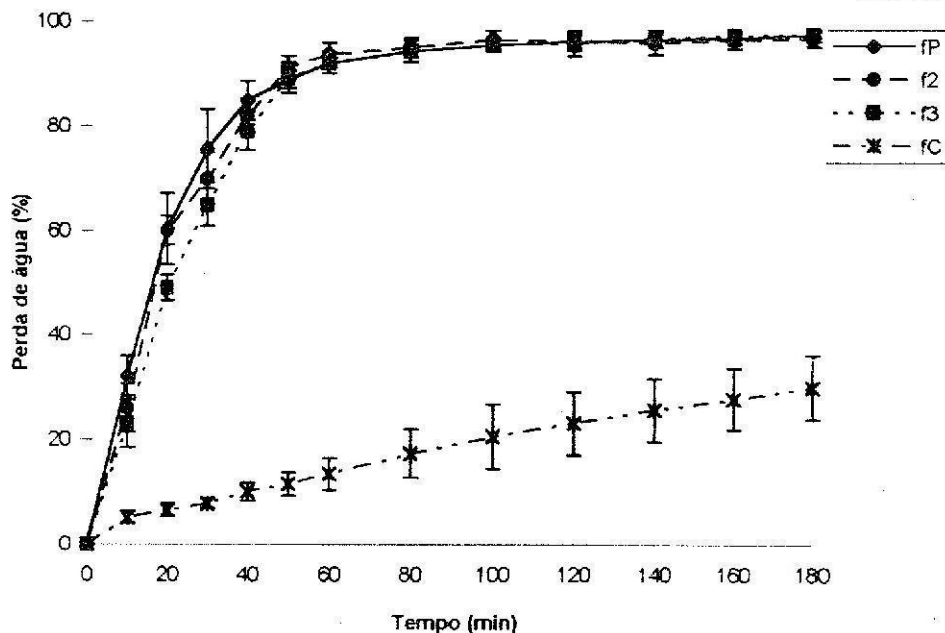


Figura 4.26. Variação da perda de água determinada por folha inteira em folhas persistentes (fP), folha dois (f2) e folha três (f3) de plantas de castanheiro com enraizamento ex vitro no final da aclimatização a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância e em folhas de plantas de campo micropropagadas (fC).

Nas plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ quando as determinações foram feitas em discos, os valores de percentagem de perda de água foram ligeiramente superiores aos determinados nos discos de folhas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O comportamento dos diferentes tipos de folhas não foi muito diferente entre si, apesar de se continuar a registar serem as folhas persistentes a perderem água de uma forma mais rápida, seguidas da folha dois e folha três (Fig. 4.27). Os valores de perda de água aos 20 minutos foram de 64,3% para os discos da folha três, 71,6% para os discos da folha dois e 72,5% para os discos das folhas persistentes. Ao fim de uma hora qualquer deste tipo de folha ultrapassava já os 90% de perda de água, enquanto os discos das folhas de campo ficavam pelos 48,8% (Fig. 4.27).

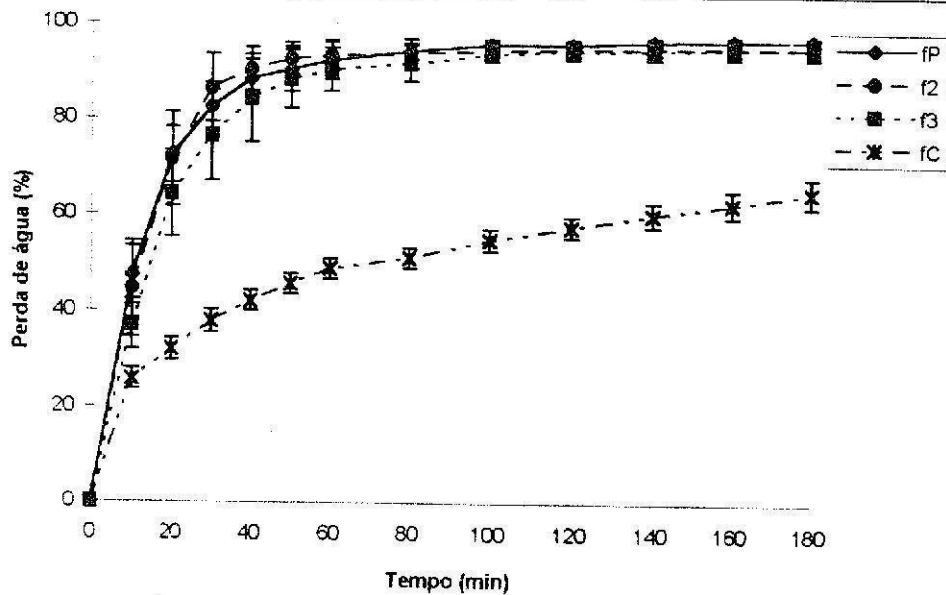


Figura 4.27. Variação da perda de água determinada por discos em folhas persistentes (fP), folha dois (f2) e folha três (f3) de plantas de castanheiro com enraizamento ex vitro no final da aclimatização a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância e em folhas de plantas de campo micropropagadas (fC).

Para o mesmo tratamento de aclimatização, quando a determinação da perda de água foi feita com as folhas intactas, registou-se um comportamento significativamente diferente (Fig. 4.28). Assim, verificou-se que a folha dois e folha três, apresentando comportamento idêntico entre si aos 20 minutos, com 39,7% e 38,4% de perda de água respectivamente, diferiam significativamente dos 63% de perda de água por parte das folhas persistentes (Fig. 4.28). No final da primeira hora de exposição ao ar, as folhas de campo apenas tinham perdido 13,4 % do seu conteúdo relativo em água.

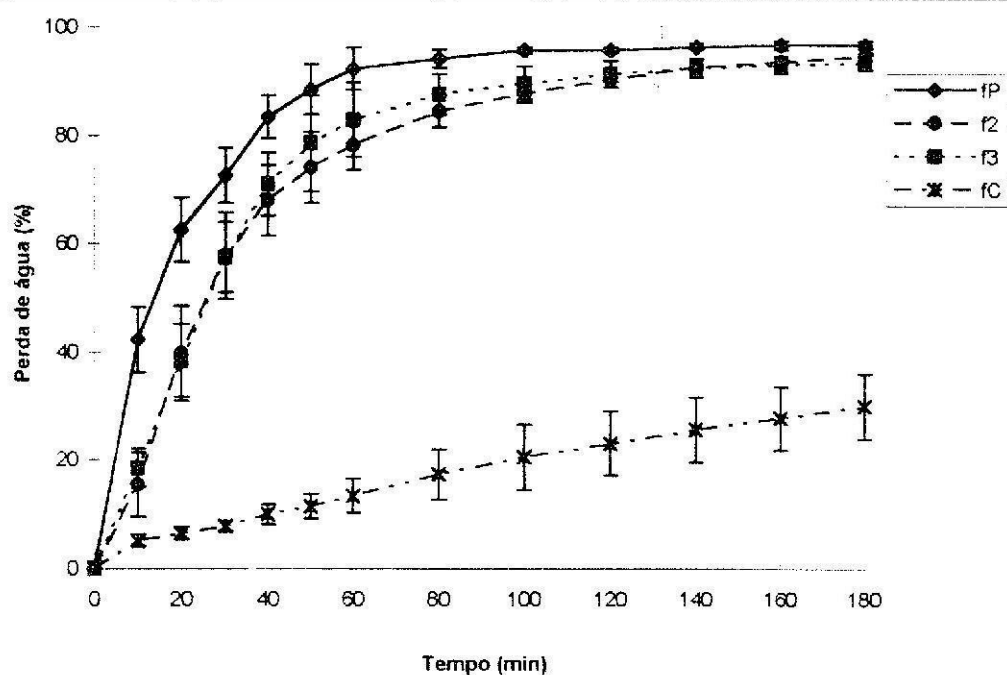


Figura 4.28. Variação da perda de água determinada por folha em folhas persistentes (fP), folha dois (f2) e folha três (f3) de plantas de castanheiro com enraizamento ex vitro no final da aclimatização a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância e em folhas de plantas de campo micropropagadas (fC).

3.4. Clorofilas

As concentrações em pigmentos clorofilinos, clorofila a (Cl_a), clorofila b (Cl_b) e clorofila total (Cl_{total}) foram determinados de acordo com o descrito no ponto 2.4 deste capítulo.

Os resultados dessas determinações são apresentados na Tabela 4.9, onde se avalia a influência dos dois factores, sistema de enraizamento e irradiância, e nas Figuras 4.29 a 4.32 onde se avalia, para cada um dos tratamentos de enraizamento, a influência da irradiância de aclimatização em cada um dos tipos de folhas comparativamente com os valores das folhas no dia zero ($fD0$) de aclimatização

Verificaram-se, para todos os parâmetros em análise (Cl_a , Cl_b , Cl_{total} e razão Cl_a/Cl_b) efeitos significativos, quer do tipo de sistema radicular que as plantas possuíam no

início da aclimatização quer da irradiância a que as plantas estiveram sujeitas durante a aclimatização, bem como uma interacção significativa entre estes dois factores (Tab. 4.9).

Tabela 4.9. Influência do tipo de desenvolvimento radicular e da intensidade da luz na concentração de Cl_a , Cl_b , Cl_{total} e razão Cl_a/Cl_b no final da fase de aclimatização em plantas de castanheiro micropropagadas.

Rizogénese	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Cl_a ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$)	Cl_b ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$)	Cl_{total} ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$)	Razão Cl_a/Cl_b
<i>In vitro</i>	150	7,74 a	3,50 a	11,24 a	2,70 b
	250	4,71 c	1,30 c	6,01 c	3,80 a
<i>Ex vitro</i>	150	4,50 c	1,43 c	5,94 c	3,50 a
	250	6,14 b	1,96 b	8,10 b	3,40 a

As plantas com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram as que apresentaram concentrações de Cl_a e Cl_b mais elevadas, no entanto, apresentaram uma razão entre Cl_a/Cl_b significativamente inferior às plantas dos restantes tratamentos; nas plantas com enraizamento *ex vitro*, contrariamente ao que se registou nas plantas com enraizamento *in vitro*, foram as plantas submetidas a maior irradiância ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) as que apresentaram concentrações de clorofilas mais elevadas (Tab. 4.9).

Na Tabela 4.10 estão indicadas as concentrações de Cl_a , Cl_b , Cl_{total} e razão Cl_a/Cl_b para as folhas de campo de plantas micropropagadas com um ano de idade, onde é possível observar uma razão Cl_a/Cl_b dentro dos valores apresentados pelas plantas no final da aclimatização, apresentando, no entanto, valores superiores de Cl_a , Cl_b , e Cl_{total} .

Tabela 4.10. Concentração de Cl_a , Cl_b , Cl_{total} e razão Cl_a/Cl_b em folhas de campo de plantas micropropagadas com 1 ano de idade. Os valores são médias \pm ep de 8 repetições.

Clorofila a ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$)	Clorofila b ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$)	Clorofila total ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$)	Razão Cl_a/Cl_b
$9,59 \pm 1,06$	$3,10 \pm 0,46$	$12,69 \pm 1,30$	$3,14 \pm 0,45$

A análise da influência da irradiância a que as microplantas estiveram sujeitas durante a fase de aclimatização, para cada um dos tipos de enraizamento, permite avaliar

mais em detalhe a variação das concentrações de clorofilas em cada um dos tipos de folhas, bem como a comparação dessas concentrações com o valor da folha do dia zero (*fD0*) de aclimatização.

Nas plantas com enraizamento *in vitro* registaram-se diferenças significativas na concentração de Cl_a , em função do tratamento (níveis de irradiância) e do tipo de folha analisado (Fig.4.29). O valor médio mais elevado foi registado nas folhas persistentes e folha um, com $9\pm 0,5$ e $9,2\pm 0,5$ $\text{mg g}^{-1}\text{ps}$ respectivamente, diferindo de forma significativa das restantes. Quando comparamos a concentração de Cl_a nas folhas do dia zero, verificamos que esta difere significativamente das folhas persistentes das plantas aclimatizadas a 150 e 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.29A).

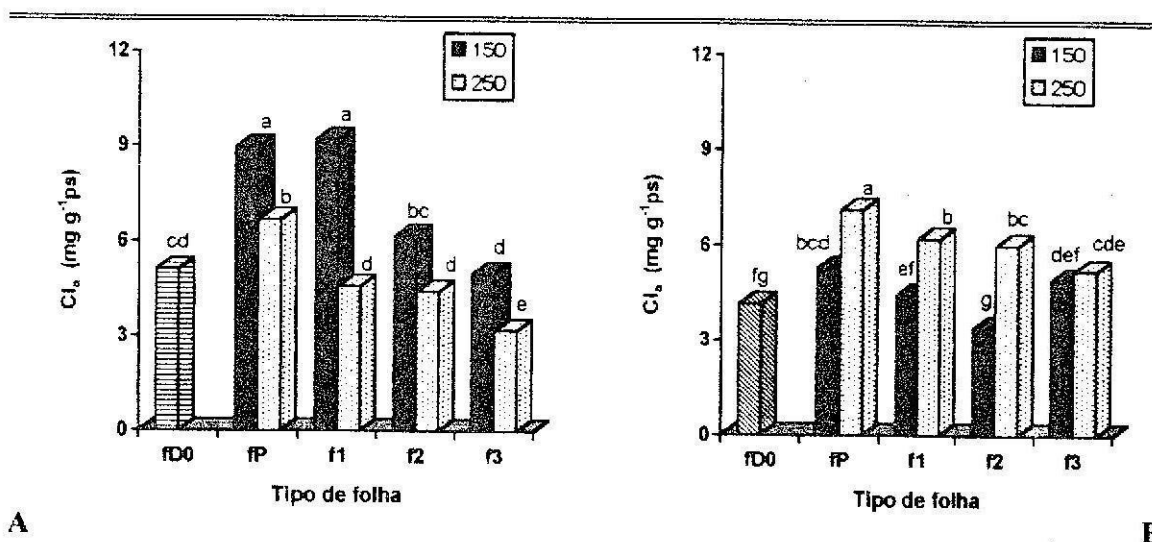


Figura 4.29. Efeito da intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a fase de aclimatização de plantas de castanheiro micropropagadas, nas concentrações de clorofila a (Cl_a), para cada um dos tipos de folha analisada e folha do dia zero (*fD0*). (A) Plantas com sistema radicular desenvolvido *in vitro*. (B) Plantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro*.

Nas plantas com enraizamento *ex vitro* são as folhas das plantas que estiveram sujeitas à maior irradiância durante a aclimatização que apresentam as concentrações de Cl_a mais elevadas, contrariamente ao que havia sido registado com as plantas aclimatizadas a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.29B). O valor mais elevado foi registado nas folhas persistentes das plantas aclimatizadas a 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com $7,1\pm 0,4$ $\text{mg g}^{-1}\text{ps}$, e o valor mais baixo registado na folha dois das plantas aclimatizadas sob a irradiância de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com

$3,4 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}\text{ps}$. Quando comparamos a concentração de Cl_a nas folhas do dia zero verificamos que esta difere significativamente das folhas persistentes (Fig. 4.29B).

As concentrações de Cl_b apresentaram um padrão de variação em tudo semelhante ao registado para as concentrações de Cl_a . Assim, nas plantas com enraizamento *in vitro* registaram-se valores mais elevados nas folhas das plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ comparativamente às aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, com os valores mais elevados a serem registados também nas folhas persistentes e folha um, sem diferença significativa entre si (Fig. 4.30A). A concentração na folha do dia zero não mostrou diferença significativa para a concentração das folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mas já as folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ apresentaram um acréscimo significativo no teor de Cl_b . Nas plantas com enraizamento *ex vitro* foram as folhas das plantas sujeitas à maior irradiância durante a aclimatização as que apresentaram valores de Cl_b mais elevados, com valores máximos a serem registados para as folhas persistentes, folha um e folha dois, sem diferença significativa entre si (Fig. 4.30B).

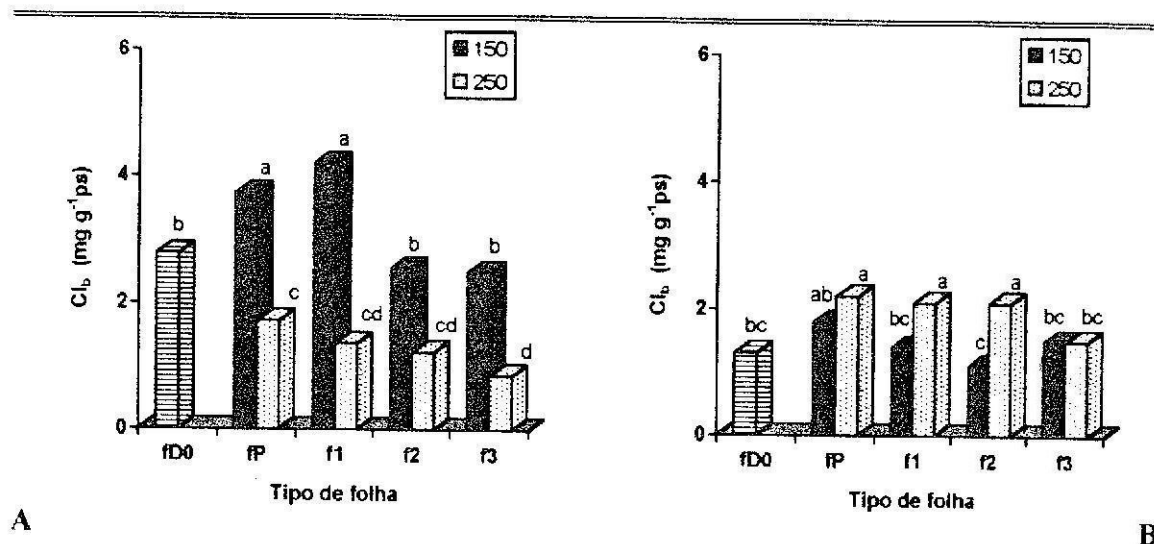


Figura 4.30. Efeito da intensidade de luz durante ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) durante a fase de aclimatização de plantas de castanheiro micropropagadas na concentração de clorofila b (Cl_b) para cada um dos tipos de folhas analisadas e folha do dia zero (fD0). (A) Plantas com sistema radicular desenvolvido *in vitro*. (B) Plantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro*.

As folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mostraram um acréscimo significativo no teor de Cl_b , comparativamente com as folhas do dia zero, o mesmo já não acontecendo com as folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.30B).

A concentração de clorofila total reflecte, conseqüentemente, o padrão de variação conjunto das concentrações de Cl_a e Cl_b em função do tratamento (níveis de intensidade luminosa) e do tipo de folha analisado. Em relação ao tipo de folha, o valor médio mais elevado foi registado nas folhas persistentes e folha um das plantas com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com $12,7 \pm 0,5$ e $13,4 \pm 0,9 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$ respectivamente, diferindo de forma significativa das restantes (Fig. 4.31A). Nas plantas com enraizamento *ex vitro*, os valores mais elevados foram registados nas folhas persistentes, folha um e folha dois das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com $9,3 \pm 0,3$, $8,2 \pm 0,8$ e $8,2 \pm 0,4 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$ respectivamente (Fig. 4.31B).

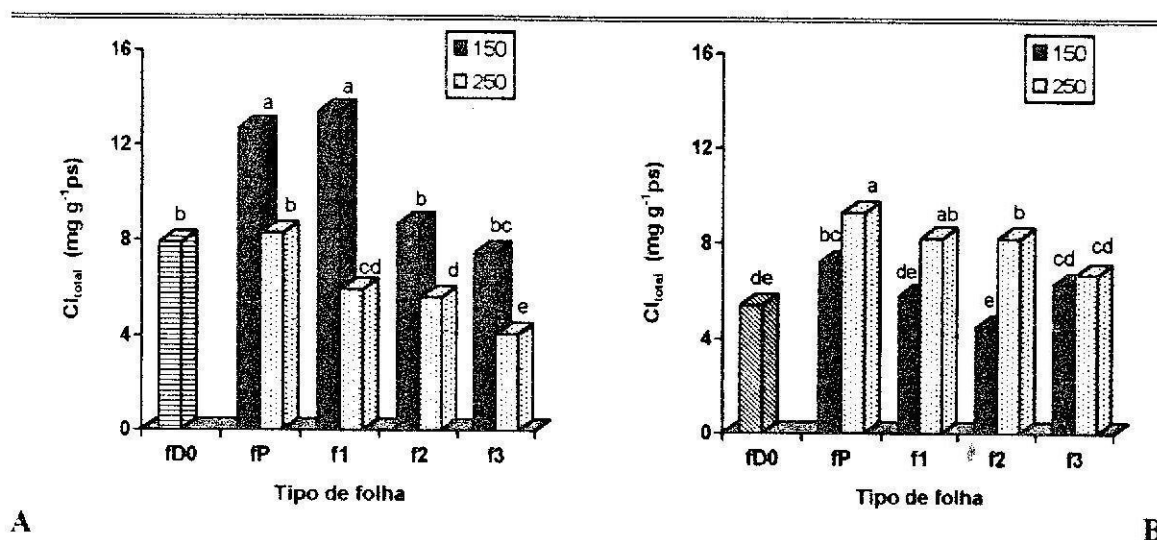


Figura 4.31. Efeito da intensidade de luz durante a fase de aclimação na concentração de clorofila total (Cl_{total}) para cada um dos tipos de folhas analisadas e folha do dia zero (fD0). (A) Plantas com sistema radicular desenvolvido *in vitro*. (B) Plantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro*.

Na razão Cl_a/Cl_b das plantas com enraizamento *in vitro* em função dos níveis de intensidade luminosa, registaram-se valores mais elevados nas folhas que estiveram sujeitas a maior irradiância durante a aclimação, com valores entre $3,6 \pm 0,2$ e $3,9 \pm 0,1$ (Fig. 4.32A).

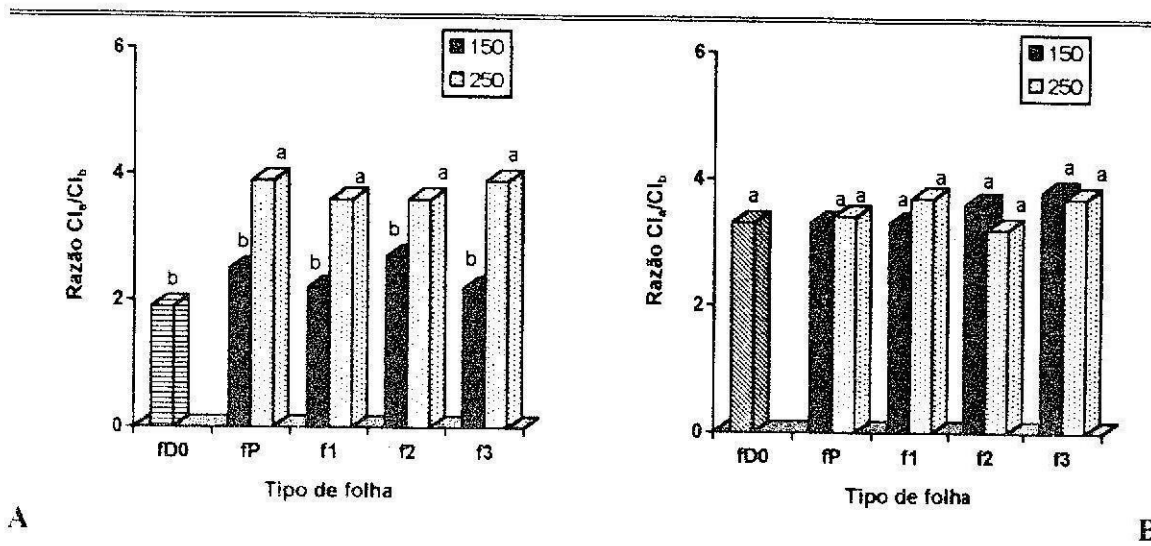


Figura 4.32. Efeito da intensidade de luz durante a fase de aclimatização na razão entre concentrações de clorofila a e b (Cl_a/Cl_b) para cada um dos tipos de folha analisada e folha do dia zero (fD0). (A) Plantas com sistema radicular desenvolvido in vitro. (B) Plantas com sistema radicular desenvolvido ex vitro.

Nas plantas com enraizamento *ex vitro* os valores da razão entre Cl_a/Cl_b não mostraram qualquer diferença significativa em função do tipo de folha analisada, tendo os valores oscilado entre os $3,2 \pm 0,2$ para a folha dois das plantas que foram aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e os $3,8 \pm 0,4$ para a folha três das plantas que foram aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Verifica-se também que as folhas do dia zero apresentavam já uma razão em tudo idêntica à das folhas no final da fase de aclimatização (Fig. 4.32B).

3.5. Fotossíntese

3.5.1. Taxa de fotossíntese aparente, transpiração e condutância estomática

Os valores da taxa de fotossíntese aparente (A), de transpiração (E) e condutância estomática (G), foram determinados em folhas de campo de plantas micropropagadas com um ano (fC), na folha dois (f2) e folha três (f3) de plantas de castanheiro micropropagadas com sistema radicular desenvolvido *in vitro*, e em folhas persistentes (fP), folha um (f1),

folha dois (*f2*) e folha três (*f3*) de plantas de castanheiro micropropagadas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro*, após os dois tratamentos de aclimatização, com irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.1).

Na Tabela 4.11 estão indicados os resultados obtidos na taxa de fotossíntese aparente, transpiração e condutância estomática, para as microplantas de cada um dos tipos de tratamentos no final da fase de aclimatização, utilizando apenas os resultados quantificados na folha dois (*f2*) e folha três (*f3*) uma vez que estes tipos de folhas foram comuns a todos os grupos de plantas.

Tabela 4.11. Influência do tipo de sistema radicular e densidade de fluxo fótonico de cada um dos tratamentos de aclimatização na taxa de fotossíntese aparente (A), taxa de transpiração (E) e condutância estomática (G), em plantas de castanheiro micropropagadas, quantificados na folha dois e três dos respectivos tratamentos, no final da fase de aclimatização.

Rizogénese	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	G ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
<i>In vitro</i>	150	3,49 ab	2,09 b	80,47 b
	250	3,81 a	3,08 a	106,93 a
<i>Ex vitro</i>	150	3,23 b	1,82 bc	78,13 b
	250	3,25 b	1,72 c	79,35 b

Para qualquer dos referidos parâmetros, verificou-se que as diferenças significativas que se registaram se ficaram a dever, exclusivamente, ao factor rizogénese, isto é tipo de sistema radicular que as plantas possuíam no início do processo de aclimatização, não tendo o nível de irradiância influenciado os referidos parâmetros. O valor da taxa de fotossíntese aparente mais elevado foi registado nas plantas com raízes *in vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com $3,81 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sem diferença significativa para as plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mas significativamente diferente das plantas com raízes *ex vitro* (Tab. 4.11). Aquele grupo de plantas apresentou, também, os valores mais elevados para a taxa de transpiração (*E*), com $3,08 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e condutância estomática (*G*), com $106,9 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

De referir ainda que para a taxa de transpiração e condutância estomática se registaram interacções significativas entre o tipo de tratamento de rizogénese e o regime de luz a que as plantas estiveram sujeitas durante a fase de aclimatização, dando assim a

indicação de que estes parâmetros variam consoante a combinação destes factores entre si (Tab. 4.11).

A análise do comportamento dos diferentes tipos de folhas quantificadas neste estudo, feita nas microplantas com enraizamento *ex vitro*, torna possível avaliar o contributo parcial de cada um desses tipos de folhas comparativamente com as folhas de plantas de campo (*fC*) (Fig. 4.32). Assim, são patentes as baixas taxas de fotossíntese aparente que as folhas persistentes apresentam, independentemente do tratamento luminoso a que as plantas estiveram sujeitas durante a aclimatização, com valores de $1 \pm 0,09$ e $0,75 \pm 0,09 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectivamente para as plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 4.33A). É também visível o gradual acréscimo de taxa de fotossíntese na sequência de diferenciação foliar, entre folha um, dois e três, quer no caso das plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, quer nas plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 4.33A). De referir que na folha três das plantas do tratamento com maior irradiância se verificou um valor de taxa de fotossíntese aparente ligeiramente superior, sem diferença significativa, ao apresentado pela folha três do grupo de plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A taxa de fotossíntese aparente para as folhas de campo foi de $4,5 \pm 0,2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As taxas de transpiração apresentaram comportamento semelhante em todos os tipos de folhas analisados, com valores ligeiramente superiores nas folhas um e folha dois das plantas sujeitas a uma irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, com as folhas três das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a apresentarem um valor mais elevado em relação à folha três das plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 4.33B). Também neste parâmetro o valor mais elevado foi registado nas folhas das plantas de campo, com $2,5 \pm 0,3 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

A condutância estomática apresenta também um padrão de flutuação bastante restrito (entre $70 \pm 4,7 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para a folha um das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $92 \pm 14,7 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para as folhas persistentes do mesmo tratamento), com um padrão de variação entre folhas das plantas dos dois tratamentos em tudo idêntico ao verificado com o das taxas de transpiração (Fig. 4.33C).

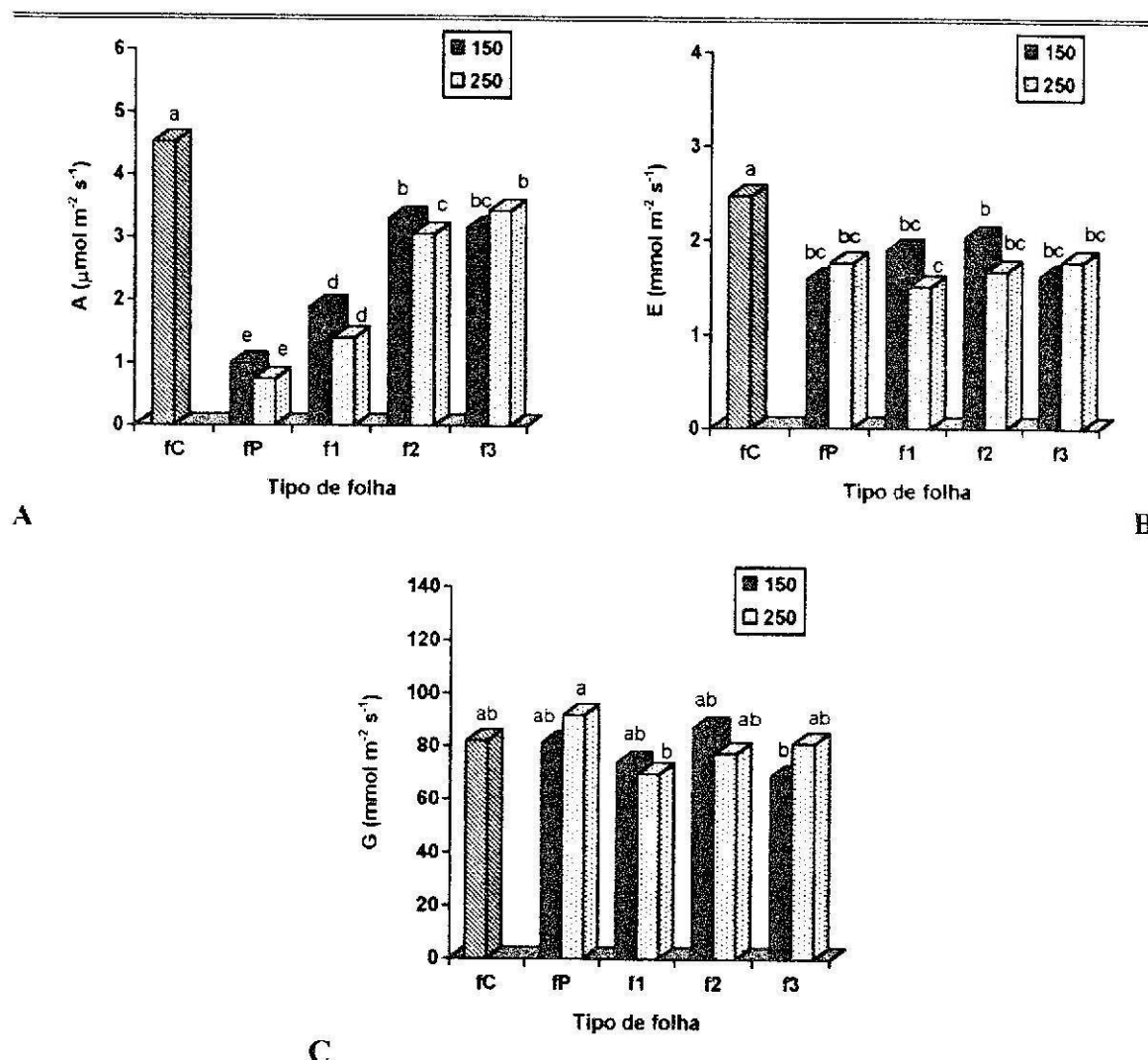


Figura 4.33. Efeito da intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a fase de aclimatização na taxa de fotossíntese aparente A (A), taxa de transpiração E (B) e condutância estomática G (C) em plantas de castanheiro micropropagadas com enraizamento ex vitro, medidas em folhas persistentes (fP), folha um (f1), folha dois (f2), folha três (f3) e folhas de campo de plantas micropropagadas (fC).

3.5.2. Curvas de resposta à luz e capacidade fotossintética

As curvas de resposta à luz foram calculadas nas folhas de plantas de campo (fC), nas folhas persistentes (fP), na folha dois (f2) e folha três (f3) das plantas de castanheiro com os dois tipos de sistema radicular, *in vitro* e *ex vitro* e aclimatizadas sob os dois níveis de irradiância, 150 e 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.1).

As curvas de resposta da taxa de fotossíntese em função da densidade de fluxo fotônico (PPFD), medida a CO₂ saturante, apresentadas nas Figuras 4.34 a 4.38, mostram uma adaptação gradual do aparelho fotossintético das plantas micropropagadas às condições *in vivo*, à medida que se vai assistindo ao desenvolvimento de novas folhas durante o processo de aclimatização.

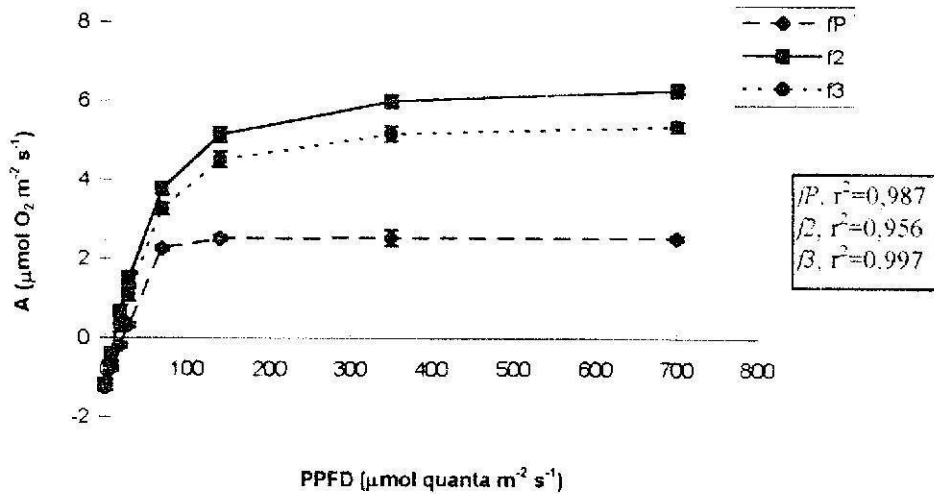


Figura 4.34. Curvas de resposta à irradiância da taxa de liberação de O₂, medida a 25 °C e CO₂ saturante, em discos foliares dos diferentes tipos de folhas analisadas (fP, f2 e f3), de plantas de castanheiro com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas a 150 µmol m⁻² s⁻¹, após 4 semanas de aclimatização. Os valores representam médias ± erro padrão de três repetições

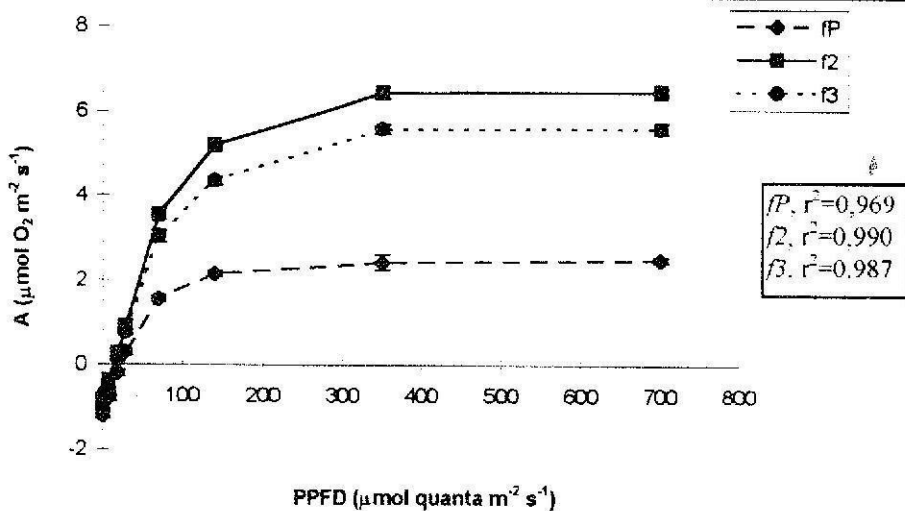


Figura 4.35. Curvas de resposta à irradiância da taxa de liberação de O₂, medida a 25 °C e CO₂ saturante, em discos foliares dos diferentes tipos de folhas analisadas (fP, f2 e f3), de plantas de castanheiro com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas a 250 µmol m⁻² s⁻¹, após 4 semanas de aclimatização. Os valores representam médias ± erro padrão de três repetições

De facto, é notória a reduzida capacidade fotossintética das folhas persistentes para qualquer dos tratamentos, não só em termos da rápida saturação, que é atingida a baixos níveis de PPFD a que se submeteram, $\pm 100 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, como também do valor de A_{max} que apresentaram, não ultrapassando $3,93 \pm 0,15 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtido nas folhas das plantas com raízes *ex vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tab. 4.12).

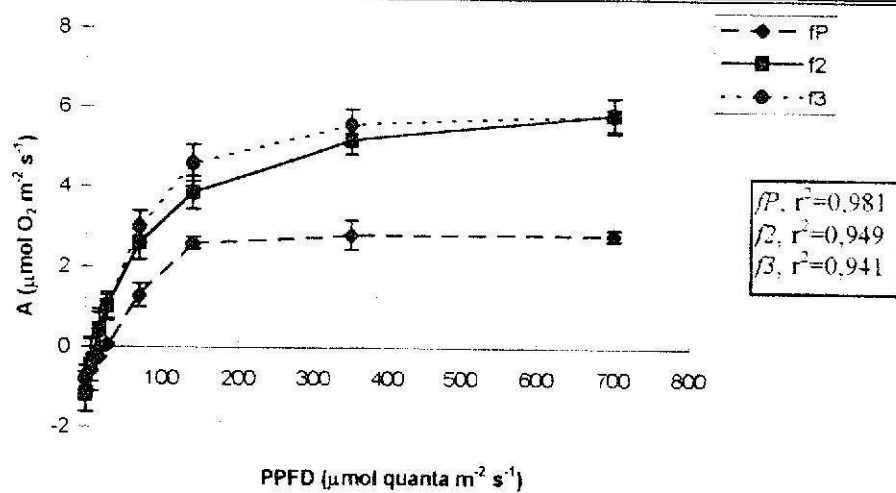


Figura 4.36. Curvas de resposta à irradiância da taxa de libertação de O_2 , medida a 25°C e CO_2 saturante, em discos foliares dos diferentes tipos de folhas analisadas (f1, f2 e f3), de plantas de castanheiro com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, após 4 semanas de aclimatização. Os valores representam média \pm erro padrão de três repetições

No caso das folhas dois e três, a saturação da fotossíntese na taxa na libertação de O_2 verifica-se a níveis de irradiância mais elevados, entre 300 e 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As curvas de resposta à luz das folhas dois e três apresentaram um padrão de comportamento muito semelhante, independentemente dos tratamentos, tendo a folha dois apresentado sempre valores superiores ao da folha três, com excepção das plantas com raízes *ex vitro* e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nas irradiâncias intermédias (Fig. 4.36). Vale a pena referir que a folha dois tem, pelo menos, mais uma semana de desenvolvimento comparativamente à folha três. Verifica-se também que nas plantas com o sistema radicular desenvolvido em substrato natural, *ex vitro*, há uma certa tendência de aproximação das curvas de resposta entre estes dois tipos de folhas, de tal forma que os intervalos de confiança se sobrepõem entre si, deixando assim de haver diferenças significativas (Fig. 4.36 e 4.37), o que não aconteceu com as microplantas com

enraizamento *in vitro* (Fig. 4.34 e 4.35). A curva de resposta das folhas de campo de plantas micropropagadas revela a maior capacidade fotossintética destas folhas, atingindo o ponto de saturação para intensidades de luz entre os 800 e 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.38) e com valor de A_{max} de 19,85 $\mu\text{mol O}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tab. 4.13).

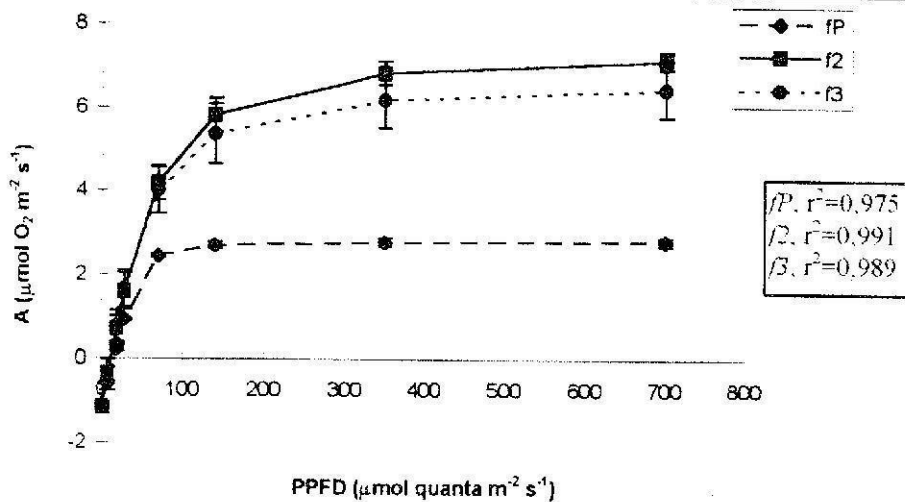


Figura 4.37. Curvas de resposta à irradiância da taxa de liberação de O_2 , medida a 25 °C e CO_2 saturante, em discos foliares dos diferentes tipos de folhas analisadas (f1, f2 e f3), de plantas de castanheiro com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, após 4 semanas de aclimatização. Os valores representam média \pm erro padrão de três repetições.

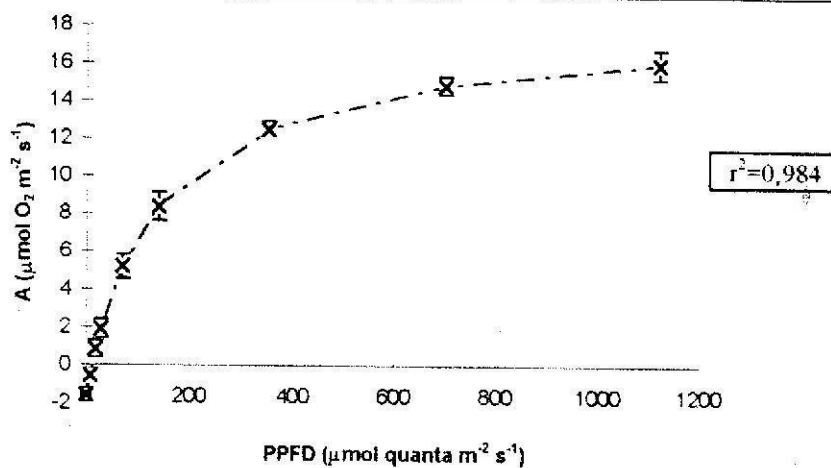


Figura 4.38. Curva de resposta à irradiância, da taxa de liberação de O_2 , medida a 25 °C e CO_2 saturante, em discos foliares de folhas de campo (fC), de plantas de castanheiro micropropagadas com um ano. Os valores representam média \pm erro padrão de três repetições.

Estes aspectos são apoiados pela análise dos valores estimados para as taxas de fotossíntese a luz saturante (A_{max}), calculados com base no ajustamento de uma função de regressão não linear, anteriormente descrita, às curvas de resposta à densidade de fluxo fotónico fotossinteticamente activo (PPFD), para os diferentes tipos de folhas em cada um dos tratamentos (Tab. 4.12). As folhas persistentes apresentam entre si valores muito semelhantes, variando entre $3,66 \pm 0,12$ e $3,93 \pm 0,15 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e muito inferiores aos que se registaram na folha dois e folha três (entre $7,4 \pm 0,17$ e $8,6 \pm 0,247 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $6,4 \pm 0,17$ e $7,9 \pm 0,23 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectivamente), com diferenciação e expansão já em condições de aclimatização. As folhas dois apresentaram sempre valores superiores aos registados nas folhas três, independentemente do tipo de tratamento, o que não será de estranhar face à diferença de tempo de desenvolvimento para com a folha dois. De referir ainda que as plantas com raízes formadas *ex vitro* apresentaram uma melhor capacidade fotossintética, independentemente do tipo de folha, comparativamente às microplantas com raízes formadas *in vitro*, o que indicia a importância do sistema radicular que cada um dos grupos possuía no início da aclimatização ou também o facto de estas plantas terem já iniciado o seu processo de autotrofia em simultâneo com o desenvolvimento do sistema radicular.

Tabela 4.12. Valores da taxa de fotossíntese a luz saturante, A_{max} ($\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), para as folhas persistentes (fP), folha um (f1) e folha dois (f2) no final dos diferentes tratamentos de aclimatização de plantas de castanheiro micropropagadas.

Rizogénese	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	fP	f2	f3
<i>In vitro</i>	150	$3,68 \pm 0,10$	$7,72 \pm 0,47$	$6,76 \pm 0,11$
	250	$3,78 \pm 0,18$	$7,40 \pm 0,17$	$6,37 \pm 0,17$
<i>Ex vitro</i>	150	$3,66 \pm 0,12$	$7,87 \pm 0,64$	$6,84 \pm 0,50$
	250	$3,93 \pm 0,15$	$8,56 \pm 0,24$	$7,87 \pm 0,23$

Em relação àquele grupo de plantas é visível a sua melhor capacidade de resposta face a níveis de irradiância mais elevados, tendo as folhas das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecido o valor de A_{max} mais elevado ($8,56 \pm 0,24 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Comparativamente ao valor quantificado para as folhas de campo verificamos que aqueles

valores de A_{max} , independentemente do tipo de folha e tratamento, são inferiores na ordem dos 50%.

Tabela 4.13. Valores da taxa de fotossíntese aparente (A), taxa máxima de fotossíntese, (A_{max}), rendimento quântico aparente (ϕ) e ponto de compensação para a luz (I_0) para as folhas de campo de plantas micropropagadas (fC).

Folha	A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	A_{max} ($\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	ϕ ($\mu\text{mol O}_2/\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	I_0 ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
fC	4,52	19,85	0,083	11,63

3.5.3. Rendimento quântico

Os valores do rendimento quântico (\pm ep), dados pelo valor do declive da recta de regressão na fase linear entre a taxa fotossintética e a densidade do fluxo fotónico, e que traduzem, como atrás referimos, a eficiência da conversão de energia luminosa em energia química na fotossíntese, estão referidos na Tabela 4.14, conjuntamente com as respectivas equações de regressão e nível de ajustamento. Estes valores traduzem a menor eficiência fotoquímica das folhas persistentes, comparativamente à folha dois e folha três (cerca de 50% menos), independentemente do tratamento, tendo no entanto as folhas persistentes das plantas com raízes *in vitro* apresentado valores superiores para a menor intensidade de luz. Nas plantas com raízes *ex vitro* foi a maior intensidade de luz a promover um melhor rendimento quântico (Tab. 4.14).

A eficiência fotoquímica das folhas dois e três, determinada para cada um dos tratamentos, apresentou valores muito semelhantes, o que traduz mais uma vez a rápida adaptação fisiológica das folhas três, apesar de um menor tempo de diferenciação, comparativamente ao das folhas dois. Tal como se tinha verificado para a A_{max} , o rendimento quântico das plantas com raízes *in vitro* é maior nas plantas sujeitas ao tratamento de menor irradiância ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); no caso das plantas com raízes *ex vitro* o rendimento quântico é significativamente superior nas plantas que estiveram submetidas à maior irradiância ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Tab. 4.14).

Tabela 4.14. Valores do rendimento quântico aparente, ϕ ($\mu\text{mol O}_2 / \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para as folhas persistentes (fP), folha dois (f2) e folha três (f3), no final dos tratamentos de aclimatização de plantas de castanheiro micropropagadas, respectivas equações das rectas de regressão linear e coeficientes de correlação.

Rizogénese	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	fP	f2	f3
<i>In vitro</i>	150	0,048 \pm 0,002 $y = -1,0988 + 0,0485x$ $r^2 = 0,97$	0,064 \pm 0,009 $y = 0,7594 + 0,0644x$ $r^2 = 0,78$	0,065 \pm 0,002 $y = -1,0072 + 0,0649x$ $r^2 = 0,99$
	250	0,035 \pm 0,003 $y = -0,9595 + 0,0346x$ $r^2 = 0,86$	0,063 \pm 0,004 $y = -0,9040 + 0,0630x$ $r^2 = 0,94$	0,053 \pm 0,004 $y = -0,7493 + 0,0535x$ $r^2 = 0,92$
<i>Ex vitro</i>	150	0,030 \pm 0,002 $y = -0,8038 + 0,0298x$ $r^2 = 0,91$	0,047 \pm 0,005 $y = -0,6908 + 0,0466x$ $r^2 = 0,84$	0,048 \pm 0,005 $y = -0,5815 + 0,0484x$ $r^2 = 0,84$
	250	0,048 \pm 0,004 $y = -0,8215 + 0,0480x$ $r^2 = 0,90$	0,071 \pm 0,005 $y = -0,7986 + 0,0712x$ $r^2 = 0,94$	0,070 \pm 0,005 $y = -0,7807 + 0,0705x$ $r^2 = 0,93$

Os valores de maior eficiência fotoquímica foram registados nas folhas dois e folhas três das plantas com raízes *ex vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($0,071 \pm 0,005$ e $0,070 \pm 0,005 \mu\text{mol O}_2 / \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente). As folhas de campo das plantas micropropagadas apresentaram rendimento quântico superior comparativamente à folha dois e três, tendo sido registado o valor de $0,083 \mu\text{mol O}_2 / \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tab. 4.13).

3.5.4. Ponto de compensação para a luz

Os valores do ponto de compensação para a luz estão apresentados na Tabela 4.15. Este parâmetro, que traduz o valor da irradiância para o qual a quantidade de CO_2 fixada iguala a que é libertada pela actividade respiratória, apresenta uma tendência de diminuição gradual das folhas persistentes para a folha três, de valores que vão desde os

22,7 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ das folhas persistentes das plantas com raízes *in vitro* e aclimatizadas a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para as 11,1 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ da folha três das plantas com raízes *ex vitro* e aclimatizadas a 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ traduzindo assim a maior capacidade de aproveitamento da radiação luminosa por parte destas folhas (Tab. 4.15).

Tabela 4.15. Valores do ponto de compensação para a luz, I_o ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para as folhas persistentes (P), folha dois (f2) e folha três (f3) no final dos diferentes tratamentos de aclimação em plantas de castanheiro micropropagadas.

Rizogénese	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	P	f2	f3
<i>In vitro</i>	150	22,7	11,8	15,5
	250	27,7	14,4	14,0
<i>Ex vitro</i>	150	27,0	14,8	12,0
	250	17,1	11,2	11,1

A expressão da taxa de libertação de oxigénio por mg de clorofila por unidade de tempo ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg clorofila}^{-1} \text{ h}^{-1}$) permite verificar de que forma a quantidade de clorofila total pode influenciar a função fotossintética das microplantas. Assim, constata-se que, apesar de terem sido as folhas persistentes a apresentarem o valor de clorofila total mais elevado (Fig. 4.31) não é por esse facto que apresentam as taxas de fotossíntese mais elevadas (Fig. 4.39). O valor utilizado para estas determinações foi a taxa de O_2 libertado sob uma irradiância de 350 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nas plantas com raízes *in vitro* e aclimatizadas a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a folha dois e folha três apresentaram sempre valores superiores em relação às folhas das plantas aclimatizadas a 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mas sem diferença significativa entre si (Fig. 4.39A), já nas plantas com raízes *ex vitro*, a folha três das plantas aclimatizadas a 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentou uma taxa de libertação de O_2 superior às plantas aclimatizadas a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, também sem diferença significativa (Fig. 4.39B).

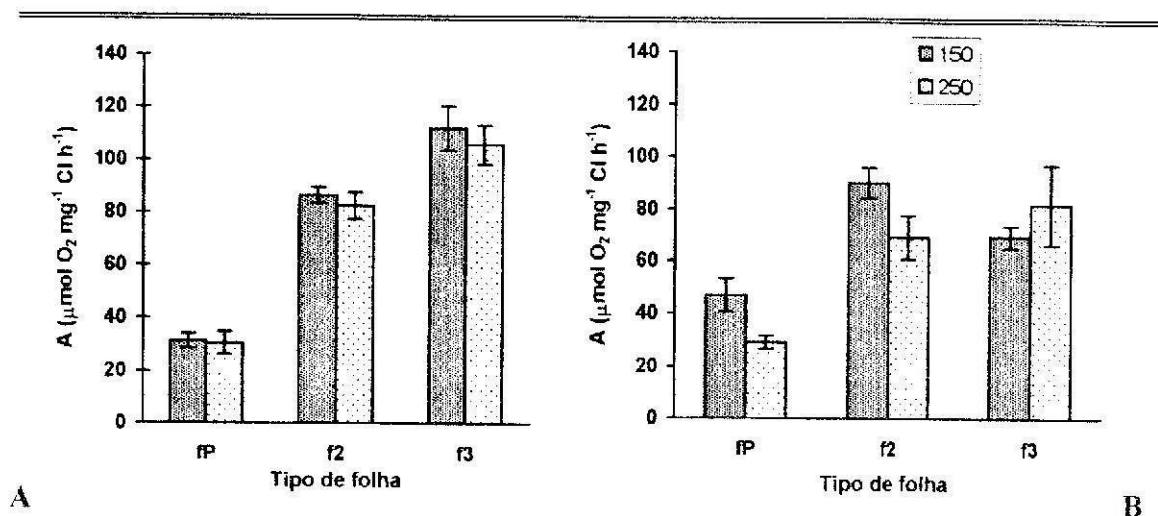


Figura 4.39. Taxa fotossintética a PPFD de $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em folhas persistentes (fP), dois (f2) e três (f3) de plantas de castanheiro micropropagadas no final da aclimatização. (A) Plantas com sistema radicular formado *in vitro*. (B) Plantas com o sistema radicular formado *ex vitro*. (médias de $n=3 \pm e.p.$).

3.6. Parâmetros bioquímicos

3.6.1. Hidratos de carbono solúveis e amido

As concentrações em hidratos de carbono solúveis e amido, foram quantificadas de acordo com o descrito no ponto 2.6.1 deste capítulo.

Os resultados dessas quantificações são apresentados na Tabela 4.16 onde se avalia a influência dos dois factores em estudo, sistema de enraizamento e intensidade de luz durante a aclimatização e nas Figuras 4.40 a 4.43 onde se avalia, para cada um dos tratamentos de enraizamento independentemente, *in vitro* e *ex vitro*, a influência da irradiância de aclimatização em cada um dos tipos de folhas analisadas comparativamente com os valores quantificados para as folhas do dia zero de aclimatização (fD0).

As plantas com o sistema radicular desenvolvido *ex vitro* apresentaram, no final da fase de aclimatização, as concentrações de glucose+frutose mais elevadas, independentemente da irradiância a que estiveram sujeitas (Tab. 4.16). Nas plantas com enraizamento *in vitro*, o nível de irradiância também não originou diferenças significativas

(Tab. 4.16). As plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram também o valor mais alto para a concentração de sacarose, diferindo significativamente das restantes. Já em relação às concentrações de amido, registou-se um efeito positivo da irradiância mais elevada, independentemente do tipo de sistema radicular que as plantas apresentavam no início da aclimatização. A razão entre hidratos de carbono solúveis e amido mostrou de novo ser significativamente favorecida para as plantas com enraizamento *ex vitro*, independentemente da irradiância, contrariamente às plantas com enraizamento *in vitro*, onde se verificou um decréscimo significativo nas plantas aclimatizadas sob a maior irradiância (Tab. 4.16).

Tabela 4.16. Influência da intensidade da luz e do tipo de desenvolvimento radicular em plantas de castanheiro micropropagadas, na concentração de hidratos de carbono solúveis, glucose + frutose e sacarose, amido e razão solúveis / amido, no final da fase de aclimatização.

Rizogénese	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Gluc + Frut ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{ps}$)	Sacarose ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{ps}$)	Amido ($\mu\text{mol gluc g}^{-1}\text{ps}$)	Razão solúveis/amido
<i>In vitro</i>	150	331,36 b	137,78 b	172,66 bc	3,40 b
	250	292,59 b	151,95 b	215,80 a	2,51 c
<i>Ex vitro</i>	150	556,19 a	138,65 b	154,94 c	4,53 a
	250	556,41 a	229,70 a	192,89 ab	4,77 a

Na Tabela 4.17 estão indicadas as concentrações de hidratos de carbono solúveis, glucose + frutose e sacarose, de amido e a razão entre as concentrações de hidratos de carbono solúveis e insolúveis para as folhas de campo, e se os valores absolutos para cada uma das substâncias são muito mais elevados, comparativamente às concentrações quantificadas nas plantas no final da fase de aclimatização, já a razão entre solúveis e insolúveis se encontra dentro dos valores registados para o mesmo tipo de plantas.

Tabela 4.17. Concentração de hidratos de carbono solúveis, glucose + frutose e sacarose, amido e razão solúveis / amido em folhas de campo de plantas micropropagadas ($n=8 \pm ep$).

Gluc + Frut ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{ps}$)	Sacarose ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{ps}$)	Amido ($\mu\text{mol gluc g}^{-1}\text{ps}$)	Razão solúveis/amido
$1360,8 \pm 174,0$	$377,8 \pm 52,9$	$555,2 \pm 77,2$	$3,2 \pm 0,7$

A análise da influência da irradiância a que as microplantas estiveram sujeitas durante a fase de aclimação para cada um dos tipos de enraizamento, permite avaliar mais em detalhe a variação das concentrações de hidratos de carbono em cada um dos tipos de folhas, bem como a comparação dessas concentrações com o valor das folhas no dia zero de aclimação (*fD0*).

Registaram-se diferenças significativas na concentração dos hidratos de carbono solúveis, glucose + frutose, em função do tipo de sistema radicular que as microplantas apresentavam no início da aclimação, dos níveis de intensidade luminosa e do tipo de folha analisado. O valor mais elevado nas plantas com enraizamento *in vitro* foi registado nas folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com uma concentração de $409,4 \pm 40,6 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}$, não diferindo significativamente da concentração da folha dois das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.40A).

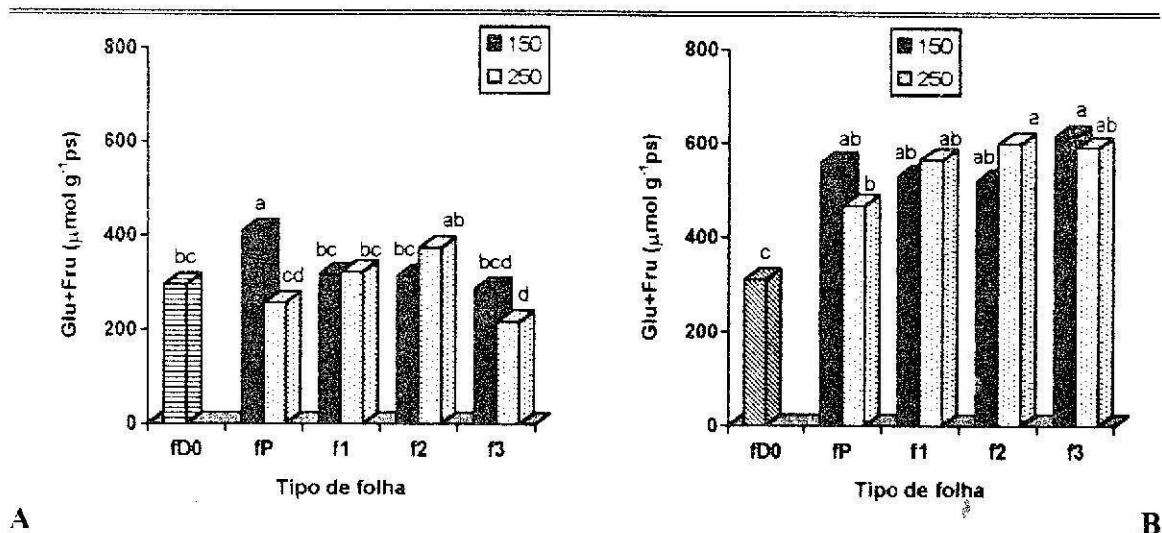


Figura 4.40. Efeito da intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a fase de aclimação em plantas de castanheiro micropropagadas nas concentrações de glucose + frutose para cada um dos tipos de folhas analisadas e folhas do dia zero (*fD0*). (A) Plantas com sistema radicular desenvolvido *in vitro*. (B) Plantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro*.

Quando comparamos a concentração de glucose+frutose nas folhas do dia zero de aclimação (*fD0*), verificamos que estas apresentam um valor significativamente inferior em relação às folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mas não em relação às folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.40A).

Nas plantas com enraizamento *ex vitro*, a concentração de glucose+frutose registou o seu valor máximo na folha três das plantas aclimatizadas sob a menor irradiância, embora sem diferença significativa das folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, folha um e folha dois das plantas aclimatizadas sob ambos os níveis de irradiância (Fig. 4.40B). Verificou-se ainda que as folhas persistentes registaram acréscimos significativos relativamente às concentrações de glucose+frutose apresentados pelas folhas no dia zero de aclimatização.

As variações nas concentrações de sacarose apresentaram-se relativamente semelhantes às descritas para as concentrações de glucose+frutose (Fig. 4.41).

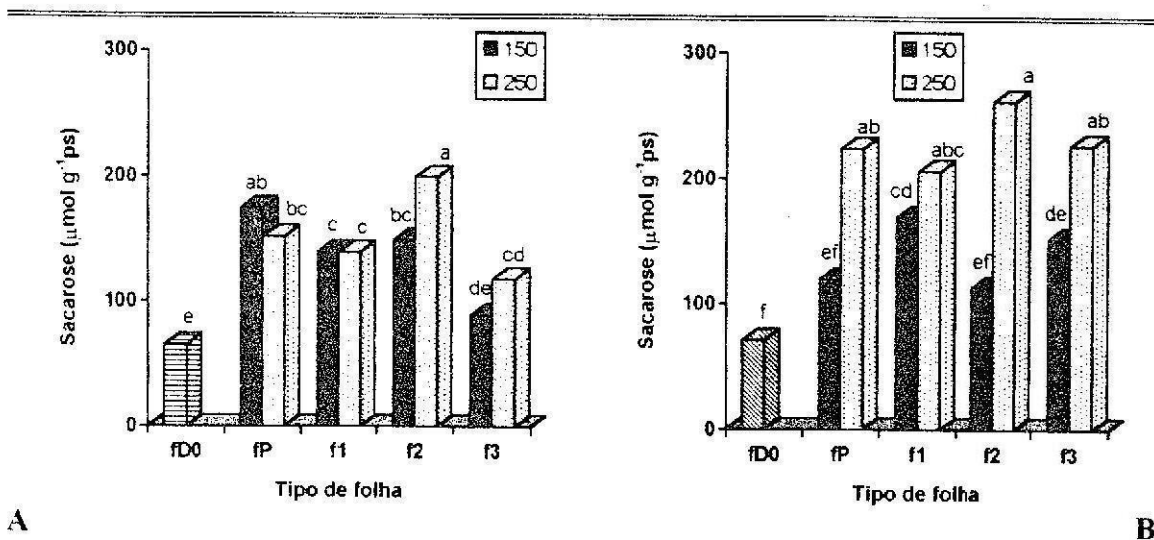


Figura 4.41. Efeito da intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a fase de aclimatização em plantas de castanheiro micropropagadas nas concentrações de sacarose para cada um dos tipos de folhas analisadas e folhas do dia zero (fD0). (A) Plantas com sistema radicular desenvolvido *in vitro*. (B) Plantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro*.

Nas plantas com enraizamento *in vitro*, foram de novo as folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a folha dois das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a registarem os valores mais elevados com $174,4 \pm 13,5$ e $199,3 \pm 13,4 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ps}$ respectivamente; por seu lado as folhas persistentes registaram um acréscimo significativo nas concentrações de sacarose comparativamente às folhas do dia zero, para ambos os tratamentos de aclimatização (Fig. 4.41A). Nas plantas com enraizamento *ex vitro*, é notória a capacidade de acumulação de sacarose por parte dos tecidos foliares das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, independentemente do tipo de

folha analisada, tendo os valores oscilado entre as $206 \pm 15,7 \mu\text{mol g}^{-1}\text{ps}$ e as $262,1 \pm 42 \mu\text{mol g}^{-1}\text{ps}$. As folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram valores significativamente superiores por comparação com as folhas do dia zero de aclimação, o mesmo não acontecendo com as do tratamento de menor irradiância (Fig. 4.41B).

Registaram-se diferenças significativas na concentração de amido, em função dos dois níveis de irradiância de aclimação e também do tipo de folha analisado quer nas plantas com enraizamento *in vitro*, quer nas plantas com enraizamento *ex vitro*. Para ambos os tipos de plantas foi notório o efeito positivo da maior irradiância luminosa durante a aclimação, se exceptuarmos o caso da folha um das plantas com enraizamento *ex vitro* (Fig. 4.42).

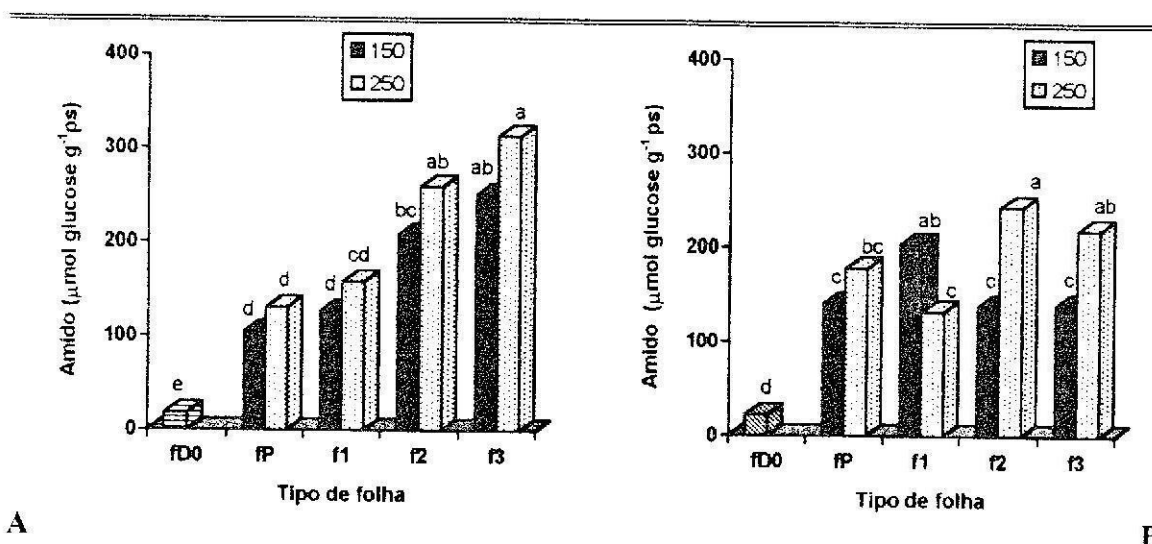


Figura 4.42. Efeito da intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a fase de aclimação em plantas de castanheiro micropropagadas nas concentrações de amido para cada um dos tipos de folhas analisadas e folhas do dia zero (FD0). (A) Plantas com sistema radicular desenvolvido *in vitro*. (B) Plantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro*.

No caso das plantas com enraizamento *in vitro* são bem patentes os níveis crescentes nas concentrações de amido à medida que folhas novas vão sendo formadas, atingindo as $314,6 \pm 49,2 \mu\text{mol glucose g}^{-1}\text{ps}$ na folha três das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.42A). Nas plantas com enraizamento *ex vitro* os valores mais elevados também se verificaram nas folhas dois e três do tratamento de aclimação com maior irradiância; os valores mais elevados foram registados na intensidade de

250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; quando comparadas com a concentração de amido nas folhas do dia zero, verificamos que estas diferem significativamente de todos os tipos de folhas de ambos os tratamentos (Fig. 4.42B).

A razão de hidratos de carbono solúveis / amido registou um valor decrescente com a idade das folhas, sendo este aspecto mais notório nas folhas das plantas com enraizamento *in vitro* (Fig. 4.43A). Registou-se um decréscimo muito acentuado desta razão relativamente às folhas do dia zero de aclimatização, consequência do reduzido teor de amido neste tipo de folhas relativamente ao teor de hidratos de carbono solúveis.

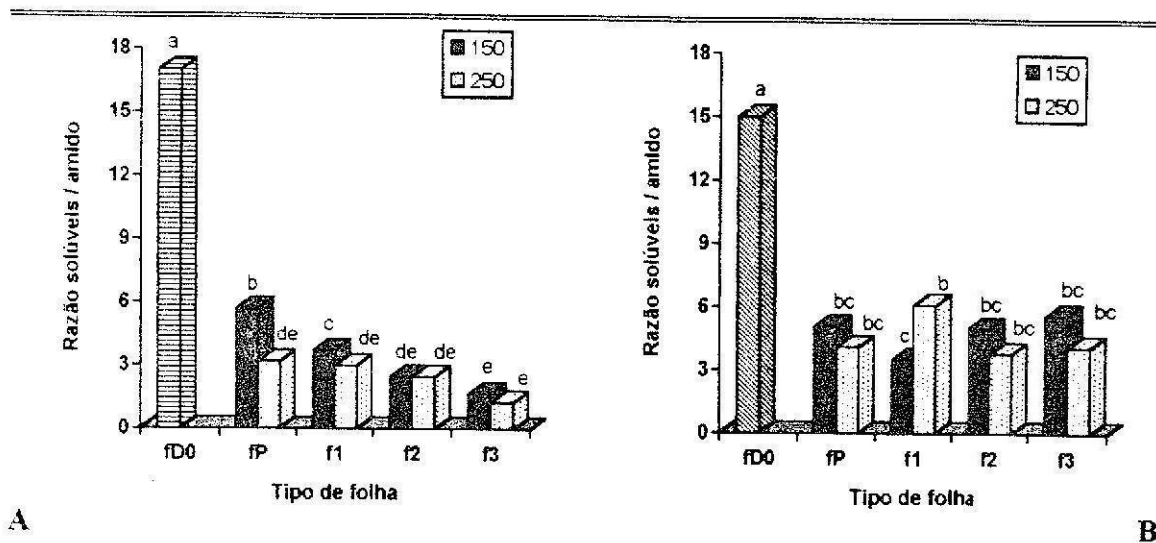


Figura 4.43. Efeito da intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a fase de aclimatização em plantas de castanheiro micropropagadas na razão hidratos de carbono solúveis/amido para cada um dos tipos de folhas analisadas. (A) Plantas com sistema radicular desenvolvido *in vitro*. (B) Plantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro*.

3.6.2. Proteína solúvel total

As concentrações de proteína solúvel total foram determinadas de acordo com o descrito no ponto 2.6.2 deste capítulo.

Os resultados dessas determinações são apresentados na Tabela 4.18 onde se avalia a influência dos dois factores em estudo, sistema de enraizamento e irradiância na aclimatização e na Figura 4.44 onde se apresenta, para cada um dos tratamentos de enraizamento independentemente, a influência da irradiância de aclimatização em cada um

dos tipos de folhas analisadas comparativamente com os valores quantificados para as folhas do dia zero de aclimatização (*fD0*).

As plantas cujo sistema radicular foi desenvolvido *ex vitro* apresentaram maior capacidade de síntese e armazenamento de proteína nos tecidos foliares, mostrando que este parâmetro é influenciado, no caso das plantas com enraizamento *ex vitro*, pela irradiância a que decorreu a aclimatização (Tab. 4.18).

Tabela 4.18. Influência do tipo de desenvolvimento radicular e da intensidade da luz em plantas de castanheiro micropropagadas na concentração de proteína solúvel, no final da fase de aclimatização.

Rizogénese	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Proteína solúvel ($\text{mg g}^{-1} \text{ps}$)
<i>In vitro</i>	150	18,06 c
	250	17,48 c
<i>Ex vitro</i>	150	33,10 b
	250	56,07 a

Na Tabela 4.19 está indicada a concentração de proteína solúvel para as folhas de campo, onde se registou um teor muito próximo ao quantificado na folha dois e folha três das microplantas com enraizamento *ex vitro*, e o dobro comparativamente ao mesmo tipo de folhas das microplantas com enraizamento *in vitro*.

Tabela 4.19. Concentração de proteína solúvel em folhas de campo (*fC*) de plantas micropropagadas ($n=8 \pm ep$).

Proteína solúvel ($\text{mg g}^{-1} \text{ps}$)
$32,25 \pm 2,67$

A análise da influência da irradiância a que as microplantas estiveram sujeitas durante a fase de aclimatização para cada um dos tipos de enraizamento, permite avaliar mais em detalhe a variação da concentração de proteína solúvel total em cada um dos tipos de folhas analisadas, bem como a comparação dessa concentração com o valor das folhas do dia zero de aclimatização (Fig. 4.44).

Registaram-se diferenças significativas na concentração de proteína solúvel total, em função do tratamento (níveis de irradiância) e do tipo de folha analisado para cada um dos tipos de plantas, de acordo com o tipo de sistema radicular. Foi significativo o acréscimo no teor de proteína solúvel total que as plantas com enraizamento *ex vitro* apresentaram comparativamente com as plantas com enraizamento *in vitro*, tal como anteriormente se referiu. Nestas, apesar da ligeira oscilação de valores, entre $13,2 \pm 0,5$ e $22,8 \pm 1,5$ mg g⁻¹ps, registaram-se diferenças significativas entre os diferentes tipos de folhas; as folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mostraram um acréscimo significativo comparativamente com as folhas do dia zero de aclimatização, o mesmo não acontecendo com as plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.44A).

Nas plantas com enraizamento *ex vitro* as diferenças entre os efeitos da irradiância sobre cada tipo de folha analisado foram mais notórias, tendo o valor mais elevado sido registado nas folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com $76,2 \pm 4,4$ mg g⁻¹ps. Estas folhas mostraram um acréscimo significativo comparativamente com as folhas do dia zero de aclimatização, tendo-se registado um decréscimo do teor proteico nas folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.44B).

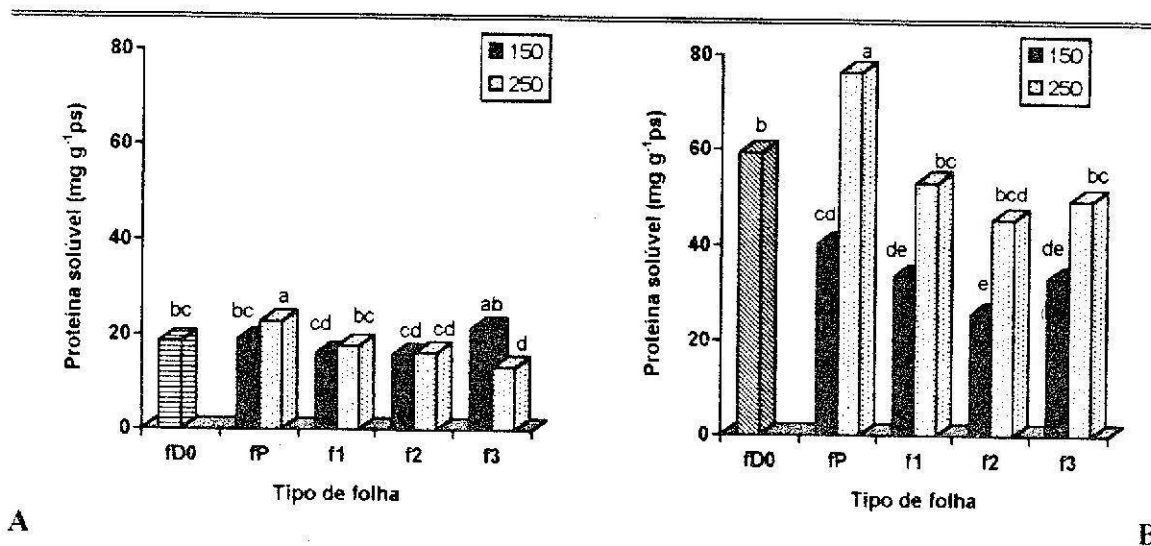


Figura 4.44. Efeito da intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a fase de aclimatização em plantas de castanheiro micropropagadas na concentração de proteína solúvel total para cada um dos tipos de folhas analisadas e folhas do dia zero (fD0). (A) Plantas com sistema radicular desenvolvido *in vitro*. (B) Plantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro*.

4. DISCUSSÃO

4.1. Análise de crescimento

O crescimento de plantas de castanheiro regeneradas *in vitro* durante a fase de aclimação, foi significativamente influenciado pelos dois factores em estudo: tipo de sistema radicular e irradiância. De facto, pela análise de resultados descritos anteriormente verifica-se, para a quase totalidade dos parâmetros e índices quantificadores, um efeito positivo da maior intensidade luminosa utilizada, $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, comparativamente à menor intensidade, $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Também em relação ao método de enraizamento, as microplantas cujo sistema radicular havia sido desenvolvido em condições *ex vitro*, em substrato natural, mostraram parâmetros e índices de crescimento significativamente superiores em relação às microplantas com o sistema radicular desenvolvido em condições *in vitro*, isto é, em meio agarizado. Como se referiu, o crescimento dependeu da intensidade luminosa à qual as plantas estiveram sujeitas durante a aclimação. Nas condições de maior intensidade luminosa, para qualquer dos tratamentos de enraizamento, registou-se um significativo acréscimo no crescimento relativo em altura e biomassa total (Fig. 4.3), na biomassa foliar (Fig. 4.4) e na área foliar (Fig. 4.5). Efeitos semelhantes para a área foliar são referidos por Donnelly & Vidaver (1984a) na aclimação de *Rubus idaeus* sob três níveis de irradiância, 50, 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em que verificaram uma correlação directa entre o aumento da área foliar com o aumento da intensidade luminosa. No entanto, segundo os mesmos autores, o acréscimo na área foliar foi apenas consequência de expansão foliar ao longo do tratamento e não de um aumento do número de folhas para as plantas sujeitas ao regime de luz mais elevado. No nosso estudo, verificou-se que para as plantas com enraizamento *in vitro*, o aumento de área foliar foi não só devido à expansão foliar mas também ao aumento do número de folhas formadas sob maior intensidade de luminosa (Fig. 4.10A e 4.11A respectivamente). Nas plantas com enraizamento *ex vitro*, o acréscimo de área ficou apenas a dever-se à maior expansão foliar por folha formada, já que não se registaram diferenças significativas entre o número de folhas (Fig. 4.10B e 4.11B). Acréscimos de área e biomassa foliar são também referidos

por Desjardins *et al.* (1987) na aclimatização de *Fragaria ananassa*, quando o fotoperíodo natural foi prolongado para 16 horas e com uma irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Em relação aos parâmetros de biomassa foliar e área foliar é também importante referir as alterações registadas entre as folhas do dia zero de aclimatização e as folhas persistentes no final de aclimatização, já que se trata de folhas diferenciadas durante a fase de multiplicação dos rebentos e que se mantêm durante as fases de enraizamento e de aclimatização. Apesar do contributo deste tipo de folhas para a biomassa e área foliar total por planta ser diminuto (Fig. 4.6 e 4.10), em relação à biomassa verificamos que nas plantas com enraizamento *in vitro* se registou uma diminuição dessa biomassa (Fig. 4.6A) como resultado normal de uma diminuição do número de folhas que no final da aclimatização se tinham mantido fisiologicamente activas (Fig. 4.11A). Apesar da sua diminuição em número, as restantes mostraram-se activas em termos fisiológicos, já que apresentaram no final uma área foliar ligeiramente superior (Fig. 4.10A).

Nas plantas com enraizamento *ex vitro*, a biomassa foliar e a área foliar, registaram acréscimos significativos, independentemente da irradiância a que as plantas estiveram sujeitas (Fig. 4.5B e 4.9B respectivamente), não se tendo registado diferenças significativas em relação ao número de folhas (Fig. 4.11B). Desta análise sobressai a possível importância das folhas persistentes na actividade metabólica das microplantas de castanheiro durante a fase inicial da aclimatização. A manutenção das folhas persistentes ao longo do crescimento das plantas regeneradas *in vitro* varia desde alguns dias após o início da aclimatização até vários meses. Donnelly & Vidaver (1984a) referem, em *Rubus idaeus*, que as folhas persistentes são mantidas por diferentes períodos de tempo após o transplante das plantas para aclimatização, registando um significativo decréscimo no número de folhas entre a terceira e quarta semana de aclimatização dentro de uma gama de irradiância entre 3 e 9 Klux; à quarta semana as folhas persistentes constituíam apenas 40 a 45% do número total de folhas e esse valor continuava a decrescer para além de três meses após o transplante. A sua manutenção depende não só da espécie em questão mas também do tipo de stress ambiental que a planta encontra quando colocada numa situação *ex vitro*. Fabbri *et al.* (1986) em morangueiro, referem que os ligeiros acréscimos na área foliar que as folhas persistentes apresentaram durante a aclimatização são fundamentalmente devidos à expansão celular e não tanto ao aumento do número de células, evidenciando ainda

capacidade para acumulação de ceras epicuticulares quer na página abaxial quer na página adaxial durante os primeiros vinte dias de aclimatização.

A razão de biomassa da parte aérea e parte radicular (Fig. 4.4) registou um decréscimo nas plantas aclimatizadas sob maior irradiância, isto é, o acréscimo de área foliar, embora acompanhado de acréscimo na biomassa foliar, não foi de modo a superar o acréscimo de biomassa da parte radicular. Este aspecto deverá ter repercussões positivas no desenvolvimento equilibrado da planta quando em condições de campo. Em videira, Rebordão (1994) refere não ter registado alterações na repartição de biomassa, no entanto este autor utilizou irradiâncias comparativas de 45 e 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, valores bastante inferiores às usadas nos ensaios com castanheiro, que foram de 150 e 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Este índice traduz também o desequilíbrio que as microplantas com o sistema radicular desenvolvido *in vitro* apresentam, comparativamente com as microplantas cujo sistema radicular se desenvolveu *ex vitro* (Fig. 4.3). Assim, as primeiras apresentaram uma razão parte aérea/parte radicular de 1,4, contra o valor de 4,1 das plantas enraizadas *ex vitro*, valor este que se aproxima mais dos valores registados no fim da aclimatização (≈ 7).

A biomassa radicular traduz o comportamento da planta em consequência do desenvolvimento da sua parte aérea, já que um maior desenvolvimento da parte aérea permite uma maior síntese de metabolitos, com a consequente formação de novos tecidos e/ou expansão dos já existentes, aspecto este que se traduz também num aumento da estrutura radicular, que por sua vez permitirá um maior fluxo nutritivo à parte aérea. Contrariamente às plantas com enraizamento *ex vitro*, as plantas com enraizamento *in vitro* não registaram um acréscimo de biomassa radicular significativo quando aclimatizadas sob a menor irradiância luminosa comparativamente à biomassa radicular existente no início da aclimatização (Fig. 4.7). Este facto parece, assim, traduzir uma possível falta de funcionalidade deste tipo de sistema radicular, confirmando também os resultados de sobrevivência discutidos no ponto 4 do cap. III deste trabalho. No entanto a funcionalidade parece melhorar com a utilização de irradiâncias mais elevadas, tal como se verificou com a irradiância de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, onde a biomassa radicular foi significativamente superior à do dia zero de aclimatização.

A área foliar específica (SLA), que traduz a razão entre a área das folhas e a sua biomassa, no caso das plantas com enraizamento *in vitro*, não mostrou ser afectada pela

irradiância utilizada na aclimatização, com excepção para as folhas persistentes (Fig. 4.13A). Nas plantas com enraizamento *ex vitro*, a maior irradiância correspondeu uma área foliar específica menor do que a das plantas submetidas à irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.13B). Este resultado pode ser interpretado como uma optimização da captação de luz e de menores gastos respiratórios. Díaz-Pérez *et al.* (1995) ao compararem valores da área foliar específica entre plantas de macieira (*Malus pumila* cv. Greensleeves) em condições *in vitro* e no final da aclimatização referem igualmente uma diminuição na SLA como consequência do aumento da intensidade luminosa ($0,056$ e $0,033 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ respectivamente).

A taxa de crescimento relativo (RGR) traduz o aumento de biomassa por unidade de biomassa pré-existente e por unidade de tempo ao longo da aclimatização, representando por isso a eficiência da planta como produtora de novo material. Esta taxa reflecte valores médios sempre superiores para as plantas que estiveram sujeitas a irradiâncias mais elevadas, com especial significado nas plantas com enraizamento *ex vitro* onde essa taxa foi 4x superior comparativamente às plantas com enraizamento *in vitro* (Tab. 4.2). Este acréscimo pode ser explicado como consequência de um balanço de carbono mais favorável entre os ganhos fotossintéticos e as perdas respiratórias ao nível do caule e da raiz. O índice que mais contribuiu para este facto foi, fundamentalmente, a taxa líquida de assimilação (NAR), isto porque a variação na razão de área foliar (LAR) entre os tratamentos é muito pequena (Tab. 4.2), apresentando até um ligeiro decréscimo para as plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, comparativamente com as plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Este índice, razão de área foliar (LAR), que resulta da interacção entre a razão de peso foliar (LWR)[§] e a área foliar específica (SLA), caracteriza a dimensão relativa do aparelho assimilador e, em sentido lato, representa a razão entre o material com capacidade fotossintética e os tecidos com actividade respiratória. Das suas duas componentes, a SLA é mais afectada pelos factores ambientais do que a LWR, já que esta é uma característica relativamente estável sob a acção de diferentes condições ambientais, na medida em que estas afectam mais o número e o tamanho das folhas individuais do que a razão entre o peso das folhas secas e o peso seco total (Teixeira & Ricardo, 1983), como aliás se registou entre os tratamentos destes ensaios. Em videira, Rebordão (1994) refere também um efeito positivo do aumento

de irradiância na RGR, de uma taxa de $0,107 \text{ g g}^{-1} \text{ ps dia}^{-1}$ nas plantas aclimatizadas sob $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foi atingida uma taxa de $0,517 \text{ g g}^{-1} \text{ ps dia}^{-1}$ em plantas aclimatizadas a $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, valores estes muito semelhantes aos registados nestes ensaios entre as duas irradiâncias de aclimatização das plantas com enraizamento *ex vitro* ($0,138$ e $0,512 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para 150 e $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente). Também em macieira (*Malus pumila* cv. Greensleeves) Díaz-Pérez *et al.* (1995) referem que a aclimatização permite incrementos na RGR ao longo das quatro semanas de aclimatização ($0,005$ para $0,085 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente).

A taxa líquida de assimilação (NAR), como se referiu atrás, é a principal responsável pelas diferenças de crescimento relativo médio por planta. Em castanheiro enraizado *in vitro*, a maior irradiância permitiu um acréscimo de 1,5 vezes ($10,6$ para $15,3 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$), enquanto nas plantas com enraizamento *ex vitro* esse acréscimo foi de quase 300% (de $16,8$ para $41,2 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$). De entre os factores ambientais, a radiação é o que mais afecta a taxa de assimilação aparente, tendo sido demonstrado por vários investigadores a existência de uma correlação positiva entre a NAR e a radiação incidente (Hunt, 1978; Poorter, 1989). Por outro lado, devido ao efeito do ensombramento mútuo, verifica-se, durante o decorrer do desenvolvimento da planta, uma correlação negativa entre a taxa de assimilação aparente (NAR) e a área foliar, isto é, a NAR diminui quando aumenta a área foliar, situação que não se verificou nestes ensaios, certamente em consequência do reduzido tempo durante o qual as plantas estiveram em análise.

Díaz-Pérez *et al.* (1995) referem que a NAR é determinante para explicar as diferenças na RGR entre plantas de macieira (*Malus pumila* cv. Greensleeves) aclimatizadas e não aclimatizadas. Em videira, Rebordão (1994), comparando irradiâncias de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com fotoperíodo de 12/12 h com $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16/8 h durante a aclimatização, considera a NAR (com $5,28$ e $25,55 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ respectivamente) a principal responsável pela RGR, já que o LAR foi equivalente ($0,0248$ e $0,0284 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, respectivamente). Em plantas de *Fragaria x ananassa* submetidas a um aumento do fotoperíodo, Desjardins *et al.* (1987) atribuem o acréscimo de RGR ao aumento da NAR já que a LAR sofreu redução, tal como aconteceu nas plantas com enraizamento *ex vitro* destes ensaios.

Encontram-se algumas referências quanto ao aumento da irradiância durante a aclimatização. Miranda & Fernandez (1993), igualmente em castanheiro e após 8 semanas de permanência das microplantas em condições de enraizamento *ex vitro*, referem irradiâncias na aclimatização próximas de $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ao meio dia solar, em condições de iluminação natural em túnel sob estufa e variável ao longo do dia. Em *Vitis labrusca*, Lewandowski (1991) utilizou irradiâncias de $410 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sem que a taxa de sobrevivência tenha descido significativamente. No entanto, não foram encontradas referências à influência da intensidade luminosa sobre os índices ou parâmetros quantificadores da análise de crescimento.

O aumento de irradiância parece não comprometer a sobrevivência, pelo que este aspecto, no caso do castanheiro, parece depender mais da funcionalidade do sistema radicular que a planta tem quando inicia o seu processo de aclimatização. Para efeitos de aplicação prática a utilização combinada de condições de enraizamento *ex vitro*, com acréscimos graduais na irradiância luminosa durante esta fase de pré-aclimatização simultânea com o enraizamento, para além de permitir um maior vigor no crescimento da microplanta poderá também permitir uma redução do período de aclimatização. Esta metodologia, permitiria, assim, uma significativa redução de custos indirectos e directos num sistema comercial de micropropagação de castanheiro.

4.2. *Histologia e anatomia foliar*

A análise das observações histológicas mostrou que as folhas do dia zero de aclimatização (*JD0*) apresentaram um mesófilo com estrutura anatómica pouco diferenciada, isto é, registou-se uma quase total ausência de células do parênquima em paliçada e alguns espaços intercelulares no parênquima lacunoso. Observações idênticas foram referidas por outros autores noutras espécies. Folhas formadas *in vitro* de *Liquidambar styraciflua* apresentaram menor espessura, menor densidade de células do mesófilo e aumento do número de espaços intercelulares, bem como uma quase total ausência de células de parênquima em paliçada (Wetzstein & Sommer, 1982). Folhas com menor espessura, apresentando apenas uma pequena camada de células de tipo parênquima

em paliçada foram observadas em morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch. 'Selva') (Fabri *et al.*, 1986). Também em *Prunus insititia* se observou um menor alongamento das células do parênquima em paliçada e uma maior percentagem de espaços intercelulares (Brainerd *et al.*, 1981). Tratando-se de folhas que foram previamente diferenciadas na fase de multiplicação *in vitro*, as condições ambientais em que decorre o processo de enraizamento parecem ser responsáveis pela reduzida diferenciação e desenvolvimento celular que este tipo de folhas apresenta. Em *Rubus idaeus*, Donnelly & Vidaver (1984a) verificaram que o aumento moderado de irradiância de 30 a 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não provocou modificações significativas na estrutura anatómica das folhas que então se diferenciavam. No entanto, o aumento de irradiância de 50 para 315 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provocou, em *Liquidambar styraciflua*, uma alteração na estrutura anatómica das folhas desenvolvidas *in vitro*, apresentando as folhas que se desenvolveram sob intensidade de luz mais elevada uma maior espessura, mesófilo mais diferenciado e células maiores comparativamente às folhas desenvolvidas sob baixa irradiância (Lee *et al.*, 1988). No entanto, a humidade deverá também ser determinante do padrão de diferenciação (Grout & Aston, 1978).

No final do período de aclimatização, este tipo de folhas, agora designadas por folhas persistentes (*fP*), apresentaram uma estrutura anatómica diferente. Assim, é de referir o aumento do número de células ao nível do mesófilo, com a consequente diminuição de espaços intercelulares, apesar de continuar a não se observar diferenciação dorsiventral do mesófilo, isto é, não houve diferenciação entre células do parênquima em paliçada e lacunoso (Fig. 4.15B). Este aumento do número de células não se reflectiu no aumento de espessura do mesófilo, tendo-se verificado ainda que o regime de luz não influenciou este parâmetro (Tab. 4.3 e Fig. 4.19). Estas alterações revelam uma capacidade de adaptação destas folhas às novas condições ambientais a que foram sujeitas, e que se traduziram também, por exemplo, no acréscimo ao nível da concentração de clorofilas, hidratos de carbono e proteínas (Fig. 4.31, 4.40, 4.41, 4.42 e 4.44). Estes resultados mostram um comportamento diferente das folhas persistentes de castanheiro micropropagado em relação ao referido para outras espécies. Em videira, Rebordão (1994), refere um aumento da expansão celular e dos espaços intercelulares, com consequente aumento de espessura das folhas, além de um aumento dos níveis de alguns

dos metabolitos mencionados para o castanheiro. Em *Rubus idaeus*, Donnelly & Vidaver (1984a) referem que as folhas persistentes apresentavam a maioria das características anatómicas e histológicas das folhas *in vitro*, não tendo, portanto, sofrido grandes alterações. Uma explicação para estas diferenças, para além de uma possível genótipo-dependência, poderá estar na intensidade da irradiância utilizada para a aclimatização das plantas, pois que Rebordão (1994) utilizou uma irradiância máxima de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PPFD e Donnelly & Vidaver (1984a) de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PPFD, isto é, valores bastante inferiores aos utilizados nestes ensaios.

As folhas novas, formadas no decorrer da fase de aclimatização, apresentaram características anatómicas mais desenvolvidas e que se traduziram por um aumento gradual de espessura do mesófilo e do diâmetro da nervura principal (Fig. 4.20), no gradual acréscimo da espessura relativa do parênquima em paliçada com a consequente diminuição do parênquima lacunoso (Fig. 4.22 e 4.23), até valores próximos das folhas de campo. No entanto, a organização destes tecidos continua ainda bastante diferente da que se regista nas folhas de campo, continuando os espaços intercelulares ainda presentes em elevada proporção. Esta menor densidade de células associada a uma maior expansão foliar tem como explicação o aumento dos espaços intercelulares, em especial ao nível do parênquima lacunoso, e permite explicar as variações que se registaram ao nível da área foliar específica, onde nas plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se verificou o valor mais elevado de superfície foliar mas que não foi acompanhado pelo respectivo aumento em peso, tendo o inverso sucedido nas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (cf. ponto 3.1.2, Fig. 4.13).

Esta variação de características, ao nível da anatomia das folhas que se registou no final do processo de aclimatização, tem sido verificada por muitos autores em diferentes espécies, apesar desta variação poder ser mais ou menos rápida até se atingirem características idênticas às das folhas de campo (Preece & Sutter, 1991). Fabri *et al.* (1986) na aclimatização de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch. 'Selva') registaram um aumento da espessura das folhas novas bem como um aumento do número de células de parênquima em paliçada, apresentando estas folhas características próximas de folhas de campo. Em *Liquidambar styraciflua*, Lee *et al.* (1988) referem que as folhas formadas em condições de aclimatização sob irradiância de $315 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apresentavam uma a duas

camadas de células de parênquima em paliçada, o mesófilo de aspecto mais compacto e com menos espaços celulares. No entanto muitas destas folhas continuavam a não expressar todas as características típicas de folhas de sol das plantas com crescimento no campo (Wetzstein & Sommer, 1982).

É sabido que as características anatómicas das folhas reflectem as condições de luz em que ocorreu a sua diferenciação e crescimento (Lichtenthaler, 1981; Dale, 1988). Em condições de sombra as folhas apresentam normalmente menor espessura, como consequência do menor desenvolvimento dos tecidos do mesófilo. Esta característica é interpretada como uma adaptação que permite reduzir os gastos de manutenção de camadas de células com capacidade de fixação de CO₂ reduzida por limitação do factor luz. Assim se pode explicar a evolução anatómica que se regista entre a folha um, que se diferenciou em condições *in vitro*, e as folhas dois e três, cuja diferenciação e desenvolvimento ocorreram em condições *in vivo*, apresentando estas melhores características anatómicas e, como a seguir será discutido, fisiológicas.

A forma e frequência dos estomas foi muito pouco afectada pela PPF (Tab. 4.7). Contudo, as condições ambientais *in vitro* vs *ex vitro* provocaram diferenças significativas nestes dois parâmetros estomáticos. As folhas de plantas com enraizamento *in vitro*, cuja diferenciação ocorreu ainda em condições *in vitro* (*fD0* e *fP*), exibiram uma densidade estomática muito elevada, uma morfologia sem nítida diferenciação entre células guarda e células companheiras e apresentando-se com o ostiolo completamente aberto (Fig. 4.17). Verifica-se assim que as condições de aclimatização não alteraram as características morfológicas pré-determinadas aquando da diferenciação foliar. Resultados semelhantes foram referidos em *Malus* (Brainerd & Fuchigami, 1981), em *Liquidambar styraciflua* (Wetzstein & Sommer, 1983) e *Prunus cerasus* (Marín *et al.*, 1988). Nas plantas cujo expressão e desenvolvimento radicular ocorreu *ex vitro*, num ambiente que, apesar de continuar com humidade relativa elevada, tem características diferentes das que se verificam dentro de um tubo de ensaio, registaram-se alterações na morfologia estomática (Fig. 4.17C). Neste grupo de plantas os estomas apresentam um aspecto mais semelhante ao observado nos estomas das folhas que se diferenciaram durante a fase de aclimatização. Apesar de ser referido que as características estomáticas, nomeadamente a frequência e o desenvolvimento dos estomas, estão sob dependência genotípica também tem sido referida

a influência das condições ambientais (Jones, 1985). Factores como a humidade atmosférica, disponibilidade de água, irradiância e temperatura têm sido apresentados como susceptíveis de provocarem alterações fenotípicas nos estomas (Sesták, 1985). É o controlo destes factores durante a fase de aclimatização que permite que as novas folhas que se vão diferenciando apresentem características anatómicas e histológicas já referidas, bem como uma morfologia e funcionalidade estomática cada vez mais semelhante às observadas nas folhas de plantas crescendo em condições naturais. Aspecto confirmado em castanheiro em que se verificou, nas folhas dois e três, uma aproximação cada vez maior às características morfológicas observadas nas folhas de plantas crescendo no campo: diminuição da frequência estomática (Tab. 4.12); estomas mais elípticos; diferenciação nitida entre células guarda e células companheiras; ostíolo quase completamente fechado (Fig. 4.18). Os valores da frequência estomática registados nas folhas dois e três no final da aclimatização, não se distinguiram significativamente dos valores da frequência estomática das folhas de plantas de campo micropropagadas, além de se encontrarem dentro do intervalo referido por Rinallo & Bruno (1991), cujos limites são de 209 e 318 estomas mm^{-2} , de acordo com as cultivares.

4.3. Controlo da perda de água

Segundo alguns autores, a taxa de perda de água está directamente relacionada com a funcionalidade dos estomas, podendo a variação de perda de água ao longo do tempo de aclimatização permitir identificar o estabelecimento da funcionalidade estomática (Brainerd & Fuchigami, 1981; Ghashghaie *et al.*, 1992). De facto, tem sido verificado que os estomas de folhas diferenciadas *in vitro* não têm capacidade para fechar em resposta a estímulos que, normalmente, provocam fecho estomático, como sejam a aplicação de ácido abscísico e elevadas concentrações de CO_2 , entre outros, pelo que consideram ser a fraca resposta em termos de funcionalidade estomática a principal causa de perda de água por parte das plantas micropropagadas (Brainerd & Fuchigami, 1982; Conner & Conner, 1984; Blanke & Blencher, 1989). No entanto, outros estudos têm demonstrado alguma capacidade de resposta por parte das estruturas estomáticas. Trabalhos de Shackel *et al.*

(1990) confirmaram que estomas de folhas intactas de macieira têm capacidade de fechar em atmosferas com valores de 90% de humidade relativa. Estes autores mostraram que a perda de água que se regista logo após a sua remoção do meio de cultura, medida através de um dispositivo especialmente adaptado e ligado a um porómetro, decrescia ao longo de um período de 24 horas, até atingir um patamar estabilizado de perda. Esta taxa estabilizada, que se manteve ao longo de 3 dias, é indicadora de uma baixa taxa de transpiração cuticular, associada a uma reduzida transpiração estomática

Nos ensaios efectuados, verificou-se que as condições experimentais da amostra afectaram a determinação da taxa transpiratória: utilizando discos foliares, os diferentes tipos de folhas em estudo apresentaram comportamentos de perda de água muito idênticos, apesar de se ter sempre registado uma maior resistência à perda de água por parte da folha três das plantas com enraizamento *ex vitro*; quando as determinações foram feitas com as folhas inteiras, as diferenças de comportamento tornaram-se mais evidentes. Assim, no caso das plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a folha três apresentou funcionalidade estomática significativamente superior até aos 30/40 minutos de exposição ao ar, comparativamente com as restantes. No caso das plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, essas diferenças foram muito mais acentuadas, apresentando as folhas dois e três um comportamento significativamente diferente até cerca dos 80 minutos de exposição ao ar. Estes resultados traduzem uma adaptação progressiva da funcionalidade estomática à medida que as folhas se vão diferenciando durante a aclimatização, isto é, em condições ambientais de humidade relativa menores. No entanto, estas capacidades de retenção de água estão ainda muito longe do comportamento registado com as folhas de campo de plantas micropropagadas. Nestas, as características da amostra afectaram igualmente as determinações da taxa transpiratória, pois comparando as determinações feitas com discos foliares e com as folhas inteiras os discos perderam até 60% do seu conteúdo relativo em água, ao passo que em folhas inteiras esse valor não ultrapassou os 30% (Fig. 4.25 e 4.26).

As folhas persistentes continuaram a não apresentar capacidade de adaptação às novas condições ambientais, isto é, a diferenciação e funcionalidade que foi estabelecida ainda em condições *in vitro* mostrou-se irreversível.

Na base das diferenças registadas estará o comportamento estomático nos diferentes tipos de folhas e que, como se referiu no ponto anterior, sofreu uma acentuada modificação estrutural e, como tal, funcional, no decorrer da diferenciação de novas folhas em condições de humidade mais baixas, à medida que a aclimatização vai decorrendo. Variações semelhantes de perda de água e comportamentos entre diferentes tipos de folhas foram observados por diferentes autores em diferentes espécies (Wardle *et al.*, 1979; Dhawan & Bhojwani, 1987; Marin & Gella, 1988; Lewandoski, 1991; Diettrich *et al.*, 1992).

O deficiente funcionamento estomático tem sido atribuído a diferentes factores, nomeadamente aos baixos níveis de cálcio nas células guarda afectando a actividade da ATPase e, em consequência, o movimento do ião potássio (Sallanon *et al.*, 1991, 1993). Ainda segundo estes autores, ou o sinal para o fecho dos estomas não é detectado pelas células guarda ou então não existe sequência nas reacções metabólicas que tornam o fecho dos estomas possível. As células guarda funcionam por alterações de turgidez e a turgescência das células adjacentes pode influenciar o fecho dos estomas (Blanke & Belcher, 1989; Santamaria *et al.*, 1993). Também a rigidez da parede celular pode influenciar o fecho dos estomas, impedindo os movimentos das células guarda (Ziv *et al.*, 1987; Diettrich *et al.*, 1992).

O controlo da perda de água pode estar associado a outras características da folha, como sejam a cutícula, que normalmente é reduzida nestas folhas (Sutter & Langhans, 1979, 1982; Fuchigami *et al.*, 1981; Wardle *et al.*, 1983) e que se traduz, normalmente, não só num menor conteúdo em ceras, como também em modificações na sua estrutura química. No entanto, este aspecto é contestado por Santamaria & Kerstiens (1994) que reafirmam que a rápida perda de água não está associada com um fraco desenvolvimento epicuticular, mas sim com a já referida incapacidade dos estomas fecharem em resposta a uma situação de desidratação da folha.

O melhor controlo na capacidade de regulação hídrica por parte das folhas que se vão progressivamente diferenciando durante a aclimatização parece, assim, resultar fundamentalmente das características dos estomas que vão adquirindo a morfologia e fisiologia mais próximas da das folhas desenvolvidas em condições de campo. Neste nosso estudo, as folhas das plantas aclimatizadas sob o regime de maior irradiância apresentaram

menores percentagens de perda de água, pelo menos durante uma fase mais prolongada do tratamento, o que traduz uma melhor capacidade de regulação hídrica. A mesma conclusão apresenta Rebordão (1994), quando comparou as taxas transpiratórias de microplantas de videira sujeitas a dois níveis de irradiância.

4.4. *Clorofilas e fotossíntese*

As microplantas são submetidas a rápidas e extremas alterações de funcionamento quando transferidas dos sistemas de cultura *in vitro*, onde possuem uma fonte de sacarose disponível e de uma limitada troca de gases e baixas intensidades de luz, para sistemas de crescimento e desenvolvimento *in vivo*. Como consequência, estas plantas são forçadas a alterarem profundamente o seu sistema metabólico de heterotrófico para autotrófico, e o processo fotossintético torna-se então determinante para permitir a sobrevivência.

A concentração de clorofilas, após os tratamentos de aclimatização, dependeu quer do tipo de sistema radicular que as plantas possuíam, desenvolvido em meio agarizado, *in vitro*, ou em substrato de perlite e turfa, *ex vitro*, quer do regime luminoso a que as plantas estiveram sujeitas durante o período de aclimatização, mostrando ainda ser dependente da interação entre estes dois factores. No entanto, estes factores influenciaram de forma distinta. Enquanto que nas plantas com enraizamento *in vitro* as concentrações mais elevadas de clorofila foram registadas nas plantas que estiveram sujeitas à menor intensidade de luz, nas plantas com enraizamento *ex vitro* sucedeu o contrário. As plantas com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram as que apresentaram uma menor razão Cl_a/Cl_b (Tab. 4.9). É bem conhecida a importância e os efeitos das características da luz ambiental sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal, determinando muitas das características morfológicas e fisiológicas das folhas. É sabido que as folhas desenvolvidas na presença de baixos níveis de irradiância apresentam uma elevada proporção de Cl_b relativamente à Cl_a , um elevado valor da Cl_{total} , bem como uma menor razão de proteína solúvel/clorofila, comparativamente a folhas desenvolvidas sob intensidades mais elevadas (Chaves, 1994), sendo apontados valores de Cl_a/Cl_b de $2,85 \pm 0,09$ para espécies de sombra e de $3,5 \pm 0,15$ para espécies de sol (Boardman, 1977).

Os resultados das plantas com enraizamento *in vitro* estão assim de acordo com as considerações feitas anteriormente e também referidas por outros autores (Donnelly & Vidaver, 1984b; Lichtenthaler, 1981). A razão para não se ter verificado com as plantas com enraizamento *ex vitro* poderá relacionar-se com o facto de estas plantas possuírem desde o início da aclimatização um sistema radicular funcional, permitindo uma maior capacidade de absorção de nutrientes e, como consequência, um desempenho metabólico superior, confirmado pela análise de crescimento e pelo comportamento fotossintético destas plantas. No entanto, este grupo de plantas, não apresenta valores de razão de Cl_a/Cl_b significativamente diferentes das plantas com enraizamento *in vitro*, quando comparamos os diferentes tipos de folhas entre si (Fig. 4.32).

As folhas formadas *in vitro* e que se mantiveram durante as fases de enraizamento e aclimatização, apresentaram capacidade de síntese de clorofila (Fig. 4.31), apesar da sua funcionalidade ser muito limitada em termos de competência fotossintética, o que foi comprovado pela taxa de fotossíntese aparente (Fig. 4.33), taxa de fotossíntese máxima (Tab. 4.12), rendimento quântico aparente (Tab. 4.14) e ponto de compensação para a luz (Tab. 4.15). Os resultados obtidos mostraram que as folhas persistentes das plantas de castanheiro regeneradas *in vitro* têm competência fotossintética, tendo apresentado uma taxa de fotossíntese aparente positiva (Fig. 4.33A), bem como acréscimos de taxa fotossintética a CO_2 saturante em resposta ao aumento da PFD (Tab. 4.12). É importante notar que este tipo de folhas, para além de terem apresentado as menores taxas fotossintéticas comparativamente aos valores registados para as folhas dois e três (Fig. 4.33A), apresentaram também o menor valor de PFD a que ocorre saturação para a luz, na ordem dos 100 a 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.34 a 4.37). Estes resultados traduzem uma certa desorganização estrutural e, consequentemente, funcional, do seu aparelho fotossintético, apesar de apresentarem uma razão entre Cl_a/Cl_b sem diferenças significativas para as plantas com enraizamento *ex vitro* comparativamente à razão dos outros tipos de folhas analisadas (Fig. 4.32). Também quando se expressou a taxa de fotossíntese aparente por mg de clorofila por hora, as folhas persistentes apresentaram valores significativamente inferiores aos das folhas dois e três (Fig. 4.39). Este resultado poderá ser explicado pelo provável deficiente desenvolvimento das membranas dos tilacóides e, como tal, de toda a ultraestrutura do cloroplasto. Esta diferenciação, que

decorre ainda na fase de multiplicação *in vitro*, será irreversível, mesmo depois de colocadas em condições ambientais cada vez mais próximas das condições naturais, o que explicaria o facto de não conseguirem tornar-se de todo fotossinteticamente competentes.

As plantas com desenvolvimento *in vitro* apresentaram uma concentração de clorofila total comparável ao apresentado por plantas controlo crescendo sob idênticas condições de luz (Donnelly & Vidaver, 1984b). Em termos de área foliar, a concentração de clorofila é elevada para níveis de luz baixos comparativamente a níveis altos (Lee *et al.*, 1985). Este facto está em concordância com a normal adaptação encontrada nas folhas de sombra (Björkman, 1981). Também em *Liquidambar styraciflua* crescendo *in vitro* sob baixa irradiância, Lee *et al.* (1985) observaram que as membranas dos cloroplastos não estavam diferenciadas em grana e as membranas internas apresentavam um arranjo irregular. Quando colocadas sob elevadas intensidades, as folhas formadas em condições *in vitro* apresentaram fraca capacidade fotossintética que poderia resultar de danos provocados nos pigmentos fotossintéticos associado a fotoinibição.

Com a utilização de técnicas de fluorescência Lees *et al.* (1991), mostraram que folhas de *Clematis* diferenciadas *in vitro*, apresentavam alterações significativas no comportamento dos diferentes parâmetros de fluorescência, revelando a existência de clorofila fora dos centros de reacção e desorganização dos pigmentos fotossintéticos. A desorganização dos pigmentos fotossintéticos pode ser responsável pela baixa capacidade fotossintética das folhas desenvolvidas *in vitro* e posteriormente aclimatizadas, apesar de apresentarem elevadas concentrações de clorofila total, tal como ocorreu nestes ensaios com as plantas de castanheiro. É provável que uma mudança de balanço fotossintético negativo para positivo durante a fase de diferenciação foliar esteja correlacionada com o acoplamento dos pigmentos fotossintéticos aos centros de reacção. Apesar de se dispor de pouca informação sobre o impacto das condições de cultivo *in vitro* neste mecanismo, são referidos resultados sugerindo que, em condições *in vitro*, a inibição do ciclo de Calvin por “feedback” dos açúcares, tem como resultado um fluxo de electrões excessivo nas membranas dos tilacóides que provocam então fotoinibição e fotooxidação (Cappellades *et al.*, 1991; Dubé & Vidaver, 1992; Huylenbroeck *et al.*, 1995).

Lees *et al.* (1991) em *Clematis* ‘The President’, referem que apesar de se assistir a um significativo aumento na capacidade fotossintética das folhas persistentes na primeira

semana de aclimatização, quase o dobro do que as folhas apresentavam quando *in vitro*, estas continuam a apresentar uma capacidade de fotossíntese limitada. Aqueles autores sugerem que a uma possível inibição pela sacarose possa permanecer ainda evidente neste tipo de folhas. Em *Rubus idaeus* verificou-se que a quantidade de CO₂ incorporada por folhas persistentes, um mês após a sua saída do meio de cultura se mantinha inalterável podendo mesmo apresentar, momentaneamente, um balanço negativo (Donnelly & Vidaver 1984b), resultado que nos nossos ensaios apenas registámos até ser atingido o ponto de compensação para a luz. Aqueles autores referem ainda que as folhas persistentes constituíam cerca de 30% do total da área foliar embora fossem responsáveis por menos de 10% do CO₂ incorporado. Smith *et al.* (1986) em *Betula platyphylla*, indicam resultados semelhantes. Já em *Asparagus officinalis* e em morangueiro, Yue *et al.* (1992; 1993b) referem que a capacidade fotossintética das folhas formadas *in vitro* é um contributo importante para o crescimento autotrófico durante o período de aclimatização.

O comportamento descrito para as folhas persistentes de castanheiro, com balanço positivo de carbono durante a aclimatização, deverá traduzir-se num importante suporte para a manutenção das condições de sobrevivência e desenvolvimento da planta, durante a fase inicial de aclimatização, isto é, na ausência de novas folhas. Deverá ter ainda especial significado nas plantas cujo desenvolvimento radicular ocorreu em condições *ex vitro* e, portanto, já em condições autotróficas, sem sacarose, período durante o qual se assiste à formação do sistema radicular. O castanheiro deverá, por isso, ser incluído dentro das espécies competentes, no que diz respeito ao comportamento das folhas persistentes.

Apesar destas referências, o papel das folhas persistentes permanece ainda controverso. A sua capacidade fotossintética parece, como foi referido, variar em função da espécie, podendo determinar o contributo destas folhas quando em condições *ex vitro*. Espécies como a batateira (*Solanum tuberosum*) e crisântemo (*Chrysanthemum morifolium*) (Grout, 1988) são fotossinteticamente competentes *in vitro*, apresentando um balanço de carbono positivo quando em cultura, continuando esse balanço positivo após transplante para aclimatização. As folhas persistentes tornam-se, assim, ao longo das quatro semanas de aclimatização, órgãos com capacidade de respiração e de consumo dos fotoassimilados formados pelas novas folhas (Donnelly & Vidaver, 1984b).

As folhas formadas *de novo* (folhas dois e três), apresentaram taxas de fotossíntese aparente 3 vezes superiores às registadas para as folhas persistentes e cerca de 50% mais do que o valor apresentado pela folha um. Também a capacidade fotossintética aumentou significativamente, na ordem dos 200%, e se registou um aumento significativo na PPFD a que ocorre saturação para a luz. Estes aspectos traduzem uma importante melhoria da competência fotossintética das plantas após o transplante e no decorrer da aclimatização que, como se referiu, é fundamentalmente devida às folhas que se diferenciam de novo (o mesmo já tinha sucedido em termos de análise de crescimento, cf ponto 3.1 deste capítulo). Esta situação tem sido referida por vários autores como Donnelly *et al.* (1984) em *Rubus idaeus*, Grout & Millam (1985) em *Fragaria x ananassa*, Smith *et al.* (1986) em *Betula platyphylla* e Lees *et al.* (1991) em *Clematis*.

A taxa de fotossíntese aparente (A) e a taxa de fotossíntese máxima (A_{max}) mostraram ser afectadas pelo regime luminoso a que as microplantas foram submetidas durante o processo de aclimatização, sendo aqueles parâmetros influenciados positivamente pelo aumento da irradiância (Tab. 4.11 e 4.12). Ao aumento da disponibilidade luminosa correspondeu, assim, um acréscimo das taxas de fotossíntese, o que se veio a reflectir nos acréscimos significativos dos parâmetros de crescimento anteriormente analisados (cf. ponto 3.1 deste capítulo). Estes dados confirmam também o que anteriormente havíamos referido sobre o facto de a taxa líquida de assimilação (NAR) ter apresentado o valor máximo nas plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aparecendo, assim, directamente correlacionada com a actividade fotossintética. Lee *et al.* (1985) não registaram acréscimos na taxa de fotossíntese líquida em microplantas de *Liquidambar styraciflua* quando o nível de irradiância variou entre 50 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mas sim quando esses níveis variaram entre 155 e $315 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Também Donnelly *et al.* (1984), em *Rubus idaeus*, verificaram uma relação directa entre a taxa de fixação de $^{14}\text{CO}_2$, o nível de irradiância e o crescimento durante a fase de aclimatização. Em geral, acréscimos de intensidade luminosa tendem a permitir acréscimos na actividade fotossintética. Lee *et al.* (1985), Kozai *et al.* (1988, 1990) e Dubé & Vidaver (1992) mostraram que a utilização de elevadas intensidades luminosas, próximas das 400 a $500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, provocam um incremento na actividade fotossintética.

Não desprezando os efeitos morfológicos da luz no aparelho fotossintético, que foram já abordados anteriormente, a luz tem um efeito significativo e mesmo determinante na capacidade fotossintética. A luz tem um grande impacto na acumulação de pigmentos fotossintéticos formados, na diferenciação dos cloroplastos e na anatomia da folha, como também foi referido. Sob baixa intensidade de luz, uma situação normal nas condições *in vitro*, a adaptação foliar é caracterizada por uma maior acumulação de pigmentos antena, deficiência na compactação dos grana e por folhas mais estreitas, com apenas uma camada de células de parênquima em paliçada. As células das plantas regeneradas *in vitro* são, em muitos aspectos, semelhantes às das folhas de sombra. Por exemplo, elas apresentam uma definição muito ténue de células de parênquima em paliçada, estando muitas vezes quase ausentes ou sendo mais pequenas e largas, quase esféricas, com abundantes espaços intercelulares (Grout & Aston, 1978; Brainerd *et al.*, 1981; Wetzstein & Sommer, 1982; Donnelly & Vidaver, 1984a; Fabbri *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1988). Como consequência, a maioria das plantas cultivadas *in vitro* não apresentam capacidade para utilizar o fluxo de radiação na sua totalidade. De facto a fotossíntese de muitas espécies cultivadas *in vitro* saturam a uma intensidade luminosa relativamente baixa, como ficou também demonstrado nas plantas de castanheiro, em especial nas folhas persistentes. Donnelly & Vidaver (1984b), Infante *et al.* (1989) e Smith *et al.* (1986) mediram intensidades de saturação de aproximadamente $150 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para *Rubus*, *Betula* e *Actinidia* respectivamente, valor ligeiramente superior ao registado nas folhas persistentes dos nossos ensaios, que foi de $\pm 100 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Contudo, Lee *et al.* (1985) mostraram que plantas com desenvolvimento sob intensidade de luz mais elevada, poderiam apresentar um ponto de saturação para a luz mais elevado.

Em geral, aumentos de luz para níveis de 400 a $500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ incrementam a actividade fotossintética. Kozai *et al.* (1988, 1990), Lee *et al.* (1985) e Dubé & Vidaver (1992) mostraram que se se fornecesse intensidades de luz mais elevadas durante as fases *in vitro*, se obtinham incrementos na fotossíntese. Contudo, Lee *et al.* (1985) referem que plantas que cresceram na presença de intensidades de luz elevadas ($314 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) apresentaram um ponto de saturação fotossintética mais baixo do que plantas que cresceram a intensidades intermédias ($115 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Este decréscimo em termos fotossintéticos foi atribuído a uma danificação específica dos

pigmentos fixadores da energia luminosa. Também Cournac *et al.* (1991) referem que a taxa fotossintética decresce durante longas exposições a elevadas intensidades de luz em plantas com crescimento sob condições fotomixotróficas, mas não em condições autotróficas. Assim, alguns dos factores intrínsecos que limitam a fotossíntese podem mediar mecanismos de fotoinibição. Dubé & Vidaver (1992) sugerem também que um progressivo ganho fotossintético pode ser obtido por cuidadosos incrementos na intensidade de luz. De acordo com estes autores, aumentos na intensidade de luz sem o correspondente incremento na concentração de CO₂ podem levar a uma fotoinibição potencial. Um fluxo excessivo de electrões nos tilacóides pode resultar na fotooxidação da membrana e na perda de eficiência fotossintética (Critchley, 1988).

Os valores de transpiração e condutância estomáticas estão em acordo com as taxas de fotossíntese instantânea registadas: tratamentos com menores taxas de fotossíntese aparente apresentaram os menores valores de transpiração e de condutância estomática (Tab. 4.11).

Comparativamente às folhas de campo de plantas micropropagadas, verifica-se ainda uma diferença significativa nas taxas de fotossíntese aparente, com valores de 4,5 contra 3,4 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ da folha três das plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 4.33A); taxa de transpiração é significativamente superior; a condutância estomática apresentando valores não significativamente diferentes (Fig. 4.33B e C, respectivamente). Romano (1994), em plantas de sobreiro micropropagadas e após 1 mês de aclimatização, refere valores muito semelhantes, 3,5 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para a taxa de fotossíntese aparente, 1,3 $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para a taxa de transpiração e 170 $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para a condutância estomática. O valor registado para a taxa de fotossíntese aparente nas plantas de campo micropropagadas com um ano de idade, 4,5 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, está muito próximo dos valores apontados por Lanteri *et al.* (1993) para a taxa de fotossíntese instantânea de plantas seminais de castanheiro com 3 anos de idade. Estes autores referem valores de taxa de fotossíntese aparente compreendidos entre 5,3 e 7,8 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, dependendo das características do grupo de plantas analisado e valores de condutância estomática a variarem entre 90 e 140 $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Verificamos ainda uma certa tendência para as microplantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro* e aclimatizadas sob o nível de irradiância mais elevado, apresentarem valores superiores na taxa fotossintética a CO₂ saturante (Tab. 4.12), o que se vem a confirmar também pelos valores do rendimento quântico aparente. Isto traduz a melhor eficiência do aparelho fotossintético desenvolvido sob condições de irradiância mais elevadas nas microplantas com enraizamento *ex vitro* (Tab. 4.14). Este melhor desempenho é consequência do facto de um melhor sistema radicular ter maior capacidade de absorção de água, permitir a formação de mais tecidos produtores ('sources') e, como tal, maior quantidade de produtos que podem ser usados na fotossíntese. A importância de um sistema radicular bem desenvolvido na capacidade fotossintética e sobrevivência na aclimatização foi também referida por Mohammed *et al.* (1992) em plantas de *Pseudotsuga menziesii*.

Do estudo da capacidade fotossintética feita em condições não limitantes, de luz e CO₂, constata-se que o enriquecimento da atmosfera em CO₂ resulta num acréscimo das taxas de fotossíntese. Isto mesmo tem sido referido por outros autores, noutras espécies (Lakso *et al.*, 1986; Desjardins *et al.*, 1987, 1995; Kozai *et al.*, 1987; Faulks & Mudge, 1988), referindo no entanto que se torna indispensável proceder a um incremento na intensidade luminosa para que o tratamento com CO₂ suplementar possa ser eficiente. Nas condições experimentais dos nossos ensaios admitimos que os valores máximos de irradiância possam atingir 400 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, valor a que foi registado a saturação.

O progressivo decréscimo nos valores dos pontos de compensação para a luz, apresentados pelas plantas com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e para as plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bem como das folhas persistentes para a folha três, traduz também o ganho de funcionalidade do sistema fotossintético na sequência do acréscimo de irradiância, bem como da alteração das condições ambientais em que ocorreu a diferenciação e expansão foliar.

4.5. Parâmetros bioquímicos

A concentração em hidratos de carbono quantificada nestes ensaios mostrou, tal como sucedera para as concentrações de clorofilas, ser influenciada de forma distinta pelos factores em estudo durante a fase de aclimatização, sistema presente no início da aclimatização, *in vitro* ou *ex vitro*, e nível de irradiância durante esta última fase do processo de micropropagação.

Assim, a concentração de glucose+frutose foi afectada pela funcionalidade do sistema radicular, tendo as plantas com enraizamento *ex vitro* apresentado valores muito superiores às plantas com enraizamento *in vitro*. A síntese de sacarose, principal produto final da actividade fotossintética e o principal hidrato de carbono translocado na planta, mostrou ser afectada pelos dois factores, tendo o nível de irradiância mais elevado permitido maior síntese, o que vem confirmar a maior capacidade e competência fotossintética das plantas aclimatizadas no nível de irradiância mais elevado. Este facto, maior capacidade de síntese de sacarose, traduz-se numa maior disponibilidade deste nutriente para ser utilizado como fonte de energia para as restantes actividades metabólicas, já que a sacarose é o principal nutriente a ser translocado para locais de consumo (Huylenbroeck & De Riek, 1995).

A concentração de amido mostrou ser significativamente afectada pela irradiância, tendo também, neste caso, as plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ acumulado uma maior quantidade desta substância de reserva. A análise da influência dos níveis de luz para cada um dos tratamentos nas concentrações de amido (Fig. 4.42), revela um acréscimo significativo, comparativamente aos valores registados nas folhas do dia zero. Este facto, que reflecte a capacidade de aquisição de mecanismos de autotrofia, tem sido referido por vários autores (Capellades *et al.*, 1991; Huylenbroeck & De Riek, 1995)

As razões entre hidratos de carbono solúveis e amido são francamente favoráveis às microplantas com enraizamento *ex vitro*, independentemente do nível de luz a que foram aclimatizadas. Este facto revela uma maior desempenho na aquisição de competência fotoautotrófica (Reuther, 1991). Esta análise das concentrações dos diferentes hidratos de carbono leva a que as plantas submetidas ao nível de maior

irradiância, em especial as plantas com enraizamento *ex vitro*, apresentem valores e índices de crescimento mais elevados que as restantes (cf. ponto 3.1 deste capítulo).

O nível de hidratos de carbono nas folhas e o seu 'turn-over' diário são muito sensíveis à intensidade de luz incidente, bem como à taxa de crescimento da planta. Assim, o menor conteúdo de hidratos de carbono solúveis e de amido nas plantas submetidas ao tratamento de menor irradiância, reflectem as diferenças nas taxas de fotossíntese entre as folhas desenvolvidas nos dois níveis de irradiância anteriormente referidas e citado também por outros autores (Lichtenthaler, 1981). Esta menor eficiência fotossintética está também associada a uma menor taxa de carboxilação das folhas desenvolvidas sob níveis de luz mais baixos e é, geralmente, consequência de menores teores de Rubisco (Chaves, 1994). Daí que estas plantas respondam, em geral, a um enriquecimento nos níveis de CO₂ ambiente, por incremento no ganho líquido de carbono pela folha e pela eficiência do uso da água.

A funcionalidade do sistema radicular desenvolvido *in vitro* é deficitária e, como tal, muitos dos fotoassimilados deverão ser consumidos na formação de novas raízes que possam garantir a sobrevivência das microplantas, pelo menos durante os primeiros dias/semanas de aclimatização, o que deverá condicionar a sua utilização na formação de novas partes aéreas. Esta situação deverá ser muito diferente das microplantas cujo sistema radicular foi formado em substrato natural, *ex vitro*. Este facto poderá explicar, em parte, as diferenças registadas nos índices de crescimento e parâmetros bioquímicos a que temos vindo a fazer referência, comparativamente às plantas com enraizamento *in vitro*. Huylenbroeck & Debergh (1996) referem que na primeira semana de aclimatização de *Spathiphyllum*, período durante o qual ocorre a formação de raízes, se regista um decréscimo significativo nas concentrações de sacarose, glucose e frutose enquanto que a concentração de amido se mantém constante. Para estes autores, o facto de as microplantas serem fotossinteticamente activas no início da fase de aclimatização é de importância secundária. Referem então que o requisito básico para a sobrevivência das microplantas na primeira semana de aclimatização será a disponibilidade de nutrientes de reserva, em especial sacarose, pois uma vez iniciado o processo de formação de novas raízes e novas folhas, as plantas passam a ter capacidade de autosuficiência.

Comparando com os valores quantificados nas folhas de campo de plantas micropropagadas (Tab. 4.17), verificamos que, em termos de concentração absoluta, os diferentes hidratos de carbono são bastante superiores comparativamente aos quantificados no final do período de aclimatização, mas que a razão entre solúveis e amido se apresenta dentro dos valores máximo e mínimo determinados no final daquela fase. Estes valores mais elevados das folhas de campo poderão ser explicados pela maior capacidade fotossintética exibida por este tipo de folhas e que anteriormente fizemos referência.

As concentrações de proteína registados após os tratamentos de aclimatização, reflectem as capacidades de síntese mais elevadas, demonstradas pelas plantas com o sistema radicular desenvolvido *ex vitro*. Nestas, o regime luminoso mostrou também influenciar significativamente este parâmetro, tendo sido as plantas submetidas a maior irradiância as que apresentaram concentrações mais elevadas. Estes resultados comprovam, assim, a actividade metabólica mais eficaz deste tipo de plantas. Comparativamente com os valores registados nas folhas de campo, verificamos que as folhas dois e três das plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentam valores bastante semelhantes, o que indica uma certa normalização dos seus mecanismos de síntese. Ao contrário, em videira, Rebordão (1994) refere que a maior disponibilidade luminosa provocou um decréscimo de 50% no teor de proteína além de não se verificarem diferenças significativas resultantes do tipo de folha

Os factores que estiveram em estudo nesta fase, e que foram: o tipo de sistema radicular que as plantas possuíam no início da fase de aclimatização, *in vitro* e *ex vitro*, e o nível de irradiância a que se submeteram as plantas durante a fase de aclimatização, 150 e $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mostraram provocar diferenças significativas nos parâmetros e índices de crescimento, anatomia foliar, controlo na perda de água, clorofilas, fotossíntese, hidratos de carbono e proteína solúvel total, das plantas de castanheiro regeneradas *in vitro*, tal como acabou de ser discutido.

De facto, a existência de um sistema radicular desenvolvido *ex vitro* associado com a utilização de uma irradiância de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante a aclimatização, mostrou provocar uma resposta significativamente superior em termos de parâmetros

quantificadores do crescimento e desenvolvimento vegetativo das microplantas de castanheiro. Estas plantas apresentaram acréscimos significativos na biomassa, resultante da formação de maior número de estruturas novas, folhas, caule e raízes. Correspondeu também a um aumento de área e peso seco foliar, fundamentalmente em consequência da formação e desenvolvimento de folhas novas. A taxa de crescimento relativo, que traduz a eficiência da planta como produtora de biomassa, foi também superior, pelo que se pode afirmar que estas plantas apresentaram um balanço mais favorável entre ganhos e perdas de carbono devidas à fotossíntese e respiração e a uma maior eficiência na utilização dos assimilados investidos no aparelho fotossintético. O aumento de irradiância parece não comprometer a sobrevivência, pelo que a sobrevivência na aclimatização parece depender mais directamente da funcionalidade do sistema radicular que a planta tem quando inicia o seu processo de aclimatização.

Os dois níveis de irradiância utilizados nestes ensaios, não provocaram uma influência nitida na anatomia das folhas em termos qualitativos, e só na análise de alguns parâmetros quantitativos foi possível verificar esse efeito. No entanto foi a sua influência foi significativa na diferenciação e desenvolvimento de estruturas e tecidos foliares à medida que se assistiu à formação de novas folhas, traduzindo assim, uma progressiva adaptação das microplantas a condições ambientais cada vez mais próximas das condições naturais de luz e humidade.

Também a taxa de perda de água se mostrou tendencialmente menor nas folhas das plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a maior irradiância.

As plantas com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas sob menor irradiância foram as que apresentaram valores superiores para a clorofila total, mas com o valor mais baixo na razão entre clorofila a/b, o que não impediu estas plantas de apresentarem taxa de fotossíntese aparente, taxa de transpiração, condutância estomática, capacidade fotossintética, rendimento quântico aparente e ponto de compensação para a luz, dentro de valores muito semelhantes aos determinados para os restantes grupos de plantas. As diferenças significativas registaram-se quando se compararam as performances dos diferentes tipos de folhas que se vão diferenciando no decorrer da aclimatização. Estas diferenças, com valores cada vez mais próximos aos apresentados pelas folhas de campo à medida que as novas folhas se vão desenvolvendo, são a confirmação da importância que

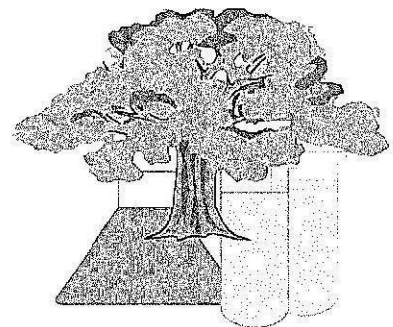
tem a fase de aclimatização na obtenção de plantas com capacidade de virem a continuar o seu desenvolvimento e crescimento em condições de campo. Estes valores foram tendencialmente superiores nas plantas aclimatizadas a maior irradiância, pelo que a uma maior disponibilidade luminosa correspondeu um acréscimo na competência fotossintética, quer aparente quer de capacidade, melhoria no rendimento quântico e decréscimo nos valores do ponto de compensação para a luz. Este desempenho fotossintético veio a reflectir-se nos significativos acréscimos dos parâmetros de crescimento por parte deste grupo de plantas. Esta maior eficiência fotossintética está associada a uma maior taxa de carboxilação das folhas desenvolvidas sob níveis de luz mais elevados, daí que estas plantas respondam de uma forma mais eficaz a um enriquecimento nos níveis de CO₂ ambiente, por incremento no ganho líquido de carbono pela folha e pela eficiência do uso da água. A melhor eficiência fotossintética permite também o aumento das disponibilidades em hidratos de carbono solúveis e amido nas folhas em resposta ao aumento de irradiância por parte das folhas com raízes desenvolvidas *ex vitro* o que parece, assim, indicar a aquisição de um cada vez melhor comportamento autotrófico. Também a concentração de proteína mais elevada por parte das plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a maior irradiância reflecte a maior capacidade de síntese por parte destas plantas.

Na Tabela 4.20 apresentam-se os resultados mais significativos provocados pelos factores em estudo nas plantas de castanheiro regeneradas *in vitro* e registados no final da fase de aclimatização.

Tabela 4.20. Características das microplantas após a fase de aclimatização de acordo com as condições de rizogênese e irradiância.

Expressão e desenvolvimento radicular	Luz na aclimatização ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Clorofilas	Fotossíntese	Metabolitos	Análise de crescimento
<i>In vitro</i>	150	+ Cl_{total}	< A	≈ gluc+frut	> aérea/raiz
		< Cl_g/Cl_b	< E	< sacarose	> LWR
			< G	< amido	> SLA
			< A_{max}	≈ sol/amido	> LAR
			< ϕ	< proteína	
			> I_0		
<i>Ex vitro</i>	250	- Cl_{total}	> A	≈ gluc+frut	+ crescimento relativo
		> Cl_g/Cl_b	> E	> sacarose	+ biomassa
			> G	> amido	+ área foliar
			> A_{max}	≈ sol/amido	> RGR
			> ϕ	> proteína	> NAR
			< I_0		

CONSIDERAÇÕES FINAIS



O castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) é uma das espécies lenhosas de grande importância económica em Portugal quer pelo seu fruto quer pela qualidade da sua madeira. Em consequência do aparecimento da doença da tinta no início deste século, e gradual substituição por outras espécies de maior rentabilidade, a cultura tem vindo progressivamente a ver diminuída a sua área de distribuição. Dada a quase total ausência de resistência desta espécie aos fungos *Phytophthora* spp., agentes da chamada doença da tinta, nas décadas de 60-70 foram desenvolvidos trabalhos de hibridação com outras espécies, nomeadamente a *Castanea crenata*, por forma a obter plantas que apresentassem capacidade de resistência e, em simultâneo, afinidade para com as variedades portuguesas de castanheiro. No entanto, a propagação vegetativa destes clones híbridos desde cedo deparou com grandes dificuldades dada a incapacidade desta espécie enraizar por métodos convencionais. Assim, a micropropagação aparece como uma alternativa de extrema importância no sentido de permitir a multiplicação em larga escala de clones seleccionados pelas suas características de resistência à doença da tinta. Nesse sentido, este trabalho pretendeu aprofundar alguns aspectos relacionados com as fases de enraizamento e aclimatização, as quais continuam ainda a ser parcialmente limitadoras para a utilização comercial destas metodologias na multiplicação vegetativa do castanheiro.

A micropropagação por rebentamento axilar envolve a cultura de explantes e a produção de rebentos que são induzidos a formar raízes adventícias, normalmente após estímulo auxínico. Estes rebentos enraizados são depois transferidos para estufas onde são aclimatizados para posterior plantação no campo. Este processo inclui, assim, duas fases em tudo distintas: uma primeira fase que se desenrola em condições artificiais, sob humidade relativa elevada, baixas intensidades luminosas, restrição de trocas gasosas e na presença de uma fonte de carbono assimilável; uma segunda fase, aclimatização, em que se assiste a uma progressiva aquisição de capacidade autotrófica para desenvolvimento e crescimento em condições ambientais naturais das plantas regeneradas *in vitro*.

Na primeira fase, para além da necessária existência de protocolos que permitam uma capacidade de multiplicação eficiente, é de primordial importância a formação e funcionalidade de um sistema radicular. As estratégias possíveis de seguir, *in vitro* ou *ex vitro*, são condicionadas pela espécie e pelo estado fisiológico dos rebentos formados na fase de multiplicação, sendo de grande importância a compreensão dos factores que

directa ou indirectamente intervêm no desencadear e promover deste processo. Dentro deles são geralmente referidos as auxinas, peroxidases e poliaminas, para além dos factores físicos associados às condições ambientais em que o processo se desenrola.

Na segunda fase, torna-se necessária a adaptação da planta regenerada *in vitro* às condições de crescimento natural, por outras palavras, é necessário aclimatizá-la. Neste processo, o controlo dos factores ambientais, luz, humidade e temperatura são determinantes para o sucesso.

Neste trabalho estudaram-se dois métodos de indução rizogénica, associados a dois métodos de expressão e desenvolvimento radicular. Ambos os métodos de indução (rebentos em contacto com AIB 3 mg l^{-1} no meio de cultura durante 5 dias e rebentos induzidos por imersão numa solução de AIB 1 g l^{-1} durante 1 min) apresentaram capacidade de indução rizogénica, no entanto a percentagem de enraizamento foi afectada pelo sistema de expressão e desenvolvimento radicular usado (em meio agarizado *-in vitro*, ou numa mistura de turfa e perlite *-ex vitro*). Os melhores resultados na percentagem de enraizamento foram obtidos quando se fez a expressão e desenvolvimento radicular em condições *in vitro*, com 97 e 93% para cada um dos métodos de indução, não apresentando diferença significativa para a combinação de indução com AIB no meio e expressão e desenvolvimento *ex vitro* (87% de enraizamento). No entanto a sobrevivência na aclimatização foi fortemente condicionada pelo tipo de sistema radicular que as microplantas possuíam. De facto as plantas com enraizamento *ex vitro* apresentaram uma taxa de sobrevivência de 100%, contra apenas 50% das plantas com enraizamento *in vitro*. Estudos do sistema radicular vieram mostrar que as raízes *ex vitro* apresentam estrutura ramificada, presença de pêlos radiculares e quase ausência de *callus* na zona de diferenciação radicular; em termos anatómicos, apresentaram uma melhor organização e diferenciação dos tecidos vasculares e melhor estabelecimento de conexões vasculares com o caule comparativamente com as raízes *in vitro*. O estudo anatómico da rizogénese revelou que a reacquirição da capacidade meristemática provocada pelo tratamento de indução, ocorre nas células indiferenciadas produzidas pelo câmbio vascular e ainda muito próximas deste. Esta alteração anatómica foi registada 24 h após o início do tratamento indutor, após o que se assistiu a uma progressiva evolução para a formação de meristemóides e primórdios cuja emergência se veio a verificar após 12-14 dias de

tratamento. O comportamento da actividade peroxidásica durante este período não foi de modo a permitir uma correlação directa com esta resposta anatómica, no entanto, após um decréscimo na sua actividade às 12 horas, começou a registar-se um gradual incremento, o que testemunha a sua intervenção directa neste processo de rizogénese, embora sem possibilidade de definir um comportamento marcador deste processo. Já o comportamento das concentrações de AIA, AIA_{sp} e AIB permitiu estabelecer uma directa correlação destas substâncias no processo, confirmada pelas significativas diferenças entre as concentrações da parte basal e parte apical dos rebentos e os respectivos controlos. O aumento da concentração endógena de AIA até um máximo no dia 2, é um forte indicador das transformações bioquímicas que se deverão dar ao nível celular, por forma a que algumas das células derivadas do câmbio possam adquirir competência meristemática orientada para a formação de futuros meristemóides radiculares. Este dado está de acordo com a observação anatómica que se tem ao dia 2, em que a visualização de células que readquiriram capacidade meristemática é já uma evidência segura. A significativa descida dos níveis de AIA após o dia 2, reflecte a necessidade de menores níveis de AIA nas células o que deverá permitir a continuidade do processo que em termos anatómicos se traduz pela definição e organização de meristemóides entre os dias 3 e 4 e sua posterior evolução para primórdios radiculares entre os dias 6 e 8, a que se segue a sua emergência entre os dias 12 e 14.

Na fase de aclimatização foram estudados os efeitos dos factores tipo de sistema radicular que as plantas possuíam (*in vitro* e *ex vitro*) e intensidade de luz a que as plantas foram submetidas (150 e $250 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), no crescimento e desempenho fisiológico. Para a sua avaliação foram quantificados parâmetros de crescimento, de anatomia e fisiologia foliar e de natureza fisiológica, como controlo na perda de água, concentração de clorofilas, avaliação do desempenho fotossintético e concentrações foliares de hidratos de carbono e proteínas. As microplantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apresentaram uma resposta significativamente superior em termos de desenvolvimento e crescimento comparativamente com todos os outros grupos. Estas plantas apresentaram acréscimos significativos na biomassa, área e peso seco foliar, taxa de crescimento relativo e taxa líquida de assimilação (NAR), que triplicou comparativamente à NAR dos outros grupos de plantas, confirmando-se assim uma

correlação positiva entre a NAR e a radiação incidente. Estas plantas apresentaram um balanço mais favorável entre ganhos e perdas de carbono devidas à fotossíntese e respiração e uma maior eficiência na utilização dos assimilados investidos no aparelho fotossintético. Este aumento de irradiância parece não comprometer a sobrevivência, pelo que esta parece depender mais da funcionalidade do sistema radicular que a planta tem quando inicia o seu processo de aclimatização. As folhas formadas *in vitro*, na fase de multiplicação, apresentaram uma limitada capacidade de acréscimos quer na área, quer em peso, apesar de se manterem fisiologicamente activas durante a fase de aclimatização. Não se observou uma influência nítida dos tratamentos na anatomia das folhas em termos qualitativos, já na análise de alguns parâmetros quantitativos foi possível concluir que as plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas sob maior irradiância apresentaram estruturas anatómicas bem mais próximas das apresentadas pelas folhas de plantas micropropagadas já instaladas no campo. No entanto foi significativa a influência destes factores na diferenciação e desenvolvimentos das estruturas e tecidos foliares à medida que se assistiu à formação de folhas novas, traduzindo assim uma progressiva adaptação das microplantas a condições ambientais cada vez mais próximas das condições naturais de luz e humidade. Esta adaptação traduziu-se num aumento de espessura, acréscimo de diferenciação de tecidos condutores e de suporte na nervura principal, redução no número de células, acréscimo na diferenciação e conseqüente aumento na proporção de parênquima em paliçada comparativamente ao parênquima lacunoso, redução na frequência estomática e alterações na sua morfologia. Estas alterações na morfologia e decréscimo na frequência estomática foram independentes do regime luminoso a que as plantas estiveram sujeitas durante a fase de aclimatização, e apenas tiveram significado quando se compararam as folhas que se vão desenvolvendo no decorrer deste processo. Assim, a taxa de perda de água mostrou-se tendencialmente menor nas folhas das plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a maior irradiância e com mais significado para a folha dois e três que tiveram a sua diferenciação já no decorrer do processo de aclimatização.

As plantas com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas sob menor irradiância foram as que apresentaram valores superiores para a clorofila total, mas com o valor mais baixo na razão entre clorofila a/b. Mais uma vez se registaram diferenças significativas quando se

comparam as performances fotossintéticas dos diferentes tipos de folhas que se vão diferenciando no decorrer da aclimatização. Estas diferenças, com valores cada vez mais próximos aos apresentados pelas folhas de campo à medida que as novas folhas se vão formando, são a confirmação da importância que tem a fase de aclimatização na obtenção de plantas com capacidade de virem a continuar o seu desenvolvimento e crescimento em condições de campo. As folhas persistentes das plantas de castanheiro apresentaram concentrações de clorofila e razão de clorofila a/b elevadas, que se traduziu em competência fotossintética, tendo apresentado uma taxa de fotossíntese aparente positiva, bem como acréscimos de taxa fotossintética a CO₂ saturante em resposta ao acréscimo da PPFD. No entanto quando comparamos os valores registados para estas folhas com os obtidos na folha dois e três, onde as concentrações de clorofila foram inferiores, verificamos a grande diferença que se regista na funcionalidade do aparelho fotossintético. De facto as novas folhas formadas apresentaram taxas de fotossíntese aparente 3 vezes superiores às registadas para as folhas persistentes, uma capacidade fotossintética acrescida em mais de 200%, para além de registarem um aumento significativo a que ocorre saturação para a luz. Estes valores foram superiores nas plantas aclimatizadas a maior irradiância, pelo que a uma maior disponibilidade luminosa correspondeu um acréscimo na competência fotossintética, melhoria no rendimento quântico e decréscimo nos valores do ponto de compensação para a luz. Este desempenho fotossintético veio a reflectir-se em acréscimos significativos nos parâmetros de crescimento por parte deste grupo de plantas.

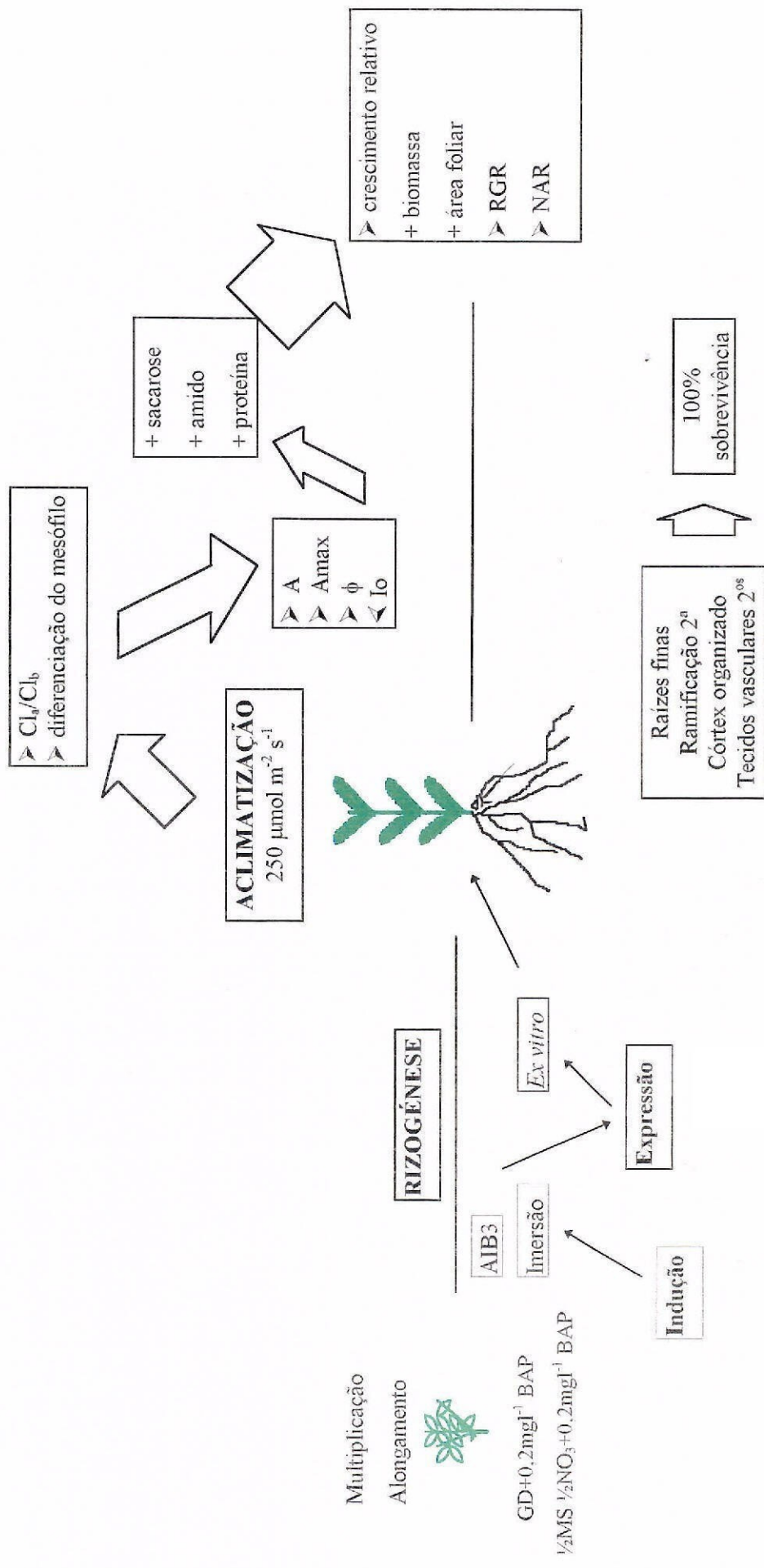
O aumento das disponibilidades em hidratos de carbono solúveis e amido nas folhas das plantas com raízes *ex vitro*, em resposta ao aumento de irradiância, parece indicar a aquisição de um cada vez melhor comportamento autotrófico. Também a concentração de proteína mais elevada por parte das plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a maior irradiância, reflecte a maior capacidade de síntese por parte destas plantas. Verificou-se que as concentrações de proteína ao nível da folha dois e três apresentaram valores muito semelhantes aos registados para as folhas de campo, o que indica uma certa normalização dos mecanismos de síntese e traduz um maior investimento em novas estruturas que acompanham o aumento de biomassa verificado.

Em síntese, podemos referir que as características do sistema radicular que as plantas de castanheiro regeneradas *in vitro* apresentam ao iniciar a fase de aclimatização são determinantes no sucesso que se regista no que diz respeito às taxas de sobrevivência obtidas. A funcionalidade do sistema radicular desenvolvido directamente num substrato de perlite e turfa, em condições *ex vitro*, comparativamente ao sistema radicular desenvolvido em meio agarizado, *in vitro*, é manifestamente superior, o que se traduziu numa taxa de sobrevivência de exactamente o dobro.

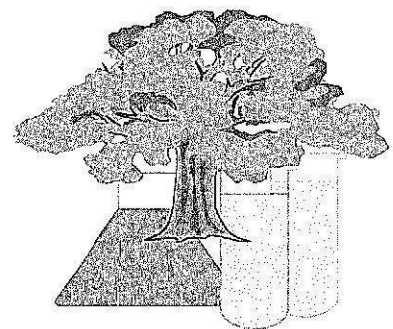
As metodologias agora discutidas parecem ser susceptíveis de proporcionarem resultados viáveis em termos comerciais. De facto, percentagens de enraizamento de 80% associadas a uma eficácia total na aclimatização, são valores que deverão garantir a utilização da micropropagação para a propagação vegetativa de clones seleccionados de castanheiro. O processo não deixa, contudo, de ser dispendioso, não permitindo a obtenção de uma planta a custos idênticos a plantas seminais. Assim, a produção de plantas micropropagadas deverá ser orientada ou para a produção de porta-enxerto certificados ou, e será uma via a explorar, para produção de pés-mães para estacaria, tirando partido da capacidade de rejuvenescimento geralmente apresentada por estas plantas.

Níveis de irradiância superiores aos usados nestes ensaios poderão ser ainda promotores de um mais acentuado desenvolvimento, e conseqüente redução do período de aclimatização, que poderá ter mais impacto se for acompanhado de um incremento na concentração de CO₂ ambiente por forma a permitir rentabilizar as capacidades fotossintéticas que comprovadamente o acréscimo de luz provoca. No entanto, e em termos de utilização comercial de um sistema de micropropagação de castanheiro, a introdução deste novo factor na aclimatização, CO₂, só deverá ser feita após uma definição precisa da relação custo/benefício.

Na página seguinte apresenta-se um modelo para o conjunto de resultados obtidos na fase de enraizamento e aclimatização das plantas de castanheiro regeneradas *in vitro*, após acção dos factores que estiveram em estudo neste trabalho.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Ahuja, M.R. (ed.), 1993. *Micropropagation of Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 507 pp.
- Aitken-Christie, J. & Thorpe, T., 1984. Clonal propagation: Gymnosperms. In: I.K. Vasil (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, pp. 82-95. Academic Press Inc., Orlando.
- Al Barazi, Z. & Schwabe, W.W., 1984. The possible involvement of polyphenol-oxidase and the auxin-oxidase system in root formation and development of cuttings of *Pistacia vera*. *J. Hortic. Sci.*, 59:453-461.
- Altamura, M.M., Torrigiani, P., Capitani, F., Scaramagli, S. & Bagni, N., 1991. *De novo* root formation in tobacco thin layer is affected by inhibition of polyamines biosynthesis. *J. Exp. Bot.*, 42:1575-1582.
- Amon, D.I., 1938. Micronutrients in culture-solution experiments with higher plants. *Ann. J. Bot.*, 25:322.
- Amon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24:1-15.
- Apter, R.C., McWilliams, E.I. & Davies Jr, F.T., 1993a. *In vitro* and *ex vitro* adventitious root formation in Asian jasmine (*Trachelospermum asiaticum*). I. Comparative morphology. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118:902-905.
- Apter, R.C., McWilliams, E.I. & Davies Jr, F.T., 1993b. *In vitro* and *ex vitro* adventitious root formation in Asian jasmine (*Trachelospermum asiaticum*). I. Physiological comparisons. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118:906-909.
- Areses, M.L. & Vieitez, E., 1970. Monthly variations in the content of growth substances and inhibitors in cuttings leaf buds and leaves of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Ann. Edafol. Agrobiol.*, 29:625-630.
- Argles, G.K., 1959. Root formation and root development in stem cuttings: a re-examination of certain fundamental aspects. *Annals of Applied Biology*, 47:626-628.
- Auderset, G., Gavillet, S., Micheli, J., O'Rourke, J., Ribaux, M. & Moncousin, Ch., 1994. Histological analysis and the evolution of biochemical markers during *in vitro* rooting of *Malus domestica* Borkh. 'Jork 9'. *Adv. Hort. Sci.*, 8:5-10.
- Bagni N., Altamura M., Biondi S., Mengoli M. & Torrigiani P., 1993. Polyamines and morphogenesis in normal and transgenic plant cultures. In: K. Roubelakis-Angelakis & K. Tran Than Van (eds.), *Morphogenesis in Plants - Molecular Approaches*, pp. 89-112. Plenum Press, New York.
- Ballester, A., Sánchez, M.C., Vieitez, A.M., 1989. Etiolation as a pretreatment for *in vitro* establishment and multiplication of mature chestnut. *Physiol. Plant.*, 77:395-400.
- Bassuk, N.L, Hunter, L.D. & Howard, B.H., 1981. The apparent involvement of polyphenol oxidase and phloridzin in the production of apple rooting co-factors. *J. Hortic. Sci.*, 56:313-322.

- Bastin, M., 1966. Root initiation, auxin level and biosynthesis of phenolic compounds. *Photochem. Photobiol.*, 5:423-429.
- Berthon, J., Boyer, N. & Gaspar, T., 1987. Sequential rooting media and rooting capacity of *Sequoiadendron giganteum in vitro*. Peroxidase activity as a marker. *Plant Cell Reports*, 6:341-344.
- Berthon, J.Y., Ben Tahar, S., Gaspar, T. & Boyer, N., 1990. Rooting phases of shoots of *Sequoiadendron giganteum in vitro* and their requirements. *Plant Physiol. Biochem.*, 28:631-638.
- Biondi, S., Canciani, L., De-Paoli, G. & Bagni, N., 1981. Shoot formation from bud cultures of mature chestnut. In: *Colloque International sur la Culture In vitro des Essences Forestières*, AFOCEL, pp. 181-186. Fontainebleau, France.
- Biondi, S., Diaz, T., Iglesias, M., Gamberini, G., Bagni, N., 1990. Polyamines and ethylene in relation to adventitious root formation in *Prunus avium* shoot cultures. *Physiol. Plant.*, 78:474-483.
- Biran, I. & Halevy, A.H., 1973. Endogenous levels of growth regulators and their relationship to the rooting of *Dahlia* cuttings. *Physiol. Plant.*, 28:244-247.
- Bjorkman, O., 1981. Responses to different quantum flux densities. In: O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond & H. Ziegler (eds.), *Responses to the Physical Environment*. *Physiol. Plant Ecol.* I. Vol. 12A, pp.57-107. Springer-Verlag, Berlin.
- Blakesley D., 1994. Auxin metabolism and adventitious root formation. In: T. Davies & B. Haissig (eds.), *Biology of Adventitious Root Formation*, pp. 143-154. Plenum Press, New York.
- Blakesley, D., Weston, G.D. & Hall, J.F., 1991. The role of endogenous auxin in root initiation. Part I: evidence from studies on auxin application, and analysis of endogenous levels. *Plant Growth Regulation*, 10:314-353.
- Blanke, M. & Belcher, A., 1989. Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 19:85-89.
- Boardman, N.K., 1977. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 28:355-912.
- Bollmark, M. & Eliasson, L., 1986. Effects of exogenous cytokinins on root formation in pea cuttings. *Physiol. Plant.*, 68:662-666.
- Bonga, J. & Durzan, D.J. (eds.), 1987. *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague. 1285 pp.
- Bonga, J. & Von Aderkas, P., 1992. *In Vitro Culture of Trees*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 236 pp.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-259.

- Brainerd, K.E. & Fuchigami, L.H., 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 106(4):515-518.
- Brainerd, K.E. & Fuchigami, L.H., 1982. Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, manitol, ABA and CO₂. *J. Exp. Bot.*, 33:388-392.
- Brainerd, K.E., Fuchigami, L.H., Kwiatkowski, S. & Clark, C.S., 1981. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured "pixy" plum grown under different environments. *HortScience*, 16:173-175.
- Bressan, O.G., Kim, Y.J., Hyndman, S.E., Hasegawa, P.M. & Bressan, R.A., 1982. Factors affecting *in vitro* propagation of rose. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 107:979-990.
- Burtin, D., Martin-Tanguy, J. Paynot, M. & Rossin, N., 1989. Effects of suicide inhibitors of arginine and ornithine decarboxylase activities on organogenesis, growth, free polyamine and hydroxycinnamoyl putrescine levels in leaf explants of *Nicotiana xanthi* M.C. cultivated *in vitro* in a medium producing callus formation. *Plant Physiol.*, 89:104-110.
- Caboni E., Boumis G. & Damiano C., 1992. Effects of phenols, gibberellic acid and carbohydrates on the rooting of the apple rootstock M9 Jork. *Agronomie*, 12:789-794.
- Caboni, E., Damiano, C. & Tonnarini, S., 1994. Effect of phenols on peroxidase activity and *in vitro* rooting of 'M9 Jork'. *Adv. Hort. Sci.*, 8:49-51.
- Capellades, M., 1989. *Histological and ecophysiological study of the changes occurring during acclimatization of in vitro cultured roses*. PhD Thesis. State Univ. Gent, Belgium. 97 pp.
- Capellades, M., Fontarnau, R., Carulla, C. & Debergh, P., 1990. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. *J. Amer. Hort. Sci.*, 115: 141-145.
- Cappellades, M., Lemeur, R., & Debergh, P., 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 25:21-26.
- Cassels, A., 1991. Problems in tissue culture: culture contamination. In: P.C. Debergh & R.H. Zimmerman (eds.), *Micropropagation. Technology and Application*, pp. 31-44. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht.
- Cervelli, R. & Senaratna, T., 1995. Economic aspects of somatic embryogenesis. In: J. Aitken-Christie, T. Kozai & M. Lila Smith (eds.), *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, pp. 29-64. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht.
- Chaves, M.M., 1994. Environmental constraints to photosynthesis in *ex vitro* plants. In: P.J. Lumdsen, J.R. Nicholas & W.J. Davies (eds.), *Physiology. Growth and Development of Plants in Culture*, pp. 1-18. Kluwer Academic Pub., Dordrecht.
- Chevre, A.M., Gill, S.S., Mouras, A. & Salesses, G., 1983. *In vitro* vegetative multiplication of chestnut. *J. Hort. Sci.*, 58:23-29.

- Clark, L.C., 1956. Monitor and control of blood and tissue oxygen tension. *Transactions of the American Society for Artificial Internal Organs*, 2:41.
- Compton, M. & Preece, J., 1986. Exudation and explant establishment. *Newsletter*, 50:9-18.
- Conner, L.N. & Conner, A.J., 1984. Comparative water loss from leaves of *Solanum laciniatum* plants cultured *in vitro* and *in vivo*. *Plant Sci. Lett.*, 36:241-246.
- Conover, C.A. & Poole, R.T. 1984. Acclimatization of indoor foliage plants. *Hortic. Rev.*, 6:120-154.
- Coumac, L., Dimon, B., Carrier, P., Lohou, A. & Chagvardieff, P., 1991. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* under different conditions of aeration, sucrose supply and CO₂ enrichment. *Plant Physiol.*, 97:112-117.
- Critchley, C., 1988. The molecular mechanism of photoinhibition - Facts and fiction. *Aust. J. Plant Physiol.*, 15:27-41.
- Curir, P., Van Sumere, C.F., Termini, A., Barthe, P., Marchesini, A. & Dolci, M., 1990. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious root formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. *Plant Physiol.*, 92:1148-1153.
- Dale, J.E., 1988. The control of leaf expansion. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 39:291-300.
- Danby, S., Hampson, S.P., Joshi, S., Sigee, D.C. Epton, H.A.S. & Leifert, C., 1994. Activity of antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* against common fungal contaminants of plant tissue cultures. In: P.J. Lumdsen, J.R. Nicholas & W.J. Davies (eds), *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*, pp. 404-408. Kluwer Academic Pub., Dordrecht.
- Davies, F.T., Lazarte, J.E. & Joiner, J.N., 1982. Initiation and development of adventitious roots in stem cuttings in juvenile and mature leaf bud of *Ficus pumila* L. *Am. J. Bot.*, 69:804-811.
- Davies, T.D. & Haissig, B. (eds), 1994. *Biology of Adventitious Root Formation*. Plenum Press, New York. 343 pp.
- Davies, T.D., Haissig, B.E. & Sankhla, N., 1988. *Adventitious Root Formation in Cuttings*. Dioscorides Press, Portland.
- Davies, T.D. & Hartmann, H., 1988. The physiological basis of adventitious root formation. *Acta Hort.*, 227:113-120.
- De Klerk, G., Brugge, J.T., Smulders, R & Benschop, M., 1990. Basic peroxidases and rooting in microcuttings of *Malus*. *Acta Hort.*, 280:29-36.
- De Klerk, G., Keppel, M., Brugge, J.T. & Meekes, H., 1995. Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. *J. Exp. Botany*, 46(289):965-972.

- De Proft, M.P., Maene, L.J. & Debergh, P., 1985. Carbon dioxide and ethylen evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 65:375-379.
- Debergh, P.C. & Maene, L.J., 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort.*, 14: 335-345.
- Debergh, P.C. & Read, P.E., 1991. Micropropagation. In: P.C. Debergh & R.H. Zimmerman (eds.), *Micropropagation, Technology and Application*, pp. 1-13. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht.
- Debergh, P.C. & Zimmerman, R.H., (eds.) 1991. *Micropropagation. Technology and Application*. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht. 484 pp.
- Desjardins, Y., Gosselin, A. & Lamarre, M., 1990. Growth of transplants and *in vitro*-cultured clones of *Asparagus* in response to CO₂ enrichment and supplemental lighting. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115:364-368.
- Desjardins, Y., Gosselin, A. & Yelle, S., 1987. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂-enriched environments and supplementary lighting. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 112:846-851.
- Desjardins, Y., Hdider, C. & de Riek, J., 1995. Carbon nutrition *in vitro* - regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In: J. Aitken-Christie, T. Kozai, & M.L. Smith (eds.), *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, pp. 441-471. Kluwer Academic Pub., Dordrecht.
- Desjardins, Y., Laforge, F., Lussier, C. & Gosselin, A., 1988. Effect of CO₂ enrichment and high photosynthetic photon flux on the development of autotrophy and growth of tissue-cultured strawberry, raspberry and asparagus plants. *Acta Hort.*, 230:45-53.
- Dhawan, V. & Bhojwani, S., 1987. Hardening *in vitro* and morpho-physiological changes in the leaves during acclimatization of micropropagated plants of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Plant Science*, 53:65-72.
- Díaz-Pérez, J.C, Shackel, K.A. & Sutter, E.G., 1995. Effects of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120(3):435-440.
- Diettrich, B., Mertinat, H. & Luckner, M., 1992. Reduction of water loss during *ex vitro* acclimatization of micropropagated *Digitalis lanata* clone plants. *Biochemie und Physiol. Pflanzen.*, 188:23-31.
- Donnelly, D.J., 1986. External leaf features of tissue-cultured 'Silvan' blackberry. *HortScience*, 21:306-308.
- Donnelly, D.J. & Vidaver, W.E., 1984a. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. *J. Amer. Hort. Soc. Sci.*, 109:172-176.
- Donnelly, D.J. & Vidaver, W.E., 1984b. Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. *J. Amer. Hort. Soc. Sci.*, 109:177-181.

- Donnelly, D.J., 1986. External leaf features of tissue-cultured 'Silvan' blackberry. *HortScience*, 21:306-308.
- Donnelly, D.J., Vidaver, W.E. & Colbow, K., 1984. Fixation of $^{14}\text{CO}_2$ in tissue cultured red raspberry prior and after transfer to soil. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 4:43-50.
- Donnelly, D.J., Vidaver, W.E. & Lee, K.Y., 1985. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 4:43-50.
- Driver, J. & Suttle, G., 1987. Nursery handling of propagules. In: J. Bonga & D. Durzan (eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol 2, pp. 320-335. Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht.
- Druart, P., Kevers, C., Boxus, P & Gaspar, T., 1982. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. *Z. Pflanzenphysiol.*, 108:429-436.
- Dubé, S.L. & Vidaver, W., 1992. Photosynthetic competence of plantlets grown *in vitro*. An automated system for measurement of photosynthesis *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 84:409-416.
- Dumas, E., 1986. Micropropagation d'un clone âgé de pin maritime en vue de l'obtention de pieds-mères. *Ann. Rech. Sylvicoles*, AFOCEL, pp. 96-107. France.
- Economu, A.S. & Read, P.E., 1987. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. *HortScience*, 22:751-754.
- Edson, J. L., Wenny, D. L. & Leege-Brusven, A., 1994. Micropropagation of Pacific Dogwood. *HortScience*, 29:1355-1356.
- Epstein, E. & Lavee, S., 1987. Conversion of indole-3-butyric acid to indole-3-acetic acid by cuttings of grape vine (*Vitis vinifera*) and olive (*Olea europaea*). *Plant Cell Physiol.*, 25:679-703.
- Fabbri, A., Sutter, E. & Dunston, S.K., 1986. Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. *Scientia Hort.*, 28:331-337.
- Faulks, L. & Mudge, K.W., 1988. Optimization of environmental conditions of stage IV micropropagated grapes. *HortScience*, 23:757 (Abs).
- Fernandes, C.T., 1948. A actividade desenvolvida para a solução de alguns problemas relativos ao castanheiro. *Direcção Ger. Serviços Florestais e Aquícolas*, XXIV:221-251.
- Fernandes, C.T., 1957. O combate à doença da tinta dos castanheiros no ano de 1947. Estudos e Tratamentos. *Direcção Ger. Serviços Florestais e Aquícolas*, XV:41-61.
- Fernandes, C.T., 1970. Defesa e melhoramento do castanheiro. Aspectos fitopatológicos. Direcção Ger. Serviços Florestais e Aquícolas. *Estudos e Informação*, pp. 253-231.
- Fernandes, C.T., 1972. Aspects de l'amélioration du châtaignier pour la résistance à la "maladie de l'encre". In: *Actas III Cong. Un. Fit. Med.*, Oeiras. pp. 314-320.

- Fernandes, C.T., 1982. O castanheiro e a noqueira. Sua importância do ponto de vista socio-económico. *Revista de Ciência Agrárias*, V:113-142.
- Fouret, Y., Arnaud, Y., Maldiney, R., Sotta, B. & Miginiac, E., 1986. Relation entre rhizogenèse et teneur en auxine et acide abscissique chez trois clones de *Sequoia sempervirens* (Endl.) issues d'arbres d'âge différent. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sér. III*, 303:135-138.
- Francllet, A., Boulay, M., Bekkaoui, F., Fouret, Y., Verschoore-Martouzet, B. & Walker, N., 1987. Rejuvenation. In: J. Bonga & D. Durzan (eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol 1, pp. 232-248. Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht.
- Fuchigami, L.H., Cheng, T.Y. & Soelner, A., 1981. Abaxial transpiration and water loss in asseptically cultured plum. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 106:519-522.
- Fujiwara, K. & Kozai, T., 1995. Physical microenvironment and its effects. In: J. Aitken-Christie, T. Kozai, & M.L. Smith (eds.), *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, pp. 319-369. Kluwer Academic Pub., Dordrecht.
- Fujiwara, K., Kozai, T. & Watanabe, I., 1987. Measurement of carbon dioxide gas concentration in stoppered vessels containing tissue cultured plantlets and estimates of net photosynthetic rates of the plantlets. *J. Agr. Met. Jpn.*, 43:21-30.
- Galston, A.W. & Kaur-Sawhney, R., 1987. Polyamines as endogenous growth regulators. In: P.J. Davies (ed.), *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, pp. 280-295. Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht.
- Gaspar, T. 1981. Rooting and flowering, two antagonistic phenomena from a hormonal point of view. In: B. Jeffcoat (ed.), *Aspects and Prospects of Plant Growth Regulation*, n° 6, pp. 39-49. Plant Growth Regul. Group, Wantage, UK.
- Gaspar, T. 1986. Integrated relationships of biochemical and physiological peroxidase activities. In: H. Greppin, C. Penel & T. Gaspar (eds.), *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, pp. 117-131. Centre de Botanique, U. de Genève.
- Gaspar, T. & Coumans, M., 1987. Root formation. In: J.M. Bonga & D.J. Durzan (eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol. 2, pp. 202-217. Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht.
- Gaspar, T., Kevers, C., Hausman, J.F., Berthon, J.Y. & Ripetti, V., 1992. Practical uses of peroxidase activity as a predicative marker of rooting performance of micropropagated shoots. *Agronomie*, 12:757-765.
- Gaspar, T., Kevers, C., Hausman, J.F. & Ripetti, V., 1994. Peroxidase activity and endogenous free auxin during adventitious root formation. In: P.J. Lumdsen, J.R. Nicholas & W.J. Davies (eds.), *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*, pp. 289-298. Kluwer Academic Pub., Dordrecht.
- Gaspar, T., Penel, C., Castillo, F.J. & Greppin, H., 1985. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol. Plant.*, 64:418-423.

- Gaspar, T., Thorpe, T.A. & Tran Tan Van, M., 1977. Changes in isoperoxidases during differentiation of cultured tobacco epidermal layers. *Acta Hortic.*, 78:61-73.
- Gautheret, R.J., 1934. Culture du tissu cambial. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 198:2195-2196.
- Gautheret, R.J., 1940. Recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 210:632-634.
- Gebhart, K., 1985. Self rooted sour cherries *in vitro*: auxin effect on rooting and isoperoxidases. *Acta Hortic.*, 169:341-349.
- Geneve, R.L. & Kester, S.T., 1991. Polyamines and adventitious root formation in the juvenile and mature phase of English Ivy. *J. Exp. Bot.*, 42:71-75.
- George, E.F. & Sherrington, P.D., 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd., England. 710 pp.
- Ghashghaie, J., Brenckmann, F. & Saugier, B., 1992. Water relations and growth of rose plants cultured *in vitro* under various relative humidities. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30:51-57.
- Gonçalves, J.C., 1991. *Influência de Alguns Factores na Micropropagação de Castanheiro (Castanea Miller)*. Tese de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 113 pp.
- Gonçalves, J.C., Amâncio, S. & Pereira, J.G., 1993. *In vitro* propagation comparative study of 7 chestnut hybrid clones *C. sativa* x *C. crenata*. In: *Proceedings of the International Congress on Chestnut*, pp. 211-214. Spoleto, Italy.
- Gonçalves, J.C., Amâncio, S. & Pereira, J.S., 1994. Rooting and acclimatization of chestnut by *in vitro* propagation. In: P.J. Lumsden, J.R. Nicholas & W.J. Davies (eds.), *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*, pp. 303-308. Kluwer Academic Pub., Dordrecht.
- Gray, D. & Benton, C., 1991. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 27:7-14.
- Greenwood, M.S., 1986. Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regulation*, 6:1-12.
- Greenwood, M.S., Atkinson, O.R. & Yawney, H.W., 1976. Studies of hard- and easy-to-root ortets of sugar maples: difference not due to endogenous auxin content. *Plant Propagator*, 22:3-6.
- Greshoff, P.M. & Doy, C.H., 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta*, 107:161-170.
- Gribaudo, I., Morte, M.A. & Schubert, A., 1995. Use of gentian violet to differentiate *in vitro* and *ex vitro*-formed roots during acclimatization of grapevine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 41:187-188.

- Grout, B.W.W., 1975. Wax development on leaf surfaces of *Brassica oleraceae* var. Currawong regenerated from meristem culture. *Plant Sci. Letter*, 5:401-405.
- Grout, B.W.W., 1988. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro*, and the stresses of transplanting. *Acta Hort.*, 230:129-135.
- Grout, B.W.W. & Aston, M.J., 1977a. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort. Res.*, 17:1-7.
- Grout, B.W.W. & Aston, M.J., 1977b. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. II. Carbone dioxide fixation and the development of photosynthetic ability. *Hort. Res.*, 17:65-71.
- Grout, B.W.W. & Aston, M.J., 1978. Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. *Ann. Bot.*, 42:993-995.
- Grout, B.W.W. & Millam, S., 1985. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Ann. Bot.*, 55:129-131.
- Grout, B.W.W. & Price, F., 1987. The establishment of photosynthetic independence in strawberry cultures prior to transplanting. In: G. Ducate, M. Jacobs & A. Simeon (eds.), *Plant Micropropagation in Horticultural Industries: Preparation, Hardening and Acclimatization Process*, pp. 55-60. Belgium Plant Tissue Culture Group, Presses Universitaires, Liege.
- Haissig, B.E., 1972. Meristematic activity during adventitious root primordium development. *Plant Physiol.*, 49:886-892.
- Haissig, B.E., 1986. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. In: M.B. Jackson (ed.), *New Root Formation In Plants and Cuttings*, pp. 141-189. Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht.
- Haissig, B.E., Davis, T.D. & Riemenschneider, D.E., 1992. Reasearching the controls of adventitious rooting. *Physiol. Plant.*, 84:310-317.
- Hand, P., 1994. Biochemical and molecular markers of cellular competence for adventitious rooting. In: T.D. Davies & B.E. Haissig (eds.), *Biology of Adventitious Root Formation*, pp. 111-121. Plenum Press, New York.
- Harbage, J.F., Stimart, D.P. & Evert, R.F., 1993. Anatomy of adventitious root formation in microcuttings of *Malus domestica* Borkh. 'Gala'. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118:680-688.
- Hausman, J., 1993. Changes in peroxidase activity, auxin level and ethylen production during root formation by poplar shoots raised *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 13:263-268.
- Heller, R., 1953. Recherches sur la nutrition minerale des tissus végétaux *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.*, 14:1-22.

- Heloir, M.-C., Kevers, C. Hausman, J.-F. & Gaspar, T., 1996. Changes in the concentration of auxins and polyamines during rooting of *in-vitro*-propagated walnut shoots. *Tree Physiol.*, 16:515-519.
- Hemberg, T., 1954. The relation between the occurrence of auxin and rooting of hypocotyls in *Phaseolus vulgaris* L. *Physiol. Plant.*, 7:323-331.
- Hicks, G.S., 1987. Adventitious rooting of apple microcuttings *in vitro*: an anatomical study. *Can J. Bot.*, 65:1913-1920.
- Horgan, K. & Holland, L., 1989. Rooting micropropagated shoots from mature radiata pine. *Can. J. For. Research*, 19:1309-1315.
- Hunt, R., 1978. *Plant Growth Analysis*. Studies in Biology, n° 96, Edward Arnold Publishers Ltd, London. 67 pp.
- Huylenbroeck, J.M. & Debergh, P.C., 1996. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Physiol. Plant.*, 96:298-304.
- Huylenbroeck, J.M. & De Riek, J., 1995. Sugar and starch metabolism during *ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* 'Petit' plantlets. *Plant Sci.*, 111:19-25.
- Huylenbroeck, J.M., Huygens, H. & Debergh, P.C., 1995. Photoinhibition during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* 'Petit' plantlets. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 31:160-164.
- IAPTC, 1985. Usage of Vertebrate, Invertebrate and Plant Cell, Tissue and Organ Culture Terminology. *Newsletter*, 45:15-22.
- Infante, R., Magnani, E. & Righetti, B., 1989. The role of light and CO₂ in optimising the conditions for shoot proliferation of *Actinidia deliciosa* *in vitro*. *Physiol. Plantarum*, 77:191-195.
- Jacquot, C., 1950. Sur la culture *in vitro* du tissu cambial du châtaignier (*Castanea vesca* Gaertn). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 231:1080-1081.
- Jacquot, C., 1970. Nouvelles recherches sur l'action de quelques dérivés de l'adénine sur la croissance du tissu cambial d'essences forestières cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270:493-495.
- James, D.J., 1983. Adventitious root formation *in vitro* in apple rootstocks (*Malus pumila*) II. Uptake and distribution of indolyl -3-acetic acid during the auxin-sensitive phase in M.9 and M.26. *Physiol. Plant.*, 57:154-158.
- Jarvis, B.C., Shannon, P.R.M. & Yasmin, S., 1983. Involvement of polyamines with adventitious root development in stem cuttings of mung bean. *Plant Cell Physiol.*, 24:677-683.
- Jensen, W.A., 1962. *Botanical Histochemistry*, pp. 55-99. W.H. Freeman & Co., San Francisco.

- Jones, H.G., 1985. Adaptative significance of leaf development and structural responses to environment. In: N.R. Baker, W.J. Davies & C.K. Ong (eds.), *Control of Leaf Growth*, pp. 155-173. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jones, M.G.K., Outlow, W.H. & Lowry, O.H., 1977. Enzymic Assay of 10^{-7} to 10^{-14} moles of sucrose in plant tissue cultures. *Plant Physiol.*, 60:379-383.
- Kamosky, D.F., Diner, A.M. & Barnes, W.M., 1988. A model system for gene transfer in conifers: European larch and *Agrobacterium*. In: M.R. Ahuja (ed.), *Somatic Cell Genetics of Woody Plants*, pp. 55-63. Kluwer Academic Pub., Dordrecht.
- Kozai, T., 1991a. Controlled environment in conventional and automated micropropagation. In: I.K. Vasil (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics Plants*, Vol 8, pp. 213-218. Academic Press Inc., New York.
- Kozai, T., 1991b. Micropropagation under photoautotrophic condition. In: P.C. Debergh & R.H. Zimmerman (eds.), *Micropropagation - Technology and Application*, pp. 447-469. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Kozai, T., 1992. Acclimatization of micropropagated plants. In: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry - High-Tech and Micropropagation II*, Vol 18, pp. 127-141. Springer-Verlag, Berlin.
- Kozai, T. & Iwanami, Y., 1988. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plant growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 57:279-288.
- Kozai, T., Iwanami, Y. & Fujiwara, K., 1987. Environmental control for mass propagation of tissue cultured plantlets (1) Effects of CO₂ enrichment on the plantlet growth during the multiplication stage. *Plant Tissue Cult. Lett.*, 4:22-26.
- Kozai, T., Koyama, Y. & Watanabe, I., 1988. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. *Acta Hort.*, 230:121-127.
- Kozai, T., Oki, H. & Fujiwara, K., 1990. Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlets *in vitro*. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 22:205-211.
- Kramer, P.J., 1983. *Water Relations of Plants*. Academic Press, New York. 500 pp.
- Kubota, C. & Kozai, T., 1992. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum* *in vitro* under forced and natural ventilation. *HortScience*, 27:1312-1314.
- Label, P., Sotta, B. & Miginiac, E., 1989. Endogenous levels of abscisic acid and indole-3-acetic acid during *in vitro* rooting of wild cherry explants produced by micropropagation. *Plant Growth Regulation*, 8:325-333.
- Lakso, A.N., Reisch, B.I., Mortensen, J. & Roberts, M.H., 1986. Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of *in vitro*-propagated grapevines after transfer from culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 111:634-638.

- Lanteri, M., Cherubini, M., Cona, A., Villani, F. & Brugnoli, E., 1993. Variations of carbon isotope discrimination and leaf photosynthesis among populations of *Castanea sativa* Mill. *Proceedings of the International Congress on Chestnut*, pp. 111-114. Spoleto, Italy.
- Leathers, R.R., Smith, M.A.L. & Aitken-Christie, J., 1995. Automation of the bioreactor process for mass propagation and secondary metabolism. In: J. Aitken-Christie, T. Kozai & M. Lila Smith (eds.), *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, pp. 187-214. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht.
- Lee, N., Wetzstein, Y. & Sommer, H.E., 1985. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiol.*, 78:637-641.
- Lee, N., Wetzstein, Y. & Sommer, H.E., 1988. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro*- and *in vivo*-developed sweetgum leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 113:167-171.
- Lees, R.P., Evans, E.H. & Nicholas, J.R., 1991. Photosynthesis in *Clematis*, "The President", during growth *in vitro* and subsequent *in vivo* acclimatization. *J. Exp. Bot.*, 42:605-610.
- Leifert, C. & Waites, W.M., 1994. Dealing with microbial contaminants in plant tissue and cell culture: hazard analysis and critical control points. In: P.J. Lumdsen, J.R. Nicholas & W.J. Davies (eds.), *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*, pp. 363-378. Kluwer Academic Pub., Dordrecht.
- Leverenz, J.W., 1987. Chlorophyll content and the light response curve of shade-adapted conifer needles. *Physiologia Plantarum*, 71:20-29.
- Leverenz, J.W., 1988. The effect of illumination sequence, CO₂ concentration, temperature and acclimation on the convexity of the photosynthetic light response curve. *Physiol. Plantarum*, 74:332-341.
- Lewandowski, V., 1991. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* 'Delaware'. *HortScience*, 26:586-589.
- Lichtenthaler, H.K., 1981. Adaptation of leaves and chloroplasts to high quanta fluence rates. In: G. Akoyunoglou (ed.), *Photosynthesis*. Vol. 6, Proc. of 5th Int. Congress, pp. 273-289.
- Lindsey, R. & Jones, M.G.K., 1989. *Plant Biotechnology in Agriculture*. Open University Press, Milton Keynes. 242 pp.
- Liu, J.-H., & Reid, D. M., 1992. Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. IV. The role of changes in endogenous free and conjugated indole-3-acetic acid. *Physiol. Plant.*, 86:285-292.
- Lovell, P.H. & White, J., 1986. Anatomical changes during adventitious root formation. In: M.B. Jackson (ed), *New Root Formation In Plants and Cuttings*, pp. 111-140. Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht.

- MacKinney, G., 1941. Absorption of light by chlorophyll solution. *J. Biol. Chem.*, 140:315-322.
- Maene L. & Debergh P.C., 1983. Rooting of tissue cultured plants under *in vivo* conditions. *Acta Hortic.*, 131:201-208.
- Marín, J.A. & Gella, R., 1988. Is desiccation the cause of the poor survival rate in the acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L.? *Acta Hortic.*, 230:105-112.
- Marín, J.A., Gella, R. & Herrero, M., 1988. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L.. *Annals of Botany*, 62:663-670.
- Mato, M.C. & Vieitez, A. M., 1986. Changes in auxin protectors and IAA oxidases during the rooting of chestnut shoots *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 66:491-494.
- Mato, M.C., Rua, M.L. & Ferro, E., 1988. Biochemical changes during root formation in *Vitis* cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 72:84-88.
- Matysiak, B. & Nowak, J., 1994. Carbon dioxide and light effects on photosynthesis, transpiration and *ex vitro* growth of *Hamamelis* 'Emeralda Gem' plantlets. *Scientia Hortic.*, 57:353-358.
- McClelland, M., Smith, M. & Carothers, Z., 1990. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on the subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23:115-123.
- McCown, B.H., 1988. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: T.D. Davies, B.E. Haissig & N. Sankhla (eds.), *Adventitious Root Formation in Cuttings*, pp. 289-302. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Miranda, M.E. & Fernandez, J., 1992. Micropropagation as a nursery technique for chestnut hybrid clones. *Proceedings of the International Chestnut Conference*, 101-103. Morgantown, West Virginia.
- Miranda, M.E., López, J.F. 1993. Micropropagacion, cultivo en vivero y calidad de planta de clones híbridos de *Castanea sativa* y *Castanea crenata*. *Congreso Forestal Español*, Tomo II: 343-348. Pontevedra, España.
- Mohammed, G.H., Gillies, S.L. & Vidaver, W.E., 1992. *Ex vitro* photosynthetic activity in plantlets of tissue-cultured Douglas-fir. *Tree Physiology*, 10:403-410.
- Mohammed, G.H. & Vidaver, W.E., 1990. The influence of acclimatization treatment and plantlet morphology on early greenhouse-performance of tissue-cultured Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 21:111-117.
- Mohammed, G.H. & Vidaver, W.E., 1991. Plantlet morphology and the regulation of net water loss in tissue-cultured Douglas fir. *Physiol. Plant.*, 83:117-121.
- Molnar, J.M. & LaCroix, L.J., 1972. Studies of the rooting of cuttings of *Hydrangea macrophylla*: enzyme changes. *Can. J. Bot.*, 50:315-322.

- Moncousin, C., 1991. Rooting of *in vitro* cuttings. In: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry - High-Tech and Micropropagation*, pp. 231-261. Springer-Verlag, Berlin.
- Moore, T.C., 1989. *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. 2^a Ed. Springer-Verlag, Berlin. 330 pp.
- Morini, S., Muleo, R., Sciutti, R. & Fortuna, P., 1993. Relationship between evolution of CO₂ and growth of plum shoot tips cultured *in vitro* under different light/dark regimes. *Physiol. Plant.*, 87:286-290.
- Mullins, K.V., 1987. Micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Acta Hortic.*, 212:525-530.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-497.
- Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25:135-166.
- Murray, J.R. & Hackett, W.P., 1991. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L.. *Plant Physiol.*, 97:343-351.
- Németh G., 1986. Induction of rooting. In: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol 1, pp. 49-64. Springer-Verlag, Berlin.
- Nordström, A.C. & Eliasson, L., 1991. Levels of endogenous indole-3-acetic acid and indole-3-acetylaspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Physiol. Plant.*, 82:599-605.
- Nordström, A.C., Jacobs, F.A. & Eliasson, L., 1991. Effect of exogenous indol-3-acetic acid and indol-3-butyric acid on internal levels of the respective auxine and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant Physiol.*, 96:856-861.
- Offord, C. & Campbell, L. 1992. Micropropagation of *Telopea speciosissima* R. Br. (*Proteacea*) 2: Rhizogenesis and acclimatization to *ex vitro* conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 29:223-230.
- Olsson, T. & Leverenz, J.W., 1994. Non-uniform stomatal closure and the apparent convexity of the photosynthetic photon flux density response curve. *Plant. Cell and Env.*, 17:701-710.
- Patena, L.F., Sutter, E.G. & Dandekar, A.M., 1990. Adventitious root induction in *in vitro* grown shoots of 'golden delicious' apple (*Malus domestica* Borkh.) using *Agrobacterium rhizogenes*. Abstracts *VIIIth Int. Congr. Plant Tissue Cell Cult.*, Amsterdam. Abstr A2-112.
- Pierik, R.L.M., 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. 344 pp.
- Pierik, R.L.M., 1990. Rejuvenation and micropropagation. *Newsletter*, 62:11-21.

- Poorter, H., 1989. Interspecific variation in relative growth rate: on ecological causes and physiological consequences. In: H. Lambers, M.L. Cambridge, H. Konings & T.L. Pous (eds.), *Causes and Consequences of Variation in Growth Rate and Productivity of Higher Plants*, pp. 45-68. SPB Academic Publishing, The Hague.
- Pospisilova, J., Solárová, J. & Catsky, J., 1992. Photosynthetic responses to stresses during *in vitro* cultivation. *Photosynthetica*, 26:3-18.
- Preece, J.E. & Sutter, E.G., 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: P.C. Debergh & R.H. Zimmerman (eds.), *Micropropagation. Technology and Application*, pp. 71-93. Kluwer Academic Pub., Dordrecht.
- Pressey, R., 1990. Anions activate the oxidation of indoleacetic acid by peroxidases from tomato and other sources. *Plant Physiol.*, 93:798-804.
- Prioul, J.L. & Chartier, P., 1977. Partitioning of transfer and carboxylation components of intracellular resistance to photosynthetic CO₂ fixation: A critical analysis of the methods used. *Annals of Botany*, 41:789-800.
- Pythoud, F. & Buchala, A., 1989. The fate of vitamin D3 and indolbutyric acid applied to cuttings of *Populus tremula* L. during adventitious root formation. *Plant Cell and Environment*, 12:489-494.
- Quoirin, M., Boxus, P. & Gaspar, T., 1974. Root initiation and isoperoxidases of stem tip cuttings from mature *Prunus* plants. *Physiol. Veg.*, 12:165-174.
- Ranjit, M., Kester, D.E. & Polito, V.S., 1988. Micropropagation of cherry rootstocks: III. Correlations between anatomical and physiological parameters and root initiation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 113:155-159.
- Rebordão, J.P., 1994. *Aclimatização da Videira (Vitis vinifera L.) Multiplicada In Vitro: Efeito da Variação da Disponibilidade Luminosa*. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 111pp.
- Reuther, G., 1991. Stimulation of the photoautotrophy of *in vitro* plants. *Acta Hort.*, 300:59-75.
- Rhue, R.D., Grogan, C.O., Stockmeyer, E.W. & Everett, H.L., 1978. Genetic control of aluminum tolerance in corn. *Crop Sci.*, 18:1063-1067.
- Rinallo, C. & Bruno, E., 1991. Foliar surface features of *Castanea sativa* Mill.. *Adv. Hort. Sci.*, 5:64-72.
- Ripetti, V., Kevers, C. & Gaspar, T., 1994. Two successive media for the rooting of walnut shoots *in vitro* - changes in peroxidase activity and in ethylene production. *Adv. Hort. Sci.*, 8:29-32.
- Ritchie, G., Short, K. & Davey, M., 1991. *In vitro* acclimatization of chrysanthemum and sugar beet plantlets by treatment with paclobutrazol and exposure to reduced humidity. *J. Exp. Bot.*, 42:1557-1563.

- Rodriguez, R., 1982. *In vitro* propagation of *Castanea sativa* Mill. through meristem-tip culture. *HortScience*, 17(6):888-889.
- Romano, A. 1994. *Estudos In Vitro em Quercus suber L.: Micropropagação, Micorrização e Conservação*. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Uni. de Lisboa. 281 pp.
- Sakamoto, Y., Onishi, N. & Hirosawa, T., 1995. Delivery systems for tissue culture by encapsulation. In: J. Aitken-Christie, T. Kozai & M. Lila Smith (eds.), *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, pp. 215-243. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht.
- Sallanon, H., Laffray, D. & Coudret, A., 1991. Ultrastructure and functioning of guard cells of *in vitro* cultured rose plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 29:333-339.
- Sallanon, H., Tort, M. & Coudret, A., 1993. The ultrastructure of micropropagated and greenhouse rose plant stomata. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 32:227-233.
- Samartin, A., Vieitez, A.M. & Vieitez, E., 1986. Rooting of tissue cultured camellias. *J. Hort. Sci.*, 61:113-120.
- Sanchez, M.C. & Vieitez, A.M., 1991. *In vitro* morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut. *Tree Physiology*, 8:59-70.
- Sanchez, M.C., San-José, M.C., Ferro, E., Ballester, A. & Vieitez, A.M., 1997. Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnut. *J. Hort. Sci.*, 72:433-443.
- San-José, M.C., Vidal, N. & Ballester, A., 1992. Anatomical and biochemical changes during root formation in oak and apple shoots cultured *in vitro*. *Agronomie*, 12: 767-774.
- Sankhala, N. & Upadhyaya, A., 1988. Polyamines and adventitious root formation. In: T.D. Davies, B.E. Haissig & N. Sankhala (eds.), *Adventitious Root Formation in Cuttings*, Vol 2. Dioscorides Press, Portland.
- Santamaria, J.M. & Kerstiens, G., 1994. The lack of control of water loss micropropagated plants is not related to poor cuticle development. *Physiol. Plant.*, 91:191-195.
- Santamaria, J.M., Davies, W. & Atkinson, C., 1993. Stomata of micropropagated *Delphinium* plants respond to ABA, CO₂, light and water potential, but fail to close fully. *J. Exp. Bot.*, 44:99-107.
- Sesták, Z. (ed.), 1985. *Photosynthesis During Leaf Development*. Dr W. Junk Publishers, Dordrecht. 396 pp.
- Shackel, K.A., Novello, V. & Sutter, E.G., 1990. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115:468-472.
- Smith, D.R. & Wareing, P.F., 1972a. Rooting of hardwood cuttings in relation to bud dormancy and the auxin content of the excised stems. *New Phytol.*, 71:63-80.

VI. Referências bibliográficas

- Smith, D.R. & Wareing, P.F., 1972b. The rooting of actively growing and dormant leafy cutting in relation to the endogenous hormone levels and photoperiod. *New Phytol.*, 71:483-500.
- Smith, E.F., Roberts, V. & Mottley, J., 1990. The preparation *in vitro* of *Chrysanthemum* for transplantation to soil. 3. Improved resistance to desiccation conferred by reduced humidity. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 21:141-145.
- Smith, M.A.L., Palta, J.P. & McCown, B.H., 1986. Comparative anatomy and physiology of micropropagated, seedling and greenhouse-grown asian birch. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 111:437-442.
- Standardi, A. & Romani F., 1990. Effects of some antioxidants on *in vitro* rooting of apple shoots. *HortScience*, 25:1435-1436.
- Stimart, D.P. & Harbage, J.F., 1993. Growth of rooted 'Gala' apple microcuttings *ex vitro* as influenced by initial adventitious count. *HortScience*, 28:664-666.
- Sutter, E.G., 1984. Chemical composition of epicuticular wax in cabbage plants grown *in vitro*. *Can. J. Bot.*, 62:74-77.
- Sutter, E.G., 1985. Morphological, physical and chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated *in vitro*. *Ann. Bot.*, 55:321-329.
- Sutter, E.G., 1988. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 113:234-238.
- Sutter, E.G. & Hutzell, M., 1984. Use of humidity tents and antitranspirants in the acclimatization of tissue-cultured plants to the greenhouse. *Scientia Hortic.*, 23:303-312.
- Sutter, E.G. & Langhans, R.W., 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 104:493-496.
- Sutter, E.G. & Langhans, R.W., 1982. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. *Can. J. Bot.*, 60:2896-2902.
- Sutter, E.G. & Luza, J., 1993. Developmental anatomy of roots induced by *Agrobacterium rhizogenesis* in *Malus pumila* 'M.26' shoots grown *in vitro*. *Intl. J. Plant Sci.*, 154:59-67.
- Sutter, E.G., Novello, V. & Shackel, K., 1988. Physiological and anatomical aspects of water stress of cultured plants. *Acta Hortic.*, 230:113-119.
- Teixeira, A.R.N. & Ricardo, C.P., 1983. *Fotossíntese*. Didáctica Editora, Lisboa. 344 pp.
- Thorpe, T.A., Tran Than Van, M. & Gaspar, T., 1978. Isoperoxidases in epidermal layers of tobacco and changes during organ formation *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 44:388-394.
- Tiburcio, A.F., Gendy, C.A. & Tran Than Van, K., 1989. Morphogenesis in tobacco subepidermal cells: putrescine as marker of root differentiation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 19:43-54.

- Torrey, J.G., 1986. Endogenous and exogenous influences on the regulation of lateral root formation. In: M.B. Jackson (ed.), *New Root Formation in Plants and Cuttings*, pp. 31-66. Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht.
- Torrigiani, P., Altamura, M.M., Capitani, F., Serafini-Fracassini, D. & Bagni, N., 1989. *De novo* root formation in thin cell layers of tobacco: changes in free and bound polyamines. *Physiol. Plant.*, 77:294-301.
- Urquijo, P., 1952. Multiplicación asexual de castaños. *An. Inst. Nac. Invest. Agron.*, 1:317-323.
- Van der Krieken, W.M., Breteler, H. & Visser, M.H.M., 1992. The effect of the conversion of indolebutyric acid into indoleacetic acid on root formation on microcuttings of *Malus*. *Plant Cell Physiol.*, 33(6):709-713.
- Van Telgen, H., Van Mil, A. & Kunneman, B., 1992. Effect of propagation and rooting conditions on acclimatization of micropropagated plants. *Acta Botanica Neerlandica*, 41:261-267.
- Van Hoof, P. & Gaspar, T., 1976. Peroxidase and isoperoxidase changes in relation to root initiation of *Asparagus* cultured *in vitro*. *Scientia Hort.*, 4:27-31.
- Vazquez, A. & Gesto, D.V., 1986. Rooting, endogenous root-inducing cofactors and proanthocyanidins in chestnut. *Biologia Plantarum*, 28:303-306.
- Vidal, N., Ballester, A., Vieitez, A.M., Kevers, C. & Gaspar, T., 1994. Biochemical characteristics of chestnut shoots related to *in vitro* multiplication and rooting capacities. *Adv. Hortic. Sci.*, 8:19-24.
- Vieitez, A.M. & Vieitez, M.L., 1980a. Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut growing *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 50:127-130.
- Vieitez, A.M. & Vieitez, M.L., 1980b. Culture of chestnut shoots from buds *in vitro*. *J. Hort. Sci.*, 55:83-84.
- Vieitez, A.M. & Vieitez, M.L., 1982. *Castanea sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*. *Scientia Hort.*, 18:343-351.
- Vieitez, A.M. & Vieitez, M.L., 1983. Secuencia de cambios anatomicos durante la rizogenesis *in vitro* del castano. *Phyton*, 43:185-191.
- Vieitez, A.M., Ballester, A., Vieitez, M.L. & Vieitez, E., 1983. *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut. *J. Hort. Sci.*, 58(4):457-463.
- Vieitez, A.M., Gonzalez, M.L. & Vieitez, E., 1978. Root formation on cotyledon tissue of chestnut cultured *in vitro*. In: *Abstracts Inaugural Meeting FESPP*, pp. 552-553. Edinburgh.
- Vieitez, A.M., Vieitez, M.L. & Vieitez, E., 1986. Chestnut (*Castanea* spp.). In: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol 1, pp. 393-414. Springer-Verlag, Berlin.
- Vieitez, E. 1952. Ensayos de reproducción vegetativa de híbridos de castaño: *Castanea sativa* x *C. crenata*. *Ann. Edaf. Fisiol. Veg.*, 11:185-209.

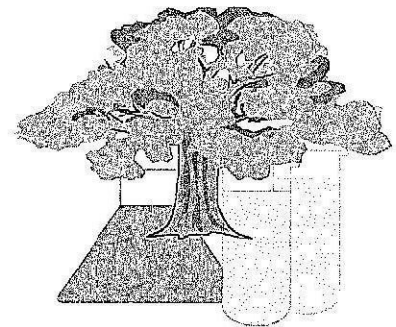
VI. Referências bibliográficas

- Vieitez, E. 1955. El empleo de sustancias de acción hormonal en el enraizamiento del castaño por el acodo bajo. *Ann. Edaf. Fisiol. Veg.*, 15:1-31.
- Vince-Prue, D., 1994. Photomorphogenesis and plant development. In: P.J. Lumsden, J.R. Nicholas & W.J. Davies (eds.), *Physiology: Growth and Development of Plants in Culture*, pp. 19-30. Kluwer Academic Pub., Dordrecht.
- Walker, D.A., 1990. *Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis*. Oxygraphics Ltd., Brighton/Packard Pub., Chichester.
- Wang, S.Y. & Faust, M., 1986. Effects of growth retardants on root formation and polyamine content in apple seedlings. *J. Amer. Hortic. Sci.*, 111:912-917.
- Wardle, K., Dobbs, E.B. & Short, K.C., 1983. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *J. Amer. Hortic. Sci.*, 108:386-389.
- Wardle, K., Quinlan, A. & Simpkins, I., 1979. Abscisic acid and the regulation of water loss in plantlets of *Brassica oleraceae* L. var. 'botrytis' regenerated through apical meristem culture. *Ann. Bot.*, 43:745-752.
- Welander, M., 1983. *In vitro* rooting of the apple rootstock M26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. *Physiol. Plant.*, 58:231-238.
- Wetzstein, H.Y. & Sommer, H.E., 1982. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. *Am. J. Bot.*, 69:1579-1586.
- Wetzstein, H.Y. & Sommer, H.E., 1983. Scanning electron microscopy of *in vitro*-cultured *Liquidambar styraciflua* during acclimatization. *J. Amer. Hortic. Sci.*, 108:475-480.
- White, J. & Lovell, P.H. 1984a. The anatomy of root initiation in cuttings of *Griselinia littoralis* and *Griselinia lucida*. *Annals of Botany*, 54:7-12.
- White, J. & Lovell, P.H. 1984b. Anatomical changes which occur in cuttings of *Agathis australis* (D. Don) Lindl 2. The initiation of root primordia and early root development. *Annals of Botany*, 54:633-646.
- Wiesman, Z., Riou, J. & Epstein, E., 1989. Characterization and rooting ability of indole-3-butyric acid conjugates formed during rooting of mung bean cuttings. *Plant Physiol.*, 91:1080-1084.
- Winton, L.L., 1968. Plantlets from aspen tissue cultures. *Science*, 160:1234-1235.
- Woodrow, I.E. & Berry, J.A., 1988. Enzymatic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 39:533-594.
- Yie, S. & Liaw, I., 1977. Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. *In Vitro*, 13:564-568.
- Yu, X. & Reed, B., 1995. A micropropagation system for hazelnuts (*Corylus* spp). *HortScience*, 30:120-123.

- Yue, D., Desjardins, Y., Lamarre, M. & Gosselin, 1992. Photosynthesis and transpiration of *in vitro* cultured asparagus plantlets. *Scientia Hort.*, 49:9-16.
- Yue, D., Gosselin, A. & Desjardins, Y., 1993a. Effects of forced ventilation at different relative humidities on growth, Pn and transpiration of geranium plantlets *in vitro*. *Can. J. Plant Sci.*, 73:249-256.
- Yue, D., Gosselin, A. & Desjardins, Y., 1993b. Re-examination of photosynthetic capacity of *in vitro*-cultured strawberry plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118:419-424.
- Zhou, J., Wu, H. & Collet, G.F., 1992. Histological study of initiation and development *in vitro* of adventitious roots in minicuttings of apple rootstocks of M26 and EMLA9. *Physiol. Plant.*, 84:433-440.
- Ziv, M., 1986. *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: L.A. Withers, & P.G. Anderson (eds.), *Plant Tissue and Agricultural Applications*, pp. 187-196. Butterwoths, London.
- Ziv, M., Schwartz, A. & Halevy, A.H., 1987. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. *Plant Science Letters*, 52:127-134.

Capítulo VII

ANEXOS



1. Composição dos meios de cultura

Tabela 7.1. Composição dos meios de cultura.

Substâncias químicas	MS (1962)	GD (1972)	Heller (1953) mod.
	Concentração (mg l ⁻¹)		
KNO ₃	1900,000	1000,000	-----
NH ₄ NO ₃	1650,000	-----	-----
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,000	150,000	93,740
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000	250,000	312,500
KH ₂ PO ₄	170,000	-----	-----
NaNO ₂	-----	-----	750,000
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-----	90,000	156,260
Na ₂ HPO ₄	-----	30,000	-----
(NH ₄) ₂ SO ₄	-----	200,000	132,000
KCl	-----	300,000	937,500
H ₃ BO ₃	6,200	3,000	1,000
MnSO ₄ .4 H ₂ O	22,300	10,000	0,100
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	8,600	3,000	1,000
KI	0,830	0,750	0,010
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,250	0,250	-----
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,025	0,250	0,030
CoCl ₂ .6 H ₂ O	0,025	0,250	-----
NiCl ₂ .6H ₂ O	-----	-----	0,030
AlCl ₃	-----	-----	0,030
SO ₄ Fe. 7H ₂ O	27,850	27,850	27,850
Na ₂ EDTA	37,250	37,250	37,250

2. Análises de variância

2.1. Enraizamento in vitro e ex vitro

Tabela 7.2. Análise de variância da porcentagem de enraizamento (Tab. 3.1).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Indução	1	0,044	0,044	0,382	0,544
Expressão	1	0,711	0,711	6,105	0,014
Indução * Expressão	1	0,178	0,178	1,526	0,218
Erro	176	20,500	0,116		
Total ajustado	179	21,528			

Tabela 7.3. Análise de variância do número de raízes (Tab. 3.1).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Indução	1	27,01	27,01	16,208	0,000
Expressão	1	11,95	11,95	7,168	0,008
Indução * Expressão	1	7,30	7,30	4,382	0,038
Erro	151	251,64	1,67		
Total ajustado	154	291,91			

Tabela 7.4. Análise de variância do comprimento da maior raiz (Tab. 3.1).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Indução	1	873,08	873,08	6,459	0,012
Expressão	1	32627,01	32627,01	241,365	0,000
Indução * Expressão	1	287,36	287,36	2,126	0,147
Erro	151	20411,78	135,18		
Total ajustado	154	55050,80			

Tabela 7.5. Análise de variância da sobrevivência na aclimatização (Tab. 3.1).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Indução	1	0,003	0,003	0,035	0,855
Expressão	1	9,522	9,522	112,391	0,000
Indução * Expressão	1	0,003	0,003	0,035	0,855
Erro	176	14,741	0,084		
Total ajustado	179	24,275			

Tabela 7.6. Médias da actividade específica das peroxidases solúveis ($\Delta\text{Abs min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) $\pm ep$ durante os primeiros oito dias de enraizamento (Fig. 3.9).

Dia	AIB 3	ep	Imersão	ep	Controlo	ep
0	10,5	$\pm 1,0$	10,5	$\pm 1,0$	10,5	$\pm 1,0$
0,5	6,9	$\pm 1,1$	7,0	$\pm 1,0$	7,1	$\pm 0,7$
1	9,7	$\pm 1,1$	10,6	$\pm 1,4$	10,0	$\pm 0,9$
1,5	7,7	$\pm 0,8$	9,2	$\pm 2,1$	8,5	$\pm 1,2$
2	7,5	$\pm 1,0$	8,5	$\pm 1,5$	10,5	$\pm 1,4$
4	8,8	$\pm 1,9$	15,3	$\pm 1,7$	10,7	$\pm 1,8$
6	11,6	$\pm 1,7$	19,5	$\pm 0,9$	16,2	$\pm 1,0$
8	29,7	$\pm 0,8$	29,8	$\pm 1,1$	20,6	$\pm 1,8$

Tabela 7.7. Médias das concentrações de proteína solúvel ($\mu\text{g g}^{-1}$ pf) $\pm ep$ durante os primeiros oito dias de enraizamento (Fig. 3.10).

Dia	AIB 3	ep	Imersão	ep	Controlo	ep
0	3,1	$\pm 0,3$	3,1	$\pm 0,4$	3,1	$\pm 0,4$
0,5	2,6	$\pm 0,4$	3,2	$\pm 0,4$	3,0	$\pm 0,4$
1	2,6	$\pm 0,2$	2,4	$\pm 0,3$	2,7	$\pm 0,3$
1,5	3,0	$\pm 0,3$	3,1	$\pm 0,2$	2,8	$\pm 0,2$
2	3,2	$\pm 0,4$	3,3	$\pm 0,4$	2,6	$\pm 0,3$
4	2,8	$\pm 0,4$	2,4	$\pm 0,2$	3,3	$\pm 0,3$
6	2,9	$\pm 0,3$	2,3	$\pm 0,2$	3,3	$\pm 0,2$
8	0,9	$\pm 0,1$	1,7	$\pm 0,2$	3,2	$\pm 0,3$

Tabela 7.8. Médias da actividade das peroxidases solúveis expressa por unidade de peso fresco ($\Delta\text{Abs min}^{-1} \text{g}^{-1}$ pf) $\pm ep$ durante os primeiros oito dias de enraizamento (Fig. 3.11).

Dia	AIB 3	ep	Imersão	ep	Controlo	ep
0	27,1	$\pm 1,2$	28,3	$\pm 1,3$	28,3	$\pm 0,8$
0,5	19,7	$\pm 0,8$	21,2	$\pm 0,8$	20,9	$\pm 0,6$
1	22,2	$\pm 1,2$	22,9	$\pm 0,7$	24,8	$\pm 0,9$
1,5	23,4	$\pm 0,6$	26,2	$\pm 1,1$	25,4	$\pm 0,7$
2	24,5	$\pm 1,5$	27,4	$\pm 1,6$	27,9	$\pm 1,1$
4	29,9	$\pm 1,7$	42,2	$\pm 1,9$	43,2	$\pm 2,2$
6	42,9	$\pm 2,3$	48,2	$\pm 2,2$	51,4	$\pm 2,6$
8	27,7	$\pm 1,6$	53,3	$\pm 2,8$	56,2	$\pm 2,9$

Tabela 7.9. Médias do peso fresco (mg) \pm ep das amostras para quantificação de actividades peroxidásicas durante os primeiros oito dias de enraizamento (Fig. 3.12).

Dia	AIB 3	ep	Imersão	ep	Controlo	ep
0	408	± 38	408	± 38	408	± 38
0.5	473	± 110	522	± 168	539	± 43
1	499	± 87	580	± 80	528	± 71
1.5	558	± 63	557	± 134	617	± 23
2	548	± 81	559	± 45	553	± 56
4	674	± 145	631	± 50	532	± 79
6	981	± 105	688	± 60	705	± 48
8	1260	± 30	741	± 13	717	± 33

Tabela 7.10. Médias das concentrações de AIA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ ps) \pm ep durante os oito primeiros dias de enraizamento na parte basal dos rebentos (Fig. 3.14A).

Dia	AIB 3	Imersão	Controlo			
0	1.827	± 0.627	1.827	± 0.627		
1	23.901	± 4.439	29.791	± 1.236	3.580	± 1.649
2	31.929	± 3.143	33.967	± 5.579	2.762	± 0.505
3	22.926	± 4.088	19.456	± 0.642	1.928	± 1.031
4	16.944	± 1.563	19.716	± 2.617	2.043	± 0.864
6	9.095	± 3.143	18.262	± 2.812	2.250	± 0.777
8	6.184	± 1.143	13.642	± 2.881	0.823	± 0.159

Tabela 7.11. Médias das concentrações de AIA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ ps) \pm ep durante os oito primeiros dias de enraizamento na parte apical dos rebentos (Fig. 3.14B).

Dia	AIB 3	ep	Imersão	ep	Controlo	ep
0	1.529	± 0.419	1.529	± 0.419	1.529	± 0.419
1	7.107	± 0.463	6.416	± 1.053	1.119	± 0.403
2	6.903	± 0.592	6.388	± 0.983	1.030	± 0.406
3	6.229	± 0.404	6.527	± 1.700	1.271	± 0.421
4	5.913	± 0.411	6.777	± 1.640	1.000	± 0.408
6	6.013	± 0.463	6.943	± 1.117	1.767	± 0.501
8	6.360	± 0.420	6.429	± 1.768	2.384	± 0.411

Tabela 7.12. Médias das concentrações de ALAsp ($\eta\text{mol g}^{-1}\text{ ps}$) $\pm\text{ep}$ durante os oito primeiros dias de enraizamento na parte basal dos rebentos (Fig. 3.15A).

Dia	AIB 3	ep	Imersão	ep	Controlo	ep
0	4,16	$\pm 2,24$	4,16	$\pm 2,24$	4,16	$\pm 2,24$
1	13,73	$\pm 2,42$	21,86	$\pm 4,10$	5,62	$\pm 2,79$
2	17,34	$\pm 5,78$	23,55	$\pm 3,21$	4,17	$\pm 1,36$
3	25,10	$\pm 2,03$	20,22	$\pm 4,85$	4,42	$\pm 1,01$
4	26,81	$\pm 2,39$	22,59	$\pm 3,96$	9,23	$\pm 3,18$
6	48,34	$\pm 4,90$	19,42	$\pm 2,62$	4,22	$\pm 1,48$
8	32,60	$\pm 3,34$	20,18	$\pm 2,90$	7,38	$\pm 1,18$

Tabela 7.13. Médias das concentrações de ALAsp ($\eta\text{mol g}^{-1}\text{ ps}$) $\pm\text{ep}$ durante os oito primeiros dias de enraizamento na parte apical dos rebentos (Fig. 3.15B).

Dia	AIB 3	ep	Imersão	ep	Controlo	ep
0	6,54	$\pm 1,65$	6,54	$\pm 1,65$	6,54	$\pm 1,65$
1	9,79	$\pm 2,50$	13,47	$\pm 3,37$	5,18	$\pm 2,26$
2	13,18	$\pm 2,33$	11,78	$\pm 2,37$	5,74	$\pm 1,92$
3	7,97	$\pm 2,25$	15,33	$\pm 2,19$	6,82	$\pm 2,82$
4	15,68	$\pm 3,27$	17,51	$\pm 1,33$	5,50	$\pm 2,29$
6	15,53	$\pm 2,28$	11,85	$\pm 2,85$	6,19	$\pm 2,25$
8	16,08	$\pm 4,02$	17,75	$\pm 3,17$	8,95	$\pm 3,02$

Tabela 7.14. Médias das concentrações de AIB ($\eta\text{mol g}^{-1}\text{ ps}$) $\pm\text{ep}$ durante os oito primeiros dias de enraizamento na parte basal dos rebentos (Fig. 3.16A).

Dia	AIB 3	ep	Imersão	ep	Controlo	ep
0	0,557	$\pm 0,202$	0,557	$\pm 0,202$	0,557	$\pm 0,202$
1	25,868	$\pm 5,637$	33,921	$\pm 5,188$	1,012	$\pm 0,508$
2	33,344	$\pm 4,819$	21,461	$\pm 6,036$	0,461	$\pm 0,072$
3	31,730	$\pm 5,919$	19,509	$\pm 5,222$	0,521	$\pm 0,048$
4	30,028	$\pm 3,744$	14,773	$\pm 4,524$	0,757	$\pm 0,185$
6	7,822	$\pm 3,046$	21,089	$\pm 5,694$	0,534	$\pm 0,166$
8	6,369	$\pm 1,534$	13,729	$\pm 1,487$	1,353	$\pm 0,415$

Tabela 7.15. Médias das concentrações de AIB ($\eta\text{mol g}^{-1}\text{ ps}$) $\pm\text{ep}$ durante os oito primeiros dias de enraizamento na parte apical dos rebentos (Fig. 3.16B).

Dia	AIB 3	ep	Imersão	ep	Controlo	ep
0	0,943	$\pm 0,364$	0,943	$\pm 0,364$	0,943	$\pm 0,364$
1	7,729	$\pm 3,085$	10,700	$\pm 0,855$	2,391	$\pm 0,579$
2	8,206	$\pm 2,082$	10,356	$\pm 0,427$	0,907	$\pm 0,551$
3	6,463	$\pm 0,961$	11,372	$\pm 0,808$	2,198	$\pm 0,471$
4	4,221	$\pm 1,203$	10,849	$\pm 0,958$	1,226	$\pm 0,351$
6	2,970	$\pm 0,452$	12,454	$\pm 0,466$	1,730	$\pm 0,761$
8	3,910	$\pm 0,430$	11,561	$\pm 0,587$	0,815	$\pm 0,349$

2.2. Análise de crescimento

Tabela 7.16. Análise de variância da biomassa total (Fig. 4.3).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr > F
Entre tratamentos	5	17313124,0	3462624,7	103,808	0,000
Erro	174	5803936,0	33356,0		
Total ajustado	179	23117059,0			

Tabela 7.17. Análise de variância da razão parte aérea : raiz (Fig. 4.4)

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr > F
Entre tratamentos	5	943,11	188,62	63,312	0,000
Erro	174	518,39	2,98		
Total ajustado	179	1461,50			

Tabela 7.18. Tabela de médias $\pm\text{ep}$ para o crescimento relativo em altura, biomassa total e razão parte aérea : raiz (Fig. 4.3 e 4.4).

Rizogénese	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)	Crescimento relativo	Biomassa total (mg)	Razão parte aérea : raiz
In vitro	150	$1,69 \pm 0,09$	$250,58 \pm 11,0$	$7,83 \pm 0,42$
	250	$2,02 \pm 0,08$	$335,91 \pm 14,1$	$6,63 \pm 0,41$
	Dia 0	-----	$56,88 \pm 2,4$	$1,43 \pm 0,11$
Ex vitro	150	$1,46 \pm 0,11$	$432,22 \pm 26,9$	$7,77 \pm 0,33$
	250	$3,14 \pm 0,08$	$974,59 \pm 74,9$	$6,70 \pm 0,23$
	Dia 0	-----	$59,74 \pm 3,4$	$4,10 \pm 0,26$

Tabela 7.19. Análise de variância da biomassa foliar (Fig. 4.5).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	5	7790726,5	1558145,3	99,880	0,000
Erro	174	2714438,1	15600,2		
Total ajustado	179	10505165,0			

Tabela 7.20. Análise de variância da biomassa foliar (Fig. 4.6A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Luz	1	81332,3	81332,3	38,778	0,000
Folha	2	1169989,3	584994,7	278,916	0,000
Luz * Folha	2	43848,9	21924,4	10,453	0,000
Erro	174	364945,6	2097,4		
Total ajustado	179	1660116,1			

Tabela 7.21. Análise de variância da biomassa foliar (Fig. 4.6B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Luz	1	2292186,6	2292186,6	80,096	0,000
Folha	2	6810198,3	3405099,2	118,985	0,000
Luz * Folha	2	1208706,5	604353,3	21,118	0,000
Erro	174	4979520,3	28617,9		
Total ajustado	179	15290612,0			

Tabela 7.22. Análise de variância da biomassa radicular (Fig. 4.7).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	5	252699,99	50539,99	86,895	0,000
Erro	174	101202,22	581,62		
Total ajustado	179	353902,21			

Tabela 7.23. Análise de variância para razão de peso foliar (Fig. 4.8).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	5	3,731	0,746	56,846	0,000
Erro	174	2,284	0,013		
Total ajustado	179	6,015			

Tabela 7.24. Tabela de médias \pm ep para a biomassa foliar, biomassa radicular e razão de peso foliar (LWR) (Fig. 4.5 a 4.8).

Rizogênese	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Biomassa foliar (mg)	Biomassa radicular (mg)	Razão peso foliar (LWR)
In vitro	150	162,12 \pm 8,59	29,36 \pm 1,35	0,66 \pm 0,031
	250	225,39 \pm 11,61	45,62 \pm 1,82	0,68 \pm 0,034
	Dia 0	24,24 \pm 1,81	25,23 \pm 1,90	0,34 \pm 0,018
Ex vitro	150	296,26 \pm 17,88	52,82 \pm 4,49	0,68 \pm 0,052
	250	634,80 \pm 50,86	127,21 \pm 9,30	0,65 \pm 0,053
	Dia 0	19,00 \pm 1,21	12,52 \pm 0,92	0,40 \pm 0,011

Tabela 7.25. Análise de variância da área foliar (Fig. 4.9).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr > F
Entre tratamentos	5	674355,96	134871,19	150,219	0,000
Erro	174	156222,23	897,83		
Total ajustado	179	830578,19			

Tabela 7.26. Análise de variância da área foliar (Fig. 4.10A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr > F
Luz	1	8785,0	8785,0	55,164	0,000
Folha	2	114588,2	57294,1	359,768	0,000
Luz * Folha	2	4187,9	2094,0	13,149	0,000
Erro	174	27710,0	159,3		
Total ajustado	179	155271,1			

Tabela 7.27. Análise de variância da área foliar (Fig. 4.10B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr > F
Luz	1	132801,5	132801,5	83,870	0,000
Folha	2	626386,0	313193,0	197,796	0,000
Luz * Folha	2	73098,3	36549,2	23,082	0,000
Erro	174	275514,5	1583,4		
Total ajustado	179	1107800,3			

Tabela 7.28. Análise de variância do número de folhas (Fig. 4.11A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Luz	1	11,41	11,41	7,506	0,007
Folha	1	12,68	12,68	8,340	0,005
Luz * Folha	1	10,21	10,21	6,717	0,011
Erro	116	176,30	1,52		
Total ajustado	119	210,59			

Tabela 7.29. Análise de variância do número de folhas (Fig. 4.11B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Luz	1	1,20	1,20	0,691	0,416
Folha	1	43,20	43,20	24,874	0,000
Luz * Folha	1	10,80	10,80	0,014	0,014
Erro	116	201,47	1,74		
Total ajustado	119	256,67			

Tabela 7.30. Análise de variância da área foliar específica (Fig. 4.12).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	5	153996,81	30799,36	6,390	0,000
Erro	174	838701,15	4820,12		
Total ajustado	179	992697,97			

Tabela 7.31. Análise de variância da área foliar específica (Fig. 4.13A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Luz	1	97868,4	97868,4	7,861	0,006
Folha	2	19841,9	97868,4	0,797	0,452
Luz * Folha	2	125222,7	9921,0	5,029	0,008
Erro	174	2166197,3	62611,4		
Total ajustado	179	2409130,4	12449,4		

Tabela 7.32. Análise de variância da área foliar específica (Fig. 4.13B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Luz	1	64071,2	64071,2	20,351	0,000
Folha	2	5960,4	2980,2	2,947	0,390
Luz * Folha	2	12792,3	6396,1	2,032	0,134
Erro	174	547812,2	3148,4		
Total ajustado	179	630636,1			

Tabela 7.33. Tabela de médias \pm ep para a área foliar, número de folhas novas e área foliar específica (SLA) (Fig. 4.9 a 4.13).

Rizogênese	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Área foliar (cm^2)	Número de folhas novas	Área foliar específica (SLA)
<i>In vitro</i>	150	50,88 \pm 2,25	4,67 \pm 0,21	313,71 \pm 15,41
	250	71,80 \pm 3,32	5,87 \pm 0,18	327,35 \pm 19,07
	Dia 0	4,64 \pm 0,26	-----	257,02 \pm 12,07
<i>Ex vitro</i>	150	102,05 \pm 5,37	6,23 \pm 0,27	354,66 \pm 7,21
	250	183,54 \pm 11,58	6,63 \pm 0,16	304,83 \pm 9,75
	Dia 0	7,40 \pm 0,53	-----	310,28 \pm 8,37

2.3. Histologia e anatomia foliar

Tabela 7.34. Análise de variância da espessura das folhas (Tab. 4.3).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Rizogênese	1	156,57	156,57	0,538	0,473
Luz	1	250,91	250,91	0,863	0,365
Rizogênese * Luz	1	0,26	0,26	0,001	0,977
Erro	92	26756,30	290,83		
Total ajustado	95	27164,03			

Tabela 7.35. Análise de variância do diâmetro da nervura central (Tab. 4.3).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Rizogênese	1	92,43	92,43	0,004	0,951
Luz	1	158307,53	158307,53	6,713	0,011
Rizogênese * Luz	1	217722,45	217722,45	9,232	0,003
Erro	92	2169604,80	23582,66		
Total ajustado	95	2545727,30			

Tabela 7.36. Análise de variância da espessura das folhas das plantas com raízes *in vitro* (Fig. 4.19A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	9	44154,9	4906,1	107,037	0,000
Erro	50	2291,8	45,8		
Total ajustado	59	46446,7			

Tabela 7.37. Análise de variância da espessura das folhas das plantas com raízes ex vitro (Fig. 4.19B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	9	40674,2	4519,4	33,559	0,000
Erro	50	6733,4	134,7		
Total ajustado	59	47407,6			

Tabela 7.38. Tabela de médias para a espessura da folha (μm) (Fig. 4.19A e B).

Rizogênese	Luz	fD0	fP	fI	f2	f3	fC
In vitro	150	82,0 \pm 0,9	109,5 \pm 4,0	109,3 \pm 1,9	121,7 \pm 1,9		
	250	81,0 \pm 2,7	92,1 \pm 1,1	128,0 \pm 1,7	108,0 \pm 1,8		
Ex vitro	150	81,9 \pm 4,2	103,4 \pm 7,4	121,7 \pm 5,6	104,8 \pm 4,5		
	250	82,3 \pm 3,9	109,2 \pm 4,4	106,4 \pm 3,6	101,5 \pm 3,6		
		94,1 \pm 3,9					178,5 \pm 4,8

Tabela 7.39. Análise de variância do diâmetro da nervura central (Fig. 4.20A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	9	1721829,0	191314,3	76,656	0,000
Erro	50	124787,5	2495,8		
Total ajustado	59	1846616,5			

Tabela 7.40. Análise de variância do diâmetro da nervura central (Fig. 4.20B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	9	959499,9	106611,1	36,716	0,000
Erro	50	145181,9	2903,6		
Total ajustado	59	1104681,8			

Tabela 7.41. Tabela de médias para o diâmetro da nervura central (μm) (Fig. 4.20A e B).

Rizogênese	Luz	fD0	fP	fI	f2	f3	fC
In vitro	150	563,1 \pm 13,6	684,1 \pm 12,4	754,4 \pm 3,7	934,5 \pm 24,4		
	250	390,6 \pm 13,3	378,2 \pm 16,8	678,3 \pm 26,4	783,1 \pm 25,1		
Ex vitro	150	507,9 \pm 13,1	616,4 \pm 7,7	661,4 \pm 22,0	777,2 \pm 19,3		
	250	505,3 \pm 9,9	536,2 \pm 17,4	680,7 \pm 23,0	896,9 \pm 34,4		
		586,3 \pm 29,3					801,5 \pm 23,7

Tabela 7.42. Análise de variância do número de células / 100 μm (Tab. 4.4 e 4.7).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Luz	1	5,20	5,20	0,886	0,362
Folha	3	1647,82	549,27	93,544	0,000
Luz * Folha	3	163,85	54,62	9,302	0,000
Erro	40	234,87	5,87		
Total ajustado	47	2051,75			

Tabela 7.43. Análise de variância do número de células das folhas (Fig. 4.21).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	9	3068,0	340,9	66,5	0,000
Erro	50	261,4	5,1		
Total ajustado	59	3329,4			

Tabela 7.44. Tabela de médias para o número de células 100 μm de comprimento de corte transversal (Fig. 4.21).

Rizogênese	Luz	fD0	fP	fI	f2	f3	fC
Ex vitro	150	47,3 \pm 1,5	38,6 \pm 1,5	28,4 \pm 0,4	50,7 \pm 1,1		
	250	44,5 \pm 1,1	35,7 \pm 0,3	34,2 \pm 0,7	33,2 \pm 0,4		
		39,1 \pm 0,7					51,9 \pm 0,4

Tabela 7.45. Análise de variância da espessura da epiderme superior (Tab. 4.6).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Rizogênese	1	27,200	27,200	7,150	0,009
Luz	1	0,940	0,940	0,247	0,626
Rizogênese * Luz	1	1,330	1,330	0,350	0,562
Erro	92	349,972	3,804		
Total ajustado	95	379,442			

Tabela 7.46. Análise de variância da espessura do parênquima em paliçada (Tab. 4.6).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Rizogênese	1	281,193	281,193	6,866	0,010
Luz	1	15,763	15,763	0,385	0,543
Rizogênese * Luz	1	19,171	19,171	0,468	0,503
Erro	92	3767,724	40,954		
Total ajustado	95	4083,850			

Tabela 7.47. Análise de variância da espessura do parênquima lacunoso (Tab. 4.6).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Rizogênese	1	22,912	22,912	0,410	0,530
Luz	1	60,961	60,961	1,091	0,299
Rizogênese * Luz	1	119,930	119,930	20146	0,146
Erro	92	5141,294	55,883		
Total ajustado	95	5345,097			

Tabela 7.48. Análise de variância da espessura da epiderme inferior (Tab. 4.6).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Rizogênese	1	44,146	44,146	25,743	0,000
Luz	1	7,763	7,763	4,527	0,036
Rizogênese * Luz	1	29,815	29,815	17,386	0,000
Erro	92	157,770	1,715		
Total ajustado	95	239,495			

Tabela 7.49. Análise de variância da espessura da epiderme superior (Fig. 4.22).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	9	140,57	15,62	5,144	0,000
Erro	50	151,81	3,04		
Total ajustado	59	292,38			

Tabela 7.50. Análise de variância da espessura da epiderme superior (Fig. 4.23).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	9	104,50	11,61	5,083	0,000
Erro	50	114,22	2,28		
Total ajustado	59	218,72			

Tabela 7.51. Tabela de médias para a espessura da epiderme superior (μm) (Fig. 4.22 e 4.23).

Rizogênese	Luz	fD0	fP	fI	f2	f3	fC
In vitro	150	13,9±0,6	13,8±0,5	14,4±0,7	16,3±1,3		
	250	13,3±0,7	15,4±0,5	14,4±0,6	17,1±0,4		
Ex vitro	150	12,2±0,5	13,3±0,5	13,5±1,0	16,0±0,5		
	250	12,1±0,4	14,5±0,5	13,0±0,4	15,3±0,5		
		12,6±0,9					11,8±0,6

Tabela 7.52. Análise de variância da espessura do parênquima em paliçada (Fig. 4.22).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	9	2955,28	328,36	37,456	0,000
Erro	50	438,33	8,77		
Total ajustado	59	3393,60			

Tabela 7.53. Análise de variância da espessura do parênquima em paliçada (Fig. 4.23).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	9	1568,17	174,24	21,711	0,000
Erro	50	401,27	8,03		
Total ajustado	59	1969,43			

Tabela 7.54. Tabela de médias para a espessura do parênquima em paliçada (μm) (Fig. 4.23 e 4.23).

Rizogênese	Luz	fD0	fP	f1	f2	f3	fC
In vitro	150		24,6 \pm 1,0	30,5 \pm 1,8	42,1 \pm 1,8	40,2 \pm 1,3	
	250		28,9 \pm 1,1	30,9 \pm 0,6	42,7 \pm 0,7	41,7 \pm 0,8	
Ex vitro	150		33,3 \pm 0,7	37,5 \pm 1,2	40,4 \pm 1,5	43,6 \pm 1,0	
	250		31,7 \pm 0,9	36,1 \pm 0,7	42,1 \pm 1,7	44,5 \pm 1,1	
			32,3 \pm 1,4				46,6 \pm 0,8

Tabela 7.55. Análise de variância da espessura do parênquima lacunoso (Fig. 4.22).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	9	3106,38	345,15	30,179	0,000
Erro	50	571,84	11,44		
Total ajustado	59	3678,21			

Tabela 7.56. Análise de variância da espessura do parênquima lacunoso (Fig. 4.23).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	9	1844,95	204,99	18,770	0,000
Erro	50	546,07	10,92		
Total ajustado	59	2391,03			

Tabela 7.57. Tabela de médias para a espessura do parênquima lacunoso (μm) (Fig. 4.22 e 4.23).

Rizogênese	Luz	fD0	fP	f1	f2	f3	fC
In vitro	150		51,9 \pm 1,7	46,8 \pm 2,2	34,3 \pm 1,9	33,7 \pm 1,0	
	250		47,2 \pm 1,5	41,7 \pm 1,2	32,6 \pm 0,7	30,0 \pm 0,3	
Ex vitro	150		45,2 \pm 1,2	40,9 \pm 1,1	37,1 \pm 1,7	30,8 \pm 1,2	
	250		47,6 \pm 1,7	40,8 \pm 1,4	36,8 \pm 1,8	31,3 \pm 1,0	
			45,4 \pm 1,4				35,5 \pm 5

Tabela 7.58. Análise de variância da espessura da epiderme inferior (Fig. 4.22).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	9	139,39	15,49	10,465	0,000
Erro	50	74,00	1,48		
Total ajustado	59	213,40			

Tabela 7.59. Análise de variância da espessura da epiderme inferior (Fig. 4.23).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	9	59,26	6,58	4,136	0,000
Erro	50	79,60	1,59		
Total ajustado	59	138,87			

Tabela 7.60. Tabela de médias para a espessura da epiderme inferior (μm) (Fig. 4.22 e 4.23).

Rizogênese	Luz	fD0	fP	f1	f2	f3	fC
In vitro	150	9,6±0,3	8,9±0,6	9,3±0,4	9,7±0,7		
	250	10,6±0,6	12,0±0,8	10,3±0,4	11,3±0,4		
Ex vitro	150	9,3±0,6	8,6±0,6	9,0±0,5	9,7±0,7		
	250	8,6±0,8	8,6±0,5	9,0±0,3	9,0±0,3		
		9,7±0,4					6,1±0,3

Tabela 7.61. Análise de variância da frequência estomática (Tab. 4.17 e 4.18).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Luz	1	205,84	205,84	0,277	0,608
Folha	3	253932,62	84644,21	113,726	0,000
Luz * Folha	3	550,10	183,37	0,246	0,863
Erro	40	29771,37	744,28		
Total ajustado	47	284459,93			

Tabela 7.62. Análise de variância da frequência estomática (Fig. 4.24).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	9	354040,8	39337,9	59,480	0,000
Erro	50	33068,0	661,4		
Total ajustado	59	387108,8			

Tabela 7.63. Tabela de médias para a frequência estomática (Fig. 4.24).

Rizogênese	Luz	fD0	fP	f1	f2	f3	fC
Ex vitro	150	406,5±7,5	309,2±15,6	240,8±9,8	224,2±8,9		
	250	418,4±11,7	302,5±18,6	246,8±6,1	229,5±3,3		
		409,0±6,8					231,8±8,0

2.3. Variação da perda de água

Tabela 7.64. Tabela de médias $\pm ep$ para a variação da perda de água por discos (%) (Fig. 4.25).

Tempo	f^1	ep	f^2	ep	f^3	ep	f^C	ep
10	32,1	$\pm 3,78$	31	$\pm 4,67$	28,1	$\pm 4,58$	20,74	$\pm 2,18$
20	60,3	$\pm 10,88$	67,3	$\pm 2,7$	54	$\pm 2,44$	32,03	$\pm 2,38$
30	75,6	$\pm 7,52$	80	$\pm 4,87$	71,6	$\pm 8,2$	37,91	$\pm 2,31$
40	84,8	$\pm 3,76$	86,3	$\pm 3,21$	82,9	$\pm 3,65$	42,14	$\pm 2,05$
50	88,8	$\pm 1,66$	91,1	$\pm 2,13$	89,1	$\pm 2,93$	45,68	$\pm 2,16$
60	92	$\pm 0,9$	93,6	$\pm 2,19$	92	$\pm 1,96$	48,83	$\pm 2,04$
80	94,3	$\pm 1,19$	95	$\pm 1,86$	94,3	$\pm 2,08$	51,08	$\pm 2,04$
100	95,4	$\pm 1,26$	96,4	$\pm 1,77$	95,5	$\pm 1,35$	54,9	$\pm 2,26$
120	96,1	$\pm 1,31$	96,1	$\pm 1,73$	95,7	$\pm 2,43$	57,53	$\pm 2,16$
140	96,4	$\pm 1,16$	95,8	$\pm 2,16$	96,7	$\pm 1,63$	60,19	$\pm 2,52$
160	96,8	$\pm 1,14$	96,4	$\pm 1,62$	97,3	$\pm 0,54$	62,47	$\pm 2,75$
180	97,4	$\pm 1,14$	96,8	$\pm 1,62$	97,5	$\pm 0,54$	64,83	$\pm 2,75$

Tabela 7.65. Tabela de médias $\pm ep$ para a variação da perda de água por discos (%) (Fig. 4.26).

Tempo	f^1	ep	f^2	ep	f^3	ep	f^C	ep
10	32,1	$\pm 3,78$	26	$\pm 4,67$	23	$\pm 4,58$	5,1	$\pm 1,11$
20	60,3	$\pm 6,88$	60	$\pm 2,7$	49	$\pm 2,44$	6,51	$\pm 1,18$
30	75,6	$\pm 7,52$	70	$\pm 4,87$	65	$\pm 4,2$	7,74	$\pm 0,94$
40	84,8	$\pm 3,76$	82	$\pm 3,21$	79	$\pm 3,65$	9,97	$\pm 1,79$
50	88,8	$\pm 1,66$	91,1	$\pm 2,13$	89,1	$\pm 2,93$	11,44	$\pm 2,27$
60	92	$\pm 0,9$	93,6	$\pm 2,19$	92	$\pm 1,96$	13,37	$\pm 3,09$
80	94,3	$\pm 1,19$	95	$\pm 1,86$	94,3	$\pm 2,08$	17,31	$\pm 4,64$
100	95,4	$\pm 1,26$	96,4	$\pm 1,77$	95,5	$\pm 1,35$	20,48	$\pm 6,1$
120	96,1	$\pm 1,31$	96,1	$\pm 1,73$	95,7	$\pm 2,43$	23,04	$\pm 5,98$
140	96,4	$\pm 1,16$	95,8	$\pm 2,16$	96,7	$\pm 1,63$	25,59	$\pm 6,04$
160	96,8	$\pm 1,14$	96,4	$\pm 1,62$	97,3	$\pm 0,54$	27,75	$\pm 5,88$
180	97,4	$\pm 1,14$	96,8	$\pm 1,62$	97,5	$\pm 0,54$	29,92	$\pm 6,1$

Tabela 7.66. Tabela de médias $\pm ep$ para a variação da perda de água por (%) (Fig. 4.27).

Tempo	fP	ep	f2	ep	f3	ep	fC	ep
10	47,34	$\pm 6,06$	44,57	$\pm 9,94$	37,15	$\pm 5,19$	25,74	$\pm 2,18$
20	72,47	$\pm 5,88$	71,56	$\pm 9,83$	64,32	$\pm 9,01$	32,03	$\pm 2,38$
30	82,53	$\pm 5,07$	86,48	$\pm 7,11$	76,58	$\pm 9,45$	37,91	$\pm 2,31$
40	88,40	$\pm 4,03$	90,46	$\pm 4,54$	84,25	$\pm 9,18$	42,14	$\pm 2,05$
50	90,46	$\pm 4,65$	92,60	$\pm 3,44$	88,32	$\pm 6,03$	45,68	$\pm 2,16$
60	92,33	$\pm 3,86$	93,28	$\pm 3,19$	90,38	$\pm 4,54$	48,83	$\pm 2,04$
80	94,24	$\pm 1,68$	93,86	$\pm 3,11$	91,76	$\pm 3,70$	51,08	$\pm 2,04$
100	95,70	$\pm 0,52$	94,49	$\pm 2,25$	93,71	$\pm 0,41$	54,9	$\pm 2,26$
120	95,70	$\pm 0,52$	94,72	$\pm 2,01$	94,38	$\pm 1,01$	57,53	$\pm 2,16$
140	96,37	$\pm 0,55$	94,94	$\pm 2,25$	94,61	$\pm 1,01$	60,19	$\pm 2,52$
160	96,67	$\pm 0,74$	95,07	$\pm 2,17$	94,95	$\pm 1,22$	62,47	$\pm 2,75$
180	96,80	$\pm 0,73$	95,07	$\pm 2,17$	94,95	$\pm 1,22$	64,83	$\pm 3,04$

Tabela 7.67. Tabela de médias $\pm ep$ para a variação da perda de água por folha (%) (Fig. 4.28).

Tempo	fP	ep	f2	ep	f3	ep	fC	ep
10	42,3	$\pm 3,20$	15,45	$\pm 3,59$	18,52	$\pm 13,26$	5,10	$\pm 1,11$
20	62,5	$\pm 5,48$	39,74	$\pm 6,76$	38,36	$\pm 17,93$	6,51	$\pm 1,18$
30	72,5	$\pm 7,01$	57,76	$\pm 10,18$	57,46	$\pm 25,13$	7,74	$\pm 0,94$
40	83,4	$\pm 7,75$	67,92	$\pm 10,86$	70,95	$\pm 25,66$	9,97	$\pm 1,79$
50	88,46	$\pm 6,18$	74,00	$\pm 8,87$	78,50	$\pm 23,92$	11,44	$\pm 2,27$
60	92,33	$\pm 4,58$	78,17	$\pm 6,88$	82,81	$\pm 21,76$	13,37	$\pm 3,09$
80	94,24	$\pm 2,32$	84,44	$\pm 3,85$	87,57	$\pm 16,22$	17,31	$\pm 4,64$
100	95,7	$\pm 1,09$	87,74	$\pm 3,13$	89,66	$\pm 13,26$	20,48	$\pm 6,1$
120	95,7	$\pm 0,92$	90,38	$\pm 2,45$	91,34	$\pm 9,81$	23,04	$\pm 5,98$
140	96,37	$\pm 0,82$	92,69	$\pm 1,71$	92,55	$\pm 6,28$	25,59	$\pm 6,04$
160	96,67	$\pm 0,84$	93,69	$\pm 1,58$	93,01	$\pm 4,70$	27,75	$\pm 5,88$
180	96,7	$\pm 0,90$	94,64	$\pm 1,40$	93,53	$\pm 3,18$	29,92	$\pm 6,1$

2.4. Clorofilas

Tabela 7.68. Análise de variância dos teores de clorofila a (Tab. 4.9).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Rizogênese	1	25,992	25,992	7,972	0,006
Luz	1	15,415	15,415	4,728	0,032
Rizogênese * Luz	1	174,892	174,892	53,641	0,000
Erro	124	404,291	3,260		
Total ajustado	127	620,590			

Tabela 7.69. Análise de variância dos teores de clorofila b (Tab. 4.9).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Rizogênese	1	16,046	16,046	19,052	0,000
Luz	1	22,361	22,361	26,550	0,000
Rizogênese * Luz	1	59,541	59,541	70,694	0,000
Erro	124	104,438	0,842		
Total ajustado	127	202,387			

Tabela 7.70. Análise de variância dos teores de clorofila total (Tab. 4.9).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Rizogênese	1	81,888	81,888	12,234	0,000
Luz	1	75,246	75,246	11,241	0,001
Rizogênese * Luz	1	437,119	437,119	65,303	0,000
Erro	124	830,024	6,694		
Total ajustado	127	1424,276			

Tabela 7.71. Análise de variância da razão entre clorofila a e b (Tab. 4.9).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Rizogênese	1	4,770	4,770	4,648	0,033
Luz	1	14,065	14,065	13,704	0,000
Rizogênese * Luz	1	18,173	18,173	17,706	0,000
Erro	124	127,270	1,026		
Total ajustado	127	164,277			

Tabela 7.72. Análise de variância dos teores de clorofila a (Fig. 4.29A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	270,6	33,8	30,176	0,000
Erro	63	70,6	1,1		
Total ajustado	71	341,2			

Tabela 7.73. Análise de variância dos teores de clorofila a (Fig. 4.29B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	83,90	10,49	14,051	0,000
Erro	63	47,02	0,75		
Total ajustado	71	130,92			

Tabela 7.74. Tabela de médias \pm ep para a concentração de clorofila a (mg g⁻¹ps) (Fig. 4.29).

Rizogênese	Luz	fD0	fP	fI	f2	f3
In vitro	150		8,96 \pm 0,52	9,23 \pm 0,45	6,15 \pm 0,36	4,98 \pm 0,29
	250		6,67 \pm 0,48	4,57 \pm 0,32	4,46 \pm 0,25	3,27 \pm 0,23
		5,12 \pm 0,45				
Ex vitro	150		5,50 \pm 0,28	4,35 \pm 0,25	3,41 \pm 0,18	4,93 \pm 0,15
	250		7,13 \pm 0,36	6,19 \pm 0,56	6,03 \pm 0,28	5,24 \pm 0,30
		4,14 \pm 0,19				

Tabela 7.75. Análise de variância dos teores de clorofila b (Fig. 4.30A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	9	84,1	10,51	19,824	0,000
Erro	50	33,4	0,53		
Total ajustado	59	117,5			

Tabela 7.76. Análise de variância dos teores de clorofila b (Fig. 4.30B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	10,21	1,28	4,413	0,000
Erro	63	18,23	0,29		
Total ajustado	71	28,44			

Tabela 7.77. Tabela de médias \pm ep para a concentração de clorofila b (mg g⁻¹ps) (Fig. 4.30).

Rizogênese	Luz	fD0	fP	fI	f2	f3
In vitro	150		3,74 \pm 0,23	4,2 \pm 0,21	2,56 \pm 0,14	2,5 \pm 0,12
	250		1,73 \pm 0,12	1,37 \pm 0,15	1,23 \pm 0,16	0,87 \pm 0,09
		2,79 \pm 0,21				
Ex vitro	150		1,83 \pm 0,30	1,38 \pm 0,12	1,14 \pm 0,17	1,38 \pm 0,12
	250		2,19 \pm 0,18	2,05 \pm 0,28	2,13 \pm 0,22	1,46 \pm 0,14
		1,30 \pm 0,06				

Tabela 7.78. Análise de variância dos teores de clorofila total (Fig. 4.31A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	619,4	77,4	31,596	0,000
Erro	63	154,4	2,5		
Total ajustado	71	773,8			

Tabela 7.79. Análise de variância dos teores de clorofila total (Fig. 4.31B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	149,50	18,69	11,992	0,000
Erro	63	98,17	1,56		
Total ajustado	71	247,68			

Tabela 7.80. Tabela de médias \pm ep para a concentração de clorofila total (mg g⁻¹ ps) (Fig. 4.31).

Rizogênese	Luz	JD0	fP	fI	fJ	f3
In vitro	150		12,7 \pm 0,54	13,4 \pm 0,85	8,75 \pm 0,75	7,51 \pm 0,54
	250		8,34 \pm 0,46	5,94 \pm 0,49	5,64 \pm 0,51	4,18 \pm 0,45
		7,92 \pm 0,43				
Ex vitro	150		7,15 \pm 0,52	5,75 \pm 0,35	4,34 \pm 0,30	6,33 \pm 0,20
	250		9,31 \pm 0,53	8,24 \pm 0,77	8,16 \pm 0,37	6,70 \pm 0,43
		5,43 \pm 0,21				

Tabela 7.81. Análise de variância da razão entre clorofila a e b (Fig. 4.32A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	38,8	4,85	9,505	0,000
Erro	63	32,2	0,51		
Total ajustado	71	71,0			

Tabela 7.82. Análise de variância da razão entre clorofila a e b (Fig. 4.32B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	4,54	0,57	0,377	0,929
Erro	63	94,78	1,50		
Total ajustado	71	99,32			

Tabela 7.83. Tabela de médias \bar{x} para a razão de clorofila a e clorofila b (Fig. 4.52).

Rizogênese	Luz	$fD0$	fP	fI	$f2$	$f3$
<i>In vitro</i>	150		2,57±0,21	2,23±0,14	2,74±0,09	2,32±0,09
	250		3,96±0,25	3,62±0,19	3,65±0,12	3,94±0,13
		1,94±0,12				
<i>Ex vitro</i>	150		3,34±0,42	3,31±0,30	3,55±0,50	3,80±0,43
	250		3,36±0,21	3,68±0,90	3,21±0,22	3,66±0,22
		3,25±0,21				

2.5. Fotossíntese

Tabela 7.84. Análise de variância da taxa de fotossíntese aparente (Tab. 4.11).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Rizogênese	1	17,880	17,880	23,352	0,000
Luz	1	1,216	1,216	1,588	0,210
Rizogênese * Luz	1	7,895	7,895	10,312	0,002
Erro	116	88,816	0,766		
Total ajustado	119	115,806			

Tabela 7.85. Análise de variância da taxa de transpiração (Tab. 4.11).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Rizogênese	1	19,805	19,805	45,558	0,000
Luz	1	5,892	5,892	13,554	0,000
Rizogênese * Luz	1	9,015	9,015	20,737	0,000
Erro	116	50,427	0,435		
Total ajustado	119	85,138			

Tabela 7.86. Análise de variância da condutância estomática (Tab. 4.11).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Rizogênese	1	6717,79	6717,79	9,125	0,003
Luz	1	5746,23	5746,23	7,805	0,006
Rizogênese * Luz	1	4779,32	4779,32	6,492	0,012
Erro	116	85399,34	736,201		
Total ajustado	119	102642,68			

Tabela 7.87. Análise de variância da taxa de fotossíntese aparente (Fig. 4.33A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	150,42	16,30	63,695	0,000
Erro	111	28,41	0,26		
Total ajustado	119	158,82			

Tabela 7.88. Tabela de médias \pm ep para a taxa de fotossíntese aparente ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Fig. 4.33A).

Rizogênese	Luz	fC	fP	fI	f2	f3
In vitro	150		1,01 \pm 0,09	1,89 \pm 0,11	3,31 \pm 0,20	3,16 \pm 0,18
	250		0,75 \pm 0,09	1,41 \pm 0,06	3,06 \pm 0,11	3,43 \pm 0,11
			4,52 \pm 0,19			

Tabela 7.89. Análise de variância da taxa de transpiração (Fig. 4.33B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	7,90	0,987	4,085	0,000
Erro	111	26,83	0,241		
Total ajustado	119	34,72			

Tabela 7.90. Tabela de médias \pm ep para a taxa de transpiração ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Fig. 4.33B).

Rizogênese	Luz	fC	fP	fI	f2	f3
In vitro	150		1,59 \pm 0,07	1,89 \pm 0,10	2,03 \pm 0,11	1,62 \pm 0,11
	250		1,76 \pm 0,24	1,51 \pm 0,09	1,67 \pm 0,08	1,77 \pm 0,10
			2,47 \pm 0,31			

Tabela 7.91. Análise de variância da condutância estomática (Fig. 4.33C).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	6079,2	759,9	1,550	0,000
Erro	111	54408,4	490,2		
Total ajustado	119	60487,6			

Tabela 7.92. Tabela de médias \pm ep para a condutância estomática ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Fig. 4.33C).

Rizogênese	Luz	fC	fP	fI	f2	f3
In vitro	150		81,16 \pm 3,92	73,79 \pm 5,20	87,1 \pm 5,82	69,16 \pm 3,39
	250		91,91 \pm 14,72	69,94 \pm 4,65	77,51 \pm 4,31	81,18 \pm 5,32
			81,96 \pm 6,59			

Tabela 7.93. Tabela de médias $\pm ep$ para a taxa de libertação de O_2 ($\mu\text{mol } O_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Fig. 4.34).

PPFD	fP	ep	f2	ep	f3	ep
0	-1,14	$\pm 0,07$	-1,18	$\pm 0,14$	-1,24	$\pm 0,08$
7	-0,78	$\pm 0,07$	-0,42	$\pm 0,18$	-0,60	$\pm 0,17$
18	-0,20	$\pm 0,08$	0,65	$\pm 0,18$	0,33	$\pm 0,20$
28	0,32	$\pm 0,06$	1,49	$\pm 0,18$	1,10	$\pm 0,15$
70	2,27	$\pm 0,07$	3,76	$\pm 0,15$	3,26	$\pm 0,15$
140	2,52	$\pm 0,08$	5,13	$\pm 0,20$	4,50	$\pm 0,20$
350	2,53	$\pm 0,19$	6,01	$\pm 0,13$	5,16	$\pm 0,20$
700	2,54	$\pm 0,07$	6,28	$\pm 0,09$	5,35	$\pm 0,14$

Tabela 7.94. Tabela de médias $\pm ep$ para a taxa de libertação de O_2 ($\mu\text{mol } O_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Fig. 4.35).

PPFD	fP	ep	f2	ep	f3	ep
0	-1,21	$\pm 0,07$	-0,92	$\pm 0,13$	-0,76	$\pm 0,09$
7	-0,79	$\pm 0,07$	-0,47	$\pm 0,17$	-0,38	$\pm 0,17$
18	-0,19	$\pm 0,07$	0,23	$\pm 0,17$	0,21	$\pm 0,09$
28	0,29	$\pm 0,07$	0,87	$\pm 0,17$	0,76	$\pm 0,05$
70	1,56	$\pm 0,07$	3,52	$\pm 0,15$	3,02	$\pm 0,13$
140	2,14	$\pm 0,07$	5,17	$\pm 0,09$	4,34	$\pm 0,10$
350	2,42	$\pm 0,19$	6,43	$\pm 0,13$	5,57	$\pm 0,10$
700	2,49	$\pm 0,07$	6,45	$\pm 0,08$	5,59	$\pm 0,13$

Tabela 7.95. Tabela de médias $\pm ep$ para a taxa de libertação de O_2 ($\mu\text{mol } O_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Fig. 4.36).

PPFD	fP	ep	f2	ep	f3	ep
0	-0,81	$\pm 0,01$	-1,19	$\pm 0,64$	-0,79	$\pm 0,54$
7	-0,60	$\pm 0,01$	-0,45	$\pm 0,52$	-0,32	$\pm 0,45$
18	-0,26	$\pm 0,04$	0,42	$\pm 0,32$	0,38	$\pm 0,32$
28	0,04	$\pm 0,29$	1,02	$\pm 0,42$	0,98	$\pm 0,38$
70	1,29	$\pm 0,15$	2,59	$\pm 0,42$	2,99	$\pm 0,45$
140	2,59	$\pm 0,37$	3,84	$\pm 0,35$	4,58	$\pm 0,40$
350	2,80	$\pm 0,15$	5,18	$\pm 0,42$	5,56	$\pm 0,45$
700	2,82	$\pm 0,37$	5,83	$\pm 0,35$	5,82	$\pm 0,40$

Tabela 7.96. Tabela de médias $\pm ep$ para a taxa de libertação de O_2 ($\mu\text{mol } O_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (Fig. 4.37 e 4.38).

PPFD	fP ep	f2 ep	f3 ep	fC ep
0	-1,11 $\pm 0,03$	-1,16 $\pm 0,05$	-1,19 $\pm 0,13$	-1,59 $\pm 0,31$
7	-0,58 $\pm 0,03$	-0,40 $\pm 0,20$	-0,38 $\pm 0,37$	-0,56 $\pm 0,31$
18	0,23 $\pm 0,07$	0,70 $\pm 0,30$	0,75 $\pm 0,39$	0,82 $\pm 0,43$
28	0,92 $\pm 0,02$	1,59 $\pm 0,42$	1,64 $\pm 0,44$	1,90 $\pm 0,50$
70	2,43 $\pm 0,04$	4,18 $\pm 0,41$	4,01 $\pm 0,56$	5,19 $\pm 0,62$
140	2,69 $\pm 0,09$	5,82 $\pm 0,40$	5,36 $\pm 0,72$	8,38 $\pm 0,74$
350	2,77 $\pm 0,10$	6,82 $\pm 0,27$	6,19 $\pm 0,67$	12,49 $\pm 0,39$
700	2,79 $\pm 0,10$	7,11 $\pm 0,20$	6,44 $\pm 0,67$	14,83 $\pm 0,49$

Tabela 7.97. Tabela de médias $\pm ep$ para a taxa fotossintética a PPFD de 350 $\mu\text{mol } \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\mu\text{mol } O_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Cl } \text{h}^{-1}$) (Fig. 4.39).

Rizogénese	Luz	fP	f2	f3
In vitro	150	31,32 $\pm 2,72$	86,41 $\pm 3,00$	112,06 $\pm 8,53$
	250	30,41 $\pm 4,23$	82,52 $\pm 5,02$	105,87 $\pm 7,51$
Ex vitro	150	46,96 $\pm 6,35$	89,91 $\pm 5,9$	69,27 $\pm 4,16$
	250	28,997 $\pm 2,42$	69,148 $\pm 8,41$	81,52 $\pm 15,33$

2.5. Hidratos de carbono solúveis e amido

Tabela 7.98. Análise de variância dos teores de glucose + frutose (Tab. 4.16).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr > F
Rizogénese	1	1910140,2	1910140,2	172,811	0,000
Luz	1	11889,0	11889,0	1,076	0,302
Rizogénese * Luz	1	12165,1	12165,1	0,296	0,296
Erro	124	1370616,9	11053,4		
Total ajustado	127	3304811,2			

Tabela 7.99. Análise de variância dos teores de sacarose (Tab. 4.16).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr > F
Rizogénese	1	49456,3	49456,3	15,959	0,000
Luz	1	88569,5	88569,5	28,581	0,000
Rizogénese * Luz	1	47286,9	47286,9	15,259	0,000
Erro	124	384265,6	3098,9		
Total ajustado	127	569578,3			

Tabela 7.100. Análise de variância dos teores de amido (Tab. 4.16).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Rizogênese	1	13201,7	13201,7	1,984	0,161
Luz	1	52601,1	52601,1	7,906	0,006
Rizogênese * Luz	1	216,3	216,3	0,033	0,859
Erro	124	824995,6	6653,2		
Total ajustado	127	891014,7			

Tabela 7.101. Análise de variância da razão hidratos de carbono solúveis / amido (Tab. 4.16).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Rizogênese	1	91,988	91,988	37,350	0,000
Luz	1	10,232	10,232	4,143	0,044
Rizogênese * Luz	1	3,280	3,280	1,328	0,251
Erro	124	306,216	2,469		
Total ajustado	127	411,716			

Tabela 7.102. Análise de variância dos teores de glucose - frutose (Fig.4.40A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	208491,3	26061,4	4,273	0,000
Erro	63	384255,1	6099,3		
Total ajustado	71	592746,4			

Tabela 7.103. Análise de variância dos teores de glucose - frutose (Fig.4.40B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	564023,7	70503,0	5,816	0,000
Erro	63	763720,8	12122,6		
Total ajustado	71	1327744,5			

Tabela 7.104. Tabela de médias \pm ep para as concentrações de glucose+frutose ($\mu\text{mol g}^{-1}$ ps) (Fig. 4.40).

Rizogênese	Luz	fD0	fP	fI	f2	f3
In vitro	150	409,4 \pm 40,6	317,2 \pm 17,4	312,6 \pm 17,4	286,3 \pm 18,8	
	250	256,3 \pm 24,8	322,6 \pm 34,1	373,7 \pm 35,7	217,8 \pm 18,6	
		295,5 \pm 28,7				
Ex vitro	150	558,7 \pm 28,8	529,6 \pm 54,3	519,3 \pm 38,9	617,2 \pm 31,5	
	250	468,6 \pm 55,3	564,8 \pm 37,3	600,7 \pm 30,9	591,4 \pm 33,0	
		310,3 \pm 29,2				

Tabela 7.105. Análise de variância dos teores de sacarose (Fig. 4.41A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	101521,5	12690,2	13,357	0,000
Erro	63	59854,2	950,1		
Total ajustado	71	161375,8			

Tabela 7.106. Análise de variância dos teores de sacarose (Fig. 4.41B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	253537,3	31692,2	8,249	0,000
Erro	63	242041,7	3841,9		
Total ajustado	71	495579,0			

Tabela 7.107. Tabela de médias \pm ep para as concentrações de sacarose ($\mu\text{mol g}^{-1}$ ps) (Fig. 4.41).

Rizogênese	Luz	fD0	fP	f1	f2	f3
In vitro	150		174,4 \pm 13,5	139,1 \pm 5,8	149,2 \pm 12,6	88,5 \pm 4,3
	250		151,5 \pm 4,0	139,1 \pm 17,7	199,3 \pm 13,4	118,0 \pm 9,9
		65,2 \pm 8,1				
Ex vitro	150		120,0 \pm 12,1	169,2 \pm 24,0	113,3 \pm 9,4	152,1 \pm 9,6
	250		224,3 \pm 22,9	206,0 \pm 15,7	262,1 \pm 42,0	226,5 \pm 28,6
		71,2 \pm 8,1				

Tabela 7.108. Análise de variância dos teores de amido (Fig. 4.42A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	532632,2	66579,0	12,650	0,000
Erro	63	331590,5	5263,3		
Total ajustado	71	864222,6			

Tabela 7.109. Análise de variância dos teores de amido (Fig. 4.42B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	268713,0	33589,1	17,849	0,000
Erro	63	118559,1	1881,9		
Total ajustado	71	387272,1			

Tabela 7.110. Tabela de médias \pm ep para as concentrações de amido ($\mu\text{mol g}^{-1}$ psi) (Fig. 4.42).

Rizogénese	Luz	fD0	fP	fI	f2	f3
In vitro	150		104,5 \pm 5,2	126,4 \pm 7,8	208,0 \pm 23,9	251,7 \pm 39,4
	250		130,6 \pm 6,5	158,0 \pm 9,7	259,9 \pm 32,3	314,6 \pm 49,2
		18,3 \pm 1,1				
Ex vitro	150		140,0 \pm 10,1	203,5 \pm 16,1	137,5 \pm 14,4	138,7 \pm 6,9
	250		177,9 \pm 16,6	131,9 \pm 7,5	243,3 \pm 26,1	218,3 \pm 22,0
		22,3 \pm 1,1				

Tabela 7.111. Análise de variância da razão hidratos de carbono solúveis / amido (Fig. 4.43A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	1507,1	188,4	65,224	0,000
Erro	63	182,0	2,9		
Total ajustado	71	1689,1			

Tabela 7.112. Análise de variância da razão hidratos de carbono solúveis / amido (Fig. 4.43B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	8	1134,9	141,9	35,830	0,000
Erro	63	249,4	4,0		
Total ajustado	71	1384,3			

Tabela 7.113. Tabela de médias \pm ep para a razão solúveis / amido (Fig. 4.43).

Rizogénese	Luz	fD0	fP	fI	f2	f3
In vitro	150		5,7 \pm 0,50	3,7 \pm 0,19	2,5 \pm 0,35	1,7 \pm 0,24
	250		3,2 \pm 0,26	3,0 \pm 0,39	2,5 \pm 0,39	1,3 \pm 0,27
		17,0 \pm 1,52				
Ex vitro	150		5,1 \pm 0,47	3,5 \pm 0,24	5,0 \pm 0,60	5,6 \pm 0,34
	250		4,1 \pm 0,59	6,1 \pm 0,60	3,8 \pm 0,52	4,1 \pm 0,62
		15,0 \pm 1,22				

2.6. Proteína total solúvel

Tabela 7.114. Análise de variância dos teores de proteína solúvel total (Tab. 4.18).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr > F
Rizogênese	1	23005,13	23005,13	189,736	0,000
Luz	1	4008,48	4008,48	33,060	0,000
Rizogênese * Luz	1	4433,76	4433,76	36,568	0,000
Erro	124	15034,74	121,248		
Total ajustado	127	46482,11			

Tabela 7.115. Análise de variância dos teores de proteína solúvel total (Fig. 4.44A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr > F
Entre tratamentos	8	564,26	70,53	6,047	0,000
Erro	63	734,84	11,66		
Total ajustado	71	1299,10			

Tabela 7.116. Análise de variância dos teores de proteína solúvel total (Fig. 4.44B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr > F
Entre tratamentos	8	15418,71	1927,34	10,457	0,000
Erro	63	11611,31	184,31		
Total ajustado	71	27030,02			

Tabela 7.117. Tabela de médias \pm ep para a proteína solúvel total (mg g⁻¹ps) (Fig. 4.44).

Rizogênese	Luz	fD0	fP	f1	f2	f3
In vitro	150	19,0±0,88	16,1±0,53	15,8±1,76	21,4±1,78	
	250	22,8±1,52	17,7±1,13	16,2±1,23	13,2±0,49	
		18,6±0,66				
Ex vitro	150	40,2±3,38	33,6±4,40	25,5±1,85	33,1±2,62	
	250	76,2±4,4	53,2±2,29	45,4±6,32	49,5±6,56	
		59,3±7,65				