



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
MESTRADO EM MELHORAMENTO DE PLANTAS

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CO₂
NA ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS
DE CASTANHEIRO REGENERADAS *IN VITRO*

Maria Teresa Pita Pegado Gonçalves Rodrigues Coelho

Évora

1999

*A parte experimental deste trabalho foi parcialmente
financiada por verbas do Projecto PAMAF 6127.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor José Carlos Gonçalves, orientador científico deste trabalho, quero expressar um profundo agradecimento pelo seu incentivo, por toda a disponibilidade e pelo apoio constante. Agradeço ainda as sugestões e críticas prestadas durante a sua redacção e por todo o empenho em me ensinar tudo o que de novo me foi dado a conhecer.

À Eng^a Técnica Graça Diogo, do Laboratório de Biologia Vegetal da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, agradeço toda a colaboração prestada na realização prática de partes experimentais, bem como a sua amizade e boa disposição.

À Doutora Leonor Osório, a colaboração prestada nas determinações da capacidade fotossintética.

À Doutora Teresa Quilhó, o apoio prestado na utilização do equipamento de medida histológica.

À Escola Superior Agrária de Castelo Branco, por ter possibilitado a realização da parte experimental deste trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Florestal do Instituto Superior de Agronomia, a disponibilização de equipamentos.

À Fundação Para a Ciência e a Tecnologia desejo agradecer o apoio financeiro concedido, através da Bolsa de Mestrado.

Ao INIA, através do Projecto PAMAF 6127, o apoio financeiro prestado para a realização de partes experimentais deste trabalho.

À minha família pelo estímulo e apoio ilimitado que me concedeu ...

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 CO ₂ dependente de CO ₂	G - Condutância estomática
A _{max} - Taxa de libertação de O ₂ dependente do CO ₂ em condições de luz e CO ₂ saturantes	HR - Humidade relativa
Abs - Absorvência	LAR - Razão de área foliar
AIB - Ácido indol-3-butírico	LWR - Razão de peso foliar
BAP - 6-Benzilaminopurina	MO - Microscopia óptica
Cap. - Capítulo	MS - Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962)
C _i - Concentração de CO ₂ nos espaços intercelulares	n - Número de amostras
C _o - Concentração de CO ₂ no exterior	NAR - Taxa de assimilação líquida
Cl _a - Concentração de clorofila a nas folhas	P - Probabilidade estatística
Cl _b - Concentração de clorofila b nas folhas	Pf - Peso fresco
Cl _{total} - Concentração de clorofila total nas folhas	Pfi - Peso fresco inicial
E - Taxa de transpiração	Pft - Peso fresco no tempo t
e.p. - erro-padrão	PPFD - Densidade de fluxo fotónico fotossinteticamente activo
EDTA - Tetra-acetato de etilenodiamina	Ps - Peso seco
FAA - Fixador (formaldeído 35%:ácido acético glacial:etanol:água, 10:5:50:35, v:v)	PVPP - Polivinilpolipirrolidina
f1 - Primeira folha com desenvolvimento na fase de aclimatização (folha um)	R - Taxa de respiração no escuro
f2 - Segunda folha com desenvolvimento na fase de aclimatização (folha dois)	r ² - Coeficiente de correlação
f3 - Terceira folha com desenvolvimento na fase de aclimatização (folha três)	RGR - Taxa de crescimento relativo
Fig. - Figura	Rubisco - Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase
fP - Folhas desenvolvidas durante a fase de multiplicação e existentes no final da fase de aclimatização (folhas persistentes)	SLA - Área foliar específica
	Tab. - Tabela
	v:v - Volume:volume
	φ - Rendimento quântico aparente
	I ₀ - Ponto de compensação para a luz
	θ - Convexidade da curva de resposta da taxa de fotossíntese à intensidade luminosa

RESUMO

Este trabalho teve como objectivo avaliar a influência da concentração de CO₂ na fase de aclimatização de plantas de castanheiro regeneradas *in vitro*. Estudaram-se duas concentrações de CO₂, 350 µL L⁻¹ e 700 µL L⁻¹ e os seus efeitos foram avaliados por análise de crescimento, anatomia foliar, concentração de clorofilas, parâmetros fotossintéticos e concentração foliar de proteína solúvel total.

Não tendo tido influência na sobrevivência, o nível de CO₂ provocou diferenças no desenvolvimento vegetativo das microplantas e parâmetros como crescimento relativo, razão de peso seco parte aérea / raiz, área foliar específica e razão de área foliar mostraram ser significativamente incrementados pela maior concentração de CO₂. No caso das plantas aclimatizadas a CO₂ ambiente só os parâmetros do sistema radicular se mostraram superiores.

Verificou-se uma gradual adaptação das estruturas histológicas das folhas ao longo do decorrer do processo, como consequência dos decréscimos de humidade em que se foram desenvolvendo e não tanto como uma resposta ao nível de CO₂ utilizado. As novas folhas formadas possuem células do mesófilo e do cilindro vascular mais diferenciadas e uma reduzida frequência estomática.

Os estudos feitos sobre trocas gasosas revelaram taxas de fotossíntese aparente idênticas para os dois grupos de plantas, apesar dos valores de clorofila total serem superiores para as plantas aclimatizadas a CO₂ ambiente. No entanto, as plantas aclimatizadas a CO₂ elevado apresentaram uma razão clorofila *a* / clorofila *b* bastante superior, permitindo assim compensar a menor quantidade em clorofila total. Este facto poderá também contribuir para as diferenças significativas registadas na capacidade fotossintética (A_{max}), em que as plantas aclimatizadas a CO₂ elevado apresentaram valores próximos do dobro comparativamente aos das plantas aclimatizadas a CO₂ ambiente. Idêntico comportamento se verificou com os valores do rendimento quântico e ponto de compensação para a luz sempre mais favoráveis para as plantas aclimatizadas a CO₂ elevado.

Palavras chave: aclimatização; castanheiro; CO₂; fotossíntese; micropropagação.

ABSTRACT

The effects of two CO₂ concentrations during acclimatization were investigated in micropropagated chestnut plants and evaluated by growth analysis, leaf anatomy, photosynthesis, chlorophyll's and soluble protein content.

The used levels of CO₂ have no effects on plant survival, but the higher level (700 µL L⁻¹) was associated to a vigorous growth expressed by an increase on relative growth, shoot/root ratio, specific leaf area and leaf area ratio. The lower CO₂ level (350 µL L⁻¹) only increased the root parameters.

Leaf characteristics were modified during acclimatization as consequence of decreasing humidity, and not as a response between the two CO₂ levels, and the new leaves formed had a more differentiated mesophyll cells, more vascular and support tissues in mid rib veins and a reduced stomatal frequency.

Pigment content was higher in plants acclimatized at lower CO₂ level, but chlorophyll *a/b* ratio was significantly lower when compared to plants acclimatized under elevated CO₂. The net photosynthesis rate was similar in both treatments but the plants acclimatized at elevated CO₂ showed a significant increase in maximum photosynthetic rate (A_{max}), light saturated point and quantum yield and a lower light compensation point, wich reveals their best physiological development.

Key words: acclimatization; chestnut; CO₂; photosynthesis; micropropagation.

ÍNDICE

<i>Agradecimentos</i>	<i>iv</i>
<i>Símbolos e abreviaturas</i>	<i>v</i>
<i>Resumo e palavras chave</i>	<i>vi</i>
<i>Abstract and key-words</i>	<i>vii</i>
<i>Índice</i>	<i>viii</i>

I. INTRODUÇÃO

1. CASTANHEIRO	2
1.1. <i>Caracterização botânica</i>	2
1.2. <i>Importância económica</i>	4
1.3. <i>Sistemas de multiplicação</i>	7
1.3.1. <i>Técnicas convencionais</i>	7
1.3.2. <i>Sistemas in vitro – micropropagação</i>	9
1.3.2.2. <i>Aspectos gerais</i>	9
1.3.2.2. <i>A micropropagação no castanheiro</i>	19
2. CARACTERIZAÇÃO DA FASE DE ACLIMATIZAÇÃO	21
2.1. <i>Características morfo-fisiológicas das microplantas</i>	22
2.2. <i>Factores que condicionam a fase de aclimatização</i>	25
2.2.1. <i>Factores biológicos</i>	25
2.2.2. <i>Factores físicos</i>	28
2.2.3. <i>Concentração de dióxido de carbono</i>	31
3. OBJECTIVOS DO TRABALHO	32

II. MATERIAL E MÉTODOS DE CULTURA

1. MATERIAL VEGETAL	35
2. CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTURA PARA ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO	35
3. FASE DE ACLIMATIZAÇÃO	40
3.1. <i>Tratamentos de aclimatização</i>	41
3.2. <i>Parâmetros quantificadores</i>	42
3.2.1. Análise de crescimento	42
3.2.2. Histologia e anatomia foliar	45
3.2.3. Quantificação de clorofilas	47
3.2.4. Fotossíntese	48
3.2.4.1. Taxa de fotossíntese aparente, transpiração e condutância estomática	48
3.2.4.2. Curvas de resposta à luz, capacidade fotossintética, rendimento quântico e ponto de compensação para a luz	50
3.2.5. Quantificação da proteína solúvel total	53
3.3. <i>Quantificação e tratamento estatístico dos dados</i>	54

III. RESULTADOS

1. ANÁLISE DE CRESCIMENTO	57
1.1. <i>Crescimento relativo, biomassa total e razão peso seco parte aérea/raiz</i>	57
1.2. <i>Peso fresco, razão peso fresco parte aérea/raiz e razão peso fresco/peso seco</i>	59
1.3. <i>Biomassa foliar, radicular e razão de peso foliar</i>	61
1.4. <i>Área foliar e área foliar específica</i>	63
1.5. <i>Taxa de crescimento relativo, taxa líquida de assimilação e razão de área foliar</i>	65
1.6. <i>Morfologia radicular: comprimento, área, volume e diâmetro</i>	66

2. HISTOLOGIA E ANATOMIA FOLIAR	67
2.1. <i>Análise qualitativa</i>	67
2.1.1. Observações histológicas	67
2.1.2. Estomas	68
2.2. <i>Indicadores quantitativos</i>	74
2.2.1. Espessura da folha, espessura da nervura principal e cilindro vascular e número de células	74
2.2.2. Estrutura interna e frequência estomática	78
3. CLOROFILAS	81
4. FOTOSÍNTESE	86
4.1. <i>Taxa de fotossíntese aparente, transpiração e condutância estomática</i>	86
4.2. <i>Curvas de resposta à luz e capacidade fotossintética</i>	88
4.3. <i>Rendimento quântico</i>	91
4.4. <i>Ponto de compensação para a luz</i>	92
5. PROTEÍNA SOLÚVEL TOTAL	93
IV. DISCUSSÃO	
<hr/>	
1. Análise de crescimento	97
2. Histologia e anatomia foliar	100
3. Clorofilas e fotossíntese	103
4. Proteína solúvel total	107
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
<hr/>	
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
<hr/>	
VII. ANEXOS	129
<hr/>	

1. CASTANHEIRO

1.1. Caracterização botânica

O castanheiro europeu, que apresenta uma distribuição preferencial por todo o sul mediterrânico, pertence ao género *Castanea* Miller, classe das Dicotiledóneas e à família das Fagáceas, juntamente com os géneros *Fagus* e *Quercus*.

O género *Castanea*, para além do castanheiro europeu, *Castanea sativa* Miller, inclui ainda mais doze espécies, das quais cinco de origem asiática (*C. henryi* Rehder e Wilson, *C. molissima* Blume, *C. crenata* Sieb e Zucc., *C. seguinii* Dode e *C. davidii* Dode) e sete de origem americana, *C. dentata* (Marsh.) Borkh, *C. pumila* Miller, *C. floridiana* Ashe, *C. paucispina* Ashe, *C. alnifolia* Nuttal, *C. ashei* Sudworth e *C. azarkensis*, onde possui uma grande diversidade de morfologia e dimensões (Fig. 1.1).

Figura 1.1. Dimensões máximas das várias espécies do género *Castanea* (Adaptado de Vieitez et al., 1986).

Para além da autóctone *C. sativa*, há que referir o particular interesse no nosso país da *C. crenata* e da *C. molissima*, não pela sua produtividade, já que são espécies de maiores exigências edafo-climáticas, mas sim pelo facto de terem sido espécies utilizadas como dadoras de genes de resistência à doença da tinta. Esta grave enfermidade é provocada por dois fungos ficomicetas pertencentes à família *Pythiaceae*, a *Phytophthora cambivora* (Petri) Buis e *Phytophthora cinnamoni* Rands, e tem vindo a tornar-se um dos factores determinantes na drástica redução da área de cultura e, conseqüentemente, de produção da espécie, juntamente com o cancro do castanheiro, provocado pelo fungo *Cryphonectria parasitica* Murr.

O castanheiro europeu é considerado uma árvore de grande porte e longevidade, com crescimento rápido até aos setenta, oitenta anos (com acréscimos de 10-20 mm de diâmetro/ano, o que é significativo para espécies com lenho de alta qualidade), idade a partir da qual começa a estabilizar, podendo nesta fase atingir alturas de 20, 30 metros, com copa ampla e semiesférica.

O sistema radicular é constituído por raízes profundas e robustas, desenvolvendo abundante e longo sistema radicular horizontal. Prefere solos ligeiros, frescos e bem drenados, e cujo pH não ultrapasse os 6 - 6,5. É, sem dúvida, uma espécie de altitude, onde em regime de talhadia e alto fuste cresce até aos 1200 - 1300 metros e, em produção de fruto, até cerca dos 800 metros.

As condições climáticas exigidas variam desde o marítimo atlântico (com inverno ameno e verão pluvioso), mediterrânico (verão quente e seco) ao continental (inverno rigoroso e verão quente); com necessidades de água da ordem dos 700 mm por ano, com especial exigência no final do verão (Agosto-Setembro), período durante o qual os frutos se desenvolvem até ao seu tamanho final.

O género *Castanea*, caracteriza-se por serem árvores ou arbustos caducifólios e terem folhas alongadas e muito serradas. O pseudofruto é uma glande volumosa, castanha, de epicarpo coriáceo, cúpula acrescente e espinhosa (ouriço), desenvolvendo-se este nos ramos do ano, na parte terminal a subterminal (Franco, 1971).

As flores masculinas estão agrupadas quer sobre os amentilhos unissexuais, quer sobre a parte superior dos amentilhos andróginos, tendo na base as inflorescências das flores femininas. O grão de pólen é muito pequeno, 14 µm de diâmetro para pólen de genomas diplóides e 17 µm para pólen de genomas tetraplóides (Dermen e Diller, 1962).

A ântese das flores masculinas dá-se, de acordo com os anos, da segunda quinzena de Junho para os mais precoces, a meados de Julho para os mais tardios. A maturação dos frutos ocorre entre Outubro e Novembro.

As flores femininas são solitárias ou em inflorescências paucifloras ou em amentos, envolvidas por um invólucro de brácteas (cúpula), com perianto 4-7 lobado e com ovário ínfero, 3-6 carpelar. Cada flor contém vários óvulos, podendo dar um fruto com uma ou mais sementes (Franco, 1971).

A taxa de autofecundação é muito reduzida pelo que é indispensável haver fecundação cruzada, necessitando o pólen de condições climáticas adequadas que favoreçam o seu transporte, quer pelos insectos quer pelo vento, durante o período de floração.

Todas as espécies do género *Castanea* possuem igual número de cromossomas, $2n = 24$ (Jaynes, 1962) e as espécies híbridas que têm sido estudadas são androestéreis, bem como algumas espécies chinesas e japonesas (Jaynes, 1963).

1.2. Importância económica

Desde sempre que o castanheiro desempenhou um papel relevante na economia rural das populações mais desfavorecidas das regiões interiores do nosso país. O seu fruto desde sempre foi utilizado quer para a alimentação humana quer para a dos animais. No que respeita ao aproveitamento do lenho, este possui excepcionais características de interesse sendo utilizado na construção e na indústria do mobiliário e de tanoaria, tornando-se numa segunda fonte de rendimento.

As castanhas portuguesas têm sido reconhecidas pela sua superior qualidade, sendo de referir entre as variedades mais comercializadas a Longal, Judia, Verdeal, Martaínha, Côta, Lada, Bária, Colarinha e Negral.

As regiões mais importantes de distribuição geográfica desta espécie situam-se em Trás-os-Montes (Carrazeda de Montenegro, Bragança e Vinhais), Beira Interior (Trancoso, Sabugal e Guarda) e com menor significado no Alentejo (Castelo de Vide, Marvão e Portalegre). Segundo o Instituto Nacional de Estatística, relativamente aos dados publicados do último ano (1997), a superfície total de soutos é de 19406 h com

uma produção de 20311 t (Tabela 1.1). A superfície total ocupada poderia atingir valores muito superiores para esta espécie, mas a doença da tinta, o envelhecimento dos castanheiros existentes, o preço da sua madeira, os incêndios florestais e até mesmo a substituição por espécies de crescimento mais rápido (como o pinheiro bravo e o eucalipto), muito têm contribuído para ao seu desaparecimento.

Tabela 1.1. Área (h) e produção (t) de castanha, por regiões.

Regiões	Superfície (h)	Produção (t)
Continente	19.406	20.321
Norte	16.709	17.306
Entre-Douro e Minho	332	256
Trás-Os-Montes	16.377	17.050
Centro	2.445	2.780
Beira Litoral	261	280
Beira Interior	2.184	2.500
Lisboa e Vale do Tejo	15	11
Alentejo	210	210
Algarve	27	14

Fonte: INE, Estatísticas Agrícolas, 1997

A nível mundial a área de distribuição do género *Castanea* reduz-se apenas a três zonas bem distintas: Europa mediterrânica, Sudeste dos Estados Unidos da América e o núcleo do Oriente, que abrange o Japão, a Coreia e a China Oriental (Alves, 1988).

Na Tabela 1.2 estão indicados os valores da importação e exportação disponíveis pelo Instituto Nacional de Estatística, para o ano de 1997 (dados definitivos) e dados preliminares do ano de 1998 (Janeiro a Setembro de 1998), pela qual se pode verificar a elevada importação de madeira. As exportações de castanha efectuam-se sobretudo para o Brasil, França e Espanha, e as importações são essencialmente provenientes de França. No caso da madeira de castanheiro, as exportações são, na quase totalidade, para Espanha, e as importações são efectuadas de França e Espanha.

A Tabela 1.3 mostra a evolução da área, produção e rendimento de castanha, de 1980 a 1992, pela qual se verifica o decréscimo na produção ao longo dos anos, embora tenha havido um aumento progressivo dos povoamentos. Em relação aos valores de 1991, a produção foi fortemente afectada em consequência da forte estiagem durante os meses do Verão.

Nos dois sistemas de exploração desta espécie, quer para fruto quer na exploração florestal, deve-se atender a factores tão importantes como a utilização de plantas resistentes à doença da tinta e ao cancro, não esquecendo as condições edafo-climáticas. A planificação dos programas de melhoramento genético terá pois que ter em conta a sua dupla finalidade: melhoramento das características culturais sob o ponto de vista da produção de fruto e de lenho, e a obtenção de material vegetal resistente a doenças.

Tabela 1.2. Valores de importações e exportações de castanha e madeira de castanheiro (ano de 1997 e preliminares de 1998).

		Importação		Exportação	
		100 Kg	1000 Esc.	100 Kg	1000 Esc.
Castanha	1997	3 478	62 551	66 041	1 848 375
	1998*	175	4 084	4 176	133 761
Madeira	1997	420 994	1 305 155	2 605	18 102
	1998*	322 503	1 061 632	280	1 710

Fonte: INE, Estatísticas de Comércio Externo

* Preliminares 1998 (Jan/Set)

Tabela 1.3. Evolução da área, produção e rendimento de castanha de 1980 a 1992.

Ano	Área (h)	Produção (t)	Rendimento (Kg/h)
1980	13 683	20 224	1 478
1981	13 759	18 200	1 323
1982	13 852	17 290	1 248
1983	13 923	18 846	1 354
1984	14 035	17 901	1 275
1985	14 191	17 005	1 198
1986	14 359	16 325	1 137
1987	14 573	18 000	1 235
1988	14 824	17 400	1 174
1989	15 061	20 880	1 386
1990	15 070	20 250	1 344
1991	15 800	15 600	987
1992	16 770	15 000	894

Fonte: INE, Portugal Agrícola

Em relação à qualidade e quantidade de fruto, pode-se afirmar que as nossas variedades são susceptíveis de fornecer toda uma gama de variabilidade capaz de as adaptar às diferentes condições edafo-climáticas, bem como no que diz respeito à possibilidade de fruto para transformação industrial. No que respeita à qualidade do lenho, a selecção de árvores elite permitirá dispôr de material vegetativo em abundância.

Sem dúvida, a obtenção de material vegetal resistente a doenças é prioritário mas muito mais complicado. Em face da resistência quase nula da *Castanea sativa* à doença da tinta, recorreu-se à hibridação desta espécie com espécies exóticas, em especial a *Castanea crenata*, como portadora de genes de resistência, utilizando metodologias que permitissem a transmissão desses genes para o castanheiro europeu. Para tal, executaram-se retrocruzamentos sucessivos a fim de aumentar a incorporação de genes do progenitor recorrente, bem como os genes de características importantes do dador. O objectivo foi conseguir reunir num indivíduo características importantes que se encontrem dispersas pelos seus progenitores e, eventualmente, obter o chamado vigor híbrido ou heterosis. Alguns híbridos de *Castanea sativa* x *Castanea crenata* foram obtidos na década de 60, no ex-Centro de Estudos do Castanheiro (Vimioso, Alcobaça) e foram considerados resistentes à doença da tinta (Fernandes, 1948, 1957, 1970, 1982).

Mas só a possibilidade de multiplicar em larga escala os indivíduos seleccionados, permitirá o desenvolvimento e concretização destes programas. Contudo, a quase total autoesterilidade do castanheiro, não permite a obtenção de linhas com genótipo estável, pelo que a multiplicação vegetativa é a única via a explorar.

1.3. Sistemas de multiplicação

1.3.1. Técnicas convencionais

Para a obtenção de plantas de castanheiro, dispõem-se de dois métodos possíveis: a propagação por via sexuada ou seminal e a propagação por via assexuada ou vegetativa. No caso da propagação assexual, trata-se de um mecanismo de reprodução a partir de estruturas vegetativas da planta progenitora, que só é possível porque qualquer célula vegetal contém toda a informação genética necessária para regenerar uma planta completa, sendo esta característica das células vegetais designada por totipotência celular. Esta reprodução vegetativa pode dar-se por formação de rebentos e raízes adventícias, ou pela união de partes vegetativas, isto é, por enxertia.

Várias são as razões que justificam esta metodologia para a propagação de plantas:

- manutenção de clones. A propagação vegetativa faz uso exclusivo de divisões mitóticas, onde a divisão do material genético é feita de uma forma equacional para as células filhas, deste modo, está garantida a uniformidade genotípica da descendência à qual se dá o nome de clone (Stern,1943).
- propagação de plantas sem semente. É o único processo de propagar espécies que não produzem semente viável, como por exemplo algumas variedades de bananeira, figueira, laranjeira e videira;
- condução na forma de crescimento. Durante a fase juvenil as plantas apresentam normalmente, diferentes padrões de crescimento, o que pode ser parcialmente orientado pela propagação vegetativa;
- redução do período juvenil. As plantas que crescem de semente, em particular lenhosas e herbáceas perenes, apresentam normalmente um período longo de juvenilidade, no qual não ocorre floração, ao contrário do que acontece com a propagação vegetativa que diminui significativamente esta fase juvenil e como tal, o tempo de entrada em produção;
- económicas. Apesar da propagação vegetativa em larga escala não ser mais económica quando comparada com a propagação por semente, a sua utilização é justificada pela superior qualidade do material vegetal obtido.

No caso do castanheiro, a manutenção das características genotípicas, a redução do período de juvenilidade, o controlo no crescimento da planta, e os aspectos económicos referidos, são factores determinantes para que a propagação desta espécie para a produção de fruto e até para o aproveitamento do lenho, seja por via vegetativa.

Sendo a multiplicação de castanheiros seleccionados feita assexuadamente, e sendo o enraizamento por estacas o método mais produtivo sob o ponto de vista de propagação vegetativa, tudo indicaria ser esta a metodologia a adoptar. No entanto, o castanheiro é considerada uma espécie de difícil enraizamento, pelo que a multiplicação por estaca tem deparado com grandes dificuldades. Areses & Vieitez (1970), verificaram que as estacas de castanheiro adulto contêm inibidores de crescimento, detectados pelo teste do coleóptilo de 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 (Vieitez & Vieitez, 1981).

Algumas metodologias para enraizamento de estacas foram utilizadas com algum sucesso, mas apesar de se obterem taxas de enraizamento com relativo interesse, a capacidade de sobrevivência ao primeiro Inverno foi muito baixa (Jaynes, 1976).

Em relação às técnicas convencionais de enxertia, nas suas diferentes variantes, também têm sido utilizadas com relativo êxito (Shafer, 1966), mas a incompatibilidade entre cavalo e garfo continua a ser uma das principais causas de preocupação em tais metodologias. Apesar disto, a enxertia é praticada sobre porta-enxertos seminais, rebentos de talhadia ou sobre árvores já produtoras quando se pretende reconversão do souto. As técnicas de enxertia utilizadas variam de acordo com a época do ano em que se pretende executar tal operação, mas as mais utilizadas em viveiro e sobre plantas seminais de um ano são: a fenda simples e a inglesa e a enxertia de borbulha, com e sem tecido associado. Enxertias sobre indivíduos adultos, já em pomar, são geralmente em fenda ou em coroa, mas também de borbulha.

O método que mais se tem utilizado para a propagação vegetativa de genótipos seleccionados de castanheiro, tem sido a amontôa. Esta técnica permite obter plantas enraizadas, com manutenção genotípica da planta mãe.

No sentido de tentar ultrapassar as dificuldades das metodologias clássicas, surgem modernas técnicas de cultura de tecidos e órgãos, como um dos métodos de maior valor potencial para a propagação vegetativa de espécies de difícil enraizamento, tal como acontece com o castanheiro. Os resultados já obtidos (Vieitez & Vieitez, 1986; Vieitez *et al.*, 1989; Miranda e Fernandez, 1992; Gonçalves *et al.*, 1993; Gonçalves *et al.*, 1994; Sanchez *et al.*, 1997; Gonçalves *et al.*, 1998d) ; permitem encarar com um certo optimismo a aplicação destas metodologias na multiplicação clonal do castanheiro e na sua aplicação sob o ponto de vista comercial.

1.3.2. Sistemas *in vitro* – micropropagação

1.3.2.1. Aspectos gerais

Os princípios fundamentais que suportam a possibilidade de cultivar tecidos vegetais em condições artificiais estão contidos na teoria celular proposta por Schleiden

e Schwan. Esta teoria postula que a célula vegetal tem capacidade de autonomia e mesmo de totipotência e, como tal, capacidade de regenerar até se obter uma nova planta completa.

A primeira tentativa de cultivar células e/ou tecidos vegetais surgiu com Haberlandt, em 1902. Embora não tenha sido bem sucedido, este investigador é hoje considerado como o fundador da cultura de tecidos vegetais em meios de cultura artificiais.

Em 1927, Went descobre a primeira substância de natureza auxínica, o ácido 3-indol acético, mas só em 1955, Miller, Skoog e colaboradores conseguem identificar uma substância responsável pelo estímulo da divisão celular, a cinetina. Após estas descobertas, numerosos ensaios de associação de auxinas com citocininas foram efectuados. Foram também propostas entre outros, por Heller (1953), Murashige e Skoog (1962), White (1963), Gamborg *et al.* (1968), Schenk e Hildebrandt (1972) e Greshoff e Doy (1972), novas formulações nutritivas, cada vez mais adaptadas às necessidades fisiológicas das células vegetais. Assim sendo, estes estudos permitiram a possibilidade de estabelecer *in vitro*, uma cada vez maior diversidade de células, tecidos e órgãos pertencentes a diferentes espécies. No entanto, só em 1968 se conseguiram obter 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 explantes, 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). Este facto não significa que todas as espécies vegetais sejam susceptíveis de serem regeneradas *in vitro*, pois muitas delas continuam a comportar-se como recalcitrantes (Greenwood, 1986). É conhecida também a maior dificuldade no estabelecimento de sistemas de propagação *in vitro* de espécies lenhosas em relação às espécies herbáceas. No entanto, em muitas espécies lenhosas já foi possível obter regeneração completa *in vitro*, mas o desenvolvimento de técnicas por forma a permitir a sua aplicação em termos comerciais, apenas tem sido possível para um número muito limitado dessas espécies (Ahuja, 1993).

Os factores que condicionam fortemente estes processos de regeneração *in vitro*, são:

4 genótipo

4 estado fisiológico e idade do explante

4 condições do ambiente *in vitro*, em especial regimes de luz e temperatura

4 formulação dos meios de cultura, em especial concentrações hormonais

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 resposta regenerativas muito superiores aos explantes obtidos a partir de plantas adultas. De facto, a dificuldade de estabelecimento de material vegetal de características adultas em que a maturidade é atingida muito tardiamente é, sem dúvida, um problema que tem surgido aos investigadores, em particular em géneros como *Quercus*, *Castanea* e *Juglans*, entre outros. Já que a clonagem deste material é desenvolvida a partir de indivíduos cujas características fenotípicas se manifestam na fase adulta, torna-se necessário utilizar ou desenvolver metodologias que permitam obtenção de material com características juvenis. Com este fim, utiliza-se material com certas características de juvenilidade como por exemplo: material proveniente de ramos inferiores, em especial próximos do tronco, ou rebentos ortotrópicos que se originam na base do tronco.

A aplicação de técnicas de rejuvenescimento podem actuar quer ao nível da planta mãe, antes de retirar o explante, quer após o estabelecimento *in vitro*. As metodologias mais utilizadas têm sido a aplicação de citocininas ao nível da planta ou durante o estabelecimento em cultura, enxertias em série, utilização de rebentos de touça e podas severas. Nestes dois últimos, não se tem perfeito conhecimento se o aspecto juvenil dos rebentos é resultado de um processo de rejuvenescimento ou apenas de uma actividade meristemática de tecidos juvenis que permanecem na planta (Greenwood, 1986). Nas Angiospérmicas, várias são as espécies em que se utiliza este tipo de material (rebentos de touça e da base do tronco) para iniciar o sistema de propagação *in vitro*, como por exemplo castanheiro (Vieitez *et al.*, 1983, 1986), carvalho (Vieitez *et al.*, 1983, 1985) e sobreiro (Manzanera e Pardos, 1990).

O rejuvenescimento *in vitro* de tecidos adultos, recorrendo à aplicação de uma citocinina, geralmente a benzilaminopurina, é feito com base na capacidade deste

regulador de crescimento promover o crescimento de gomos axilares ou o rebentamento adventício.

Para além da dificuldade de espécies lenhosas e material adulto se estabelecerem em cultura, há ainda outros factores como a contaminação das culturas por agentes patogénicos e a inibição do crescimento por fenóis e polifenóis libertados pelos explantes, que muito contribuem para o insucesso da fase de estabelecimento.

A contaminação bacteriana das culturas *in vitro*, logo na fase de estabelecimento ou posteriormente durante a fase de proliferação é um grave problema e que pode ser consequência dos processos de desinfeção deficientes. No entanto, muitas vezes, é resultado da actividade bacteriana endógena, dos próprios tecidos e, como tal, não é possível de eliminar pelos processos de desinfeção normais. Quando tal acontece, há que ter em conta aspectos de sanidade da planta mãe que fornece os explantes, ou utilizar sistemas de estabelecimento que diminuam esse risco, como por exemplo utilizar como explantes, meristemas ou ápices meristemáticos, sistemas de proliferação que favoreçam o rápido alongamento caulinar, com baixas concentrações de citocininas, ausência de luz entre outros, e se necessário, utilização mista destas metodologias associadas ao emprego de antibióticos no meio de cultura. Durante esta fase, é sempre aconselhável proceder a indexagens regulares.

No caso da libertação de fenóis para o meio de cultura pelos explantes, é possível minimizar os seus efeitos. Vários sistemas podem ser definidos na tentativa de inactivar a acção dos compostos fenólicos no meio de cultura à medida que vão sendo libertados, como por exemplo, através da alteração do potencial redox ou ainda por diminuição da actividade das fenolases. Na prática, alguns destes sistemas têm sido conseguidos através da inclusão no meio de cultura de anti-oxidantes, como é o caso do ácido ascórbico ou o ácido cítrico, ou de substâncias com capacidade de absorção de substâncias fenólicas como o carvão activo ou a polivinilpirrolidina; outra solução consiste na passagem sucessiva do explante por meios líquidos com anti-oxidantes antes de serem colocados no meio de cultura, ou ainda por transferências sucessivas do explante para novo meio de cultura.

Em relação aos meios de cultura utilizados há que ter em conta que as concentrações de nutrientes individuais deverão situar-se entre os valores de deficiência e de toxicidade para a espécie a propagar. Estes níveis podem variar bastante em

resposta a outras alterações do meio, como resultado da variação química e efeitos metabólicos interactivos (Teasdale, 1987); no entanto, esta selecção é feita com base nas necessidades de nutrientes para cada espécie (Pierik, 1987).

Um dos meios mais conhecido é o de Murashige e Skoog (1962) (MS), pela reacção favorável da generalidade das plantas. No entanto, tratando-se de um meio com alta concentração em sais, algumas espécies lenhosas mostram-se sensíveis a tal concentração que se pode tornar inibidora do seu crescimento.

Quanto aos reguladores de crescimento, pode-se afirmar que na sua ausência, a cultura de tecidos é por vezes impossível (Pierik, 1987). Os principais grupos de reguladores de crescimento utilizados são as auxinas e as citocininas.

Dado que os tecidos verdes não são suficientemente autotróficos e que a concentração de CO₂ nos tubos de ensaio pode ser inibidora da fotossíntese ou até tóxica para as plantas, a sacarose, glicose ou frutose tornam-se elementos indispensáveis no meio.

Também se verifica a necessidade de adicionar vitaminas ao meio, entre elas: tiamina (vit. B₁) e mio-inositol; a riboflavina (vit. B₂), ácido nicotínico (vit. PP), piridoxina (vit. B₆) e o ácido ascórbico (vit. C) são geralmente facultativas. Esta última, poderá ser adicionada em grandes concentrações, não por grandes necessidades por parte da planta mas porque é usada como anti-oxidante, a fim de diminuir a exsudação para o meio de substâncias de natureza fenólica e tanínica, que são inibidoras do crescimento.

O agar, polissacárido com alta massa molecular, tem a capacidade de solidificar o meio, após ebulição. É necessário que a sua concentração não seja elevada pois a planta terá dificuldade em estabelecer contacto com o meio, o que limita a absorção de compostos. Se a concentração do agar é muito baixa, poderá verificar-se vitrificação e o explante terá aparência translúcida, hiperhidratada, aspecto vítreo, o que é especialmente comum se a planta tiver muita água disponível.

O pH deverá situar-se na ordem dos 5,5 - 5,8; se o pH sobe a mais de 6, geralmente o crescimento pára, mas quando este é demasiado baixo o agar pode tornar-se aquoso, os sais de fosfato de ferro podem precipitar, a vitamina B₁ é menos estável e a absorção de iões amónio é retardada (Pierik, 1987).

É possível deste modo compreender que a obtenção das condições óptimas de propagação de cada espécie é bastante difícil, uma vez que a maioria das condições

estabelecidas são só “não inibidoras” do desenvolvimento da planta, não implicando de forma alguma a sua optimização (Minocha, 1987).

No que respeita à regeneração de plantas, esta pode ser efectuada a partir de *calli* (isolando um tecido diferenciado, permitindo a desdiferenciação *in vitro* e posterior produção de um tecido de crescimento desorganizado, designado por *callus*), órgãos (desenvolvimento de estruturas definidas a partir de órgãos isolados *in vitro*), células (cultura obtida de células individuais, que tenham sido obtidas de um tecido, ou de uma cultura em suspensão, mecanicamente ou com a ajuda de enzimas) e protoplastos (cultura obtida de células, pela digestão enzimática da parede celular) (Fig. 1.2).



Figura 1.2. Diagrama dos factores envolvidos num sistema de micropropagação (Fonte: Gonçalves, 1998).

Também a cultura de anteras e/ou grãos de pólen (cultura de células haplóides, obtidas pela repetida divisão de esporos haplóides) tem tido larga aplicação. Os cromossomas destas células haplóides podem ser duplicados para produzir homozigóticos diplóides férteis. Esta produção de linhas homozigóticas por duplos haplóides e a obtenção de plantas haplóides por androgénese tem larga aplicação em programas de melhoramento, em especial para selecção de características desejáveis.

Contudo, até à data, tem sido a utilização de órgãos (embriões, cotilédones ou gomos), o tipo de explante 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).

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, enquanto que a organogénese obriga a uma formação de novo dessa estrutura caulinar a partir de tecidos que não estavam previamente determinados para tal, isto é, formação de rebentos caulinares adventícios (George & Sherrington, 1984). Até à data, o sistema mais utilizado para a propagação clonal das mais variadas espécies lenhosas é o alongamento axilar, independentemente das maiores ou menores taxas de multiplicação que se conseguem obter. A principal motivação é a grande estabilidade genética que este tipo de material apresenta nas sucessivas fases de multiplicação, já que não há passagem por qualquer fase de desdiferenciação histológica.

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.

A micropropagação via embriogénese somática envolve a formação de embriões *in vitro* a partir de células somáticas com competência embriogénica. Esta via permite a obtenção de plântulas com um único passo, que envolve o desenvolvimento em simultâneo de um pólo apical e um pólo radicular, como acontece nos embriões de origem zigótica. De igual modo, há necessidade de utilizar diferentes formulações nutritivas no decorrer das diferentes fases de maturação do embrião somático. A utilização deste sistema está ainda limitada pelas dificuldades na iniciação do embrião somático a partir de muitos génotipos, no seu processo de maturação e conversão, bem como no posterior desenvolvimento da plântula.

Num futuro próximo, após a resolução dos problemas deste último sistema, deverá ser este o meio mais rentável para a produção em massa de plantas clonadas (Cervelli & Senaratna, 1995), já que o sistema pode ser desenvolvido com a utilização de meios líquidos e, como tal, é possível a utilização de bioreactores para a produção em larga escala (Leathers *et al.*, 1995). Para além deste aspecto, há ainda a considerar o facto dos embriões somáticos poderem ser encapsulados tornando-se assim em sementes sintéticas, as quais poderão ser conservadas e plantadas tal como acontece nas sementes zigóticas (Sakamoto *et al.*, 1995).

Os trabalhos de Murashige (1974), posteriormente adaptados e modificados por Debergh & Maene (1981), estabeleceram os princípios gerais de um sistema de micropropagação, tendo sido definidas cinco fases: (Fig. 1.3)

Fase 0. Selecção da planta mãe e preparação do explante.

Envolve toda a fase de manipulação do material vegetal, desde a recolha até ao estabelecimento *in vitro*. Nesta fase incluem-se os pré-tratamentos do material vegetal e desinfecção, tornando-se fundamental o controlo dos 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 adequado à espécie em questão. Nesta fase é determinante a escolha do explante e o método de desinfecção utilizado.

Fase 2. Multiplicação.

Tem como principal objectivo conseguir propagar sem perda de estabilidade genética. Nesta fase é importante a escolha da formulação do meio de cultura bem como as condições físicas do ambiente de crescimento.

Fase 3. Preparação para o crescimento em ambiente natural.

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 dois.

Fase 4. Aclimatização das plantas.

Necessidade das plantas desenvolvidas em heterotrofia se adaptarem e sobreviverem em condições autotróficas. Nesta fase, são determinantes todo um conjunto de factores físicos, tais como luz, humidade e temperatura, que devem ser gradualmente alterados a fim de permitir à planta a sua adaptação às condições ambientais naturais, garantindo-lhe autosuficiência fotossintética.

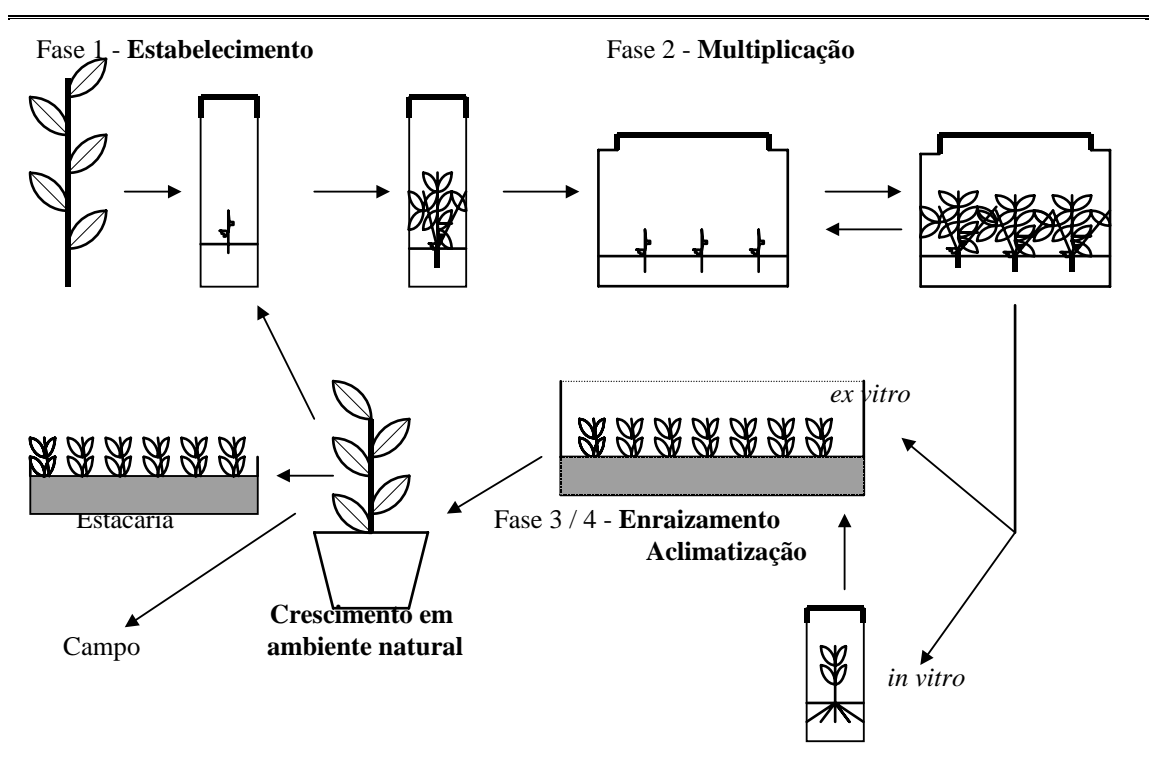


Figura 1.3. Representação de um sistema de micropropagação por rebentamento axilar, referindo os dois sistemas alternativos de enraizamento, *in vitro* e *ex vitro*. No segundo caso, a expressão e desenvolvimento radicular ocorre em condições autotróficas, podendo considerar-se as plantas em pré-aclimatização. 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 (Fonte: Gonçalves, 1998).

Muitas são as vantagens que a micropropagação oferece, comparativamente aos processos de multiplicação vegetativa tradicionais, podendo destacar-se:

- maior rapidez do processo;
- possibilidade de multiplicação de espécies difíceis ou mesmo impossíveis de propagar *in vivo*;
- necessidade de áreas reduzidas para a cultura e armazenamento, conseguindo-se obter um número elevado de plantas em áreas reduzidas, comparativamente ao espaço necessário para a formação de clones *in vivo*;
- a propagação é executada em condições assépticas, o que juntamente com a utilização de material vegetal desinfectado, possibilita, em princípio, a obtenção de plantas sem doenças. Utilizando metodologias apropriadas, nomeadamente a cultura de meristemas, é possível a obtenção de plantas isentas de vírus;
- eliminação do efeito de sazonalidade, já que independentemente das estações do ano e, controlando vários factores nutritivos, hormonais e físicos, há possibilidade de produzir novos explantes ou plantas inteiras de forma contínua ao longo do ano;
- possibilidade de obtenção de plantas com o seu próprio sistema radicular, tornando desnecessário o recurso à enxertia, se for caso disso (George & Sherrington, 1984; Pierik, 1987);
- não há necessidade de cuidados entre os subcultivos;
- para o melhorador é todo um campo de potenciais aplicações, permitindo a obtenção de resultados que, pelos métodos clássicos, eram impossíveis ou de obtenção lenta e difícil. Permite ainda o estabelecimento de bancos de genes que rompem com as limitações dos tradicionais bancos de germoplasma.

Mais recentemente a utilização destes sistemas tem vindo a permitir significativos avanços nas áreas da manipulação genética e obtenção de plantas transgénicas (Lindsey e Jones, 1989).

Apesar de todas estas vantagens, as dificuldades também são uma constante na aplicação destes sistemas:

- muitas espécies têm fraca capacidade de regeneração, em especial quando o estabelecimento é feito a partir de explantes de material vegetal adulto, como já foi referido anteriormente;
- as taxas de multiplicação nem sempre são as desejáveis por forma a tornarem o processo mais rentável;
- nem sempre é possível induzir um sistema radicular adventício funcional;
- elevadas taxas de mortalidade ocorrem durante o processo de adaptação das plantas obtidas *in vitro* às condições ambientais naturais;
- em consequência do elevado número de subculturas, é possível a ocorrência de alterações genéticas (variação somaclonal);
- o processo em si pode ser oneroso.

Apesar das dificuldades e limitações tem sido possível desenvolver protocolos que permitem, para muitas espécies investigadas, utilizar estas metodologias com rendimentos que tornam o processo economicamente viável. No entanto, as fases de enraizamento e em especial a aclimatização, continuam ainda a ser, para a grande maioria das espécies, as fases mais determinantes no êxito de um sistema de multiplicação vegetativo de plantas utilizando os sistemas *in vitro* (Debergh & Read, 1991; Preece & Sutter, 1991).

1.3.2.2. A micropropagação no castanheiro

Os primeiros ensaios com este género foram desenvolvidos por Jacquiot (1950, 1970), a partir do estabelecimento *in vitro* de tecidos cambiais. Com o estabelecimento de fragmentos de caules de plantas com menos de um ano (Borrod, 1971) e de tecidos cotiledonares (Vieitez *et al.*, 1978 a; Keys e Cech, 1981), foi possível obter a formação de *calli* como primeira resposta fisiológica. 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. A partir do desenvolvimento do embrião seminal foram obtidas as primeiras plantas completas (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 (Rodriguez, 1982).

A utilização de explantes com origem em material de características adultas tem deparado com algumas dificuldades quer na fase de 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 amontôa.

Os processos de desinfecção do material vegetal estão logicamente relacionados com o tipo de explante utilizado e também com o local de crescimento da planta mãe. Os tratamentos mais severos aplicar-se-ão a material vegetal proveniente de plantas com crescimento no campo.

Os meios de cultura utilizados no estabelecimento e multiplicação deste género, apresentam como característica comum uma baixa concentração iónica. Algumas condições gerais quanto à formulação dos meios de cultura têm vindo a ser obtidas, no sentido de tornar a fase de multiplicação viável (Vieitez *et al.*, 1986; Gonçalves, 1991; Gonçalves *et al.*, 1993).

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

No que respeita ao processo de rizogénese dos rebentos obtidos *in vitro*, para qualquer dos métodos possíveis de utilizar, regulador de crescimento no meio ou por imersão basal, parece ainda ser fundamental encontrar um equilíbrio entre a dose de auxina e o tempo de aplicação. Há também ainda que conjugar estes procedimentos com outros que permitam solucionar o problema da necrose apical que é visível durante esta fase, e que é determinante para a manutenção do bom estado fisiológico da planta.

Com a utilização de sistemas de enraizamento *ex vitro*, Miranda e 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. Também Gonçalves *et al.* (1998a) com indução radicular em 3 mg l⁻¹ AIB durante 5 dias ou em 1 g l⁻¹ AIB durante 1 minuto e expressão *ex vitro*, em substrato natural refere percentagens de enraizamento entre 77 e 87 %, sendo de 100 % a sobrevivência destas plantas na aclimatização.

Quanto à fase de transplante e aclimatização, continua a ser uma fase determinante no sucesso (Gonçalves *et al.*, 1998b). 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. Gonçalves *et al.*, (1994), referem taxas de sobrevivência na ordem dos 50% em rebentos com enraizamento *in vitro* e de 100 % com rebentos enraizados *ex vitro* (Gonçalves *et al.*, 1998a).

2. CARACTERIZAÇÃO DA FASE DE ACLIMATIZAÇÃO

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

É de todo o interesse que ocorra um período de transição, essencialmente por redução gradual da humidade relativa e acréscimo na intensidade luminosa, conhecido por aclimatização, durante o qual as plantas regeneradas *in vitro* se adaptam às condições naturais (com elevadas taxas de sobrevivência) e, desenvolvam adaptações anatómicas e fisiológicas às condições de cultura em autotrofia, sendo este processo dependente das espécies (Grout, 1988).

Torna-se necessário conhecer as mudanças estruturais que ocorrem durante a aclimatização para não só compreender todo o processo, mas também para o desenvolvimento de novos métodos.

2.1. Características morfo-fisiológicas das microplantas

Durante todo o processo *in vitro*, as microplantas desenvolvem-se em contentores de pequenas dimensões, mais ou menos estanques, onde a atmosfera é caracterizada por elevada humidade relativa, concentração de CO₂ variável e concentrações de etileno muito fora das concentrações normais (De Proft *et al.*, 1985; Kozai, 1991a). A densidade fotossintética do fluxo fotónico (PPFD) a que estão sujeitas as microplantas 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 da noite.

Por outro lado, as plantas têm também ao seu dispôr reguladores de crescimento, condições assépticas e uma fonte de carbono, geralmente sacarose. Estas condições aliadas à disponibilidade de nutrientes no meio de cultura, permitem-lhes um crescimento heterotrófico. A interação destes factores poderá eventualmente contribuir para que o material vegetal apresente deficiências mais ou menos graves, quer ao nível morfológico, quer anatómico e fisiológico (Grout & Aston, 1978; Donnelly *et al.*, 1985; Gonçalves *et al.*, 1998b), que condicionam fortemente a sua capacidade de se adaptarem a futuras condições naturais de crescimento, quer em estufas quer em pleno campo (Tab. 1.4).

As folhas são os órgãos mais afectados, o que facilmente se observa pela redução da área foliar (Donnelly *et al.*, 1985; Donnelly, 1986). Ao nível anatómico observa-se frequentemente um decréscimo na dimensão e número de células do mesófilo, com uma só camada de células de parênquima em paliçada que se apresentam alteradas quer no tamanho quer na forma, bem como o aumento do número de espaços intercelulares no mesófilo (Brainerd *et al.*, 1981; Wetzstein & Sommer, 1982; Marín *et al.*, 1988; Gonçalves *et al.*, 1998c), do que resulta uma menor espessura de folha. Os tecidos vasculares são também pouco diferenciados. A área da secção das nervuras (Gonçalves *et al.*, 1998) assim como a área vascular dos pecíolos apresenta-se reduzida e observam-se deficientes conexões vasculares (Smith *et al.*, 1986). Ao nível ultraestrutural, as células apresentam vacúolos muito desenvolvidos e cloroplastos com os sistemas membranares desorganizados (Wetzstein & Sommer, 1982).

Tabela 1.4. Características do ambiente de propagação *in vitro* nas fases de multiplicação e enraizamento, e os seus efeitos no crescimento dos explantes e/ou plantas nas fases de multiplicação, enraizamento e aclimatização.

Características do ambiente	Efeitos <i>in vitro</i>	Efeitos <i>ex vitro</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Humidade elevada 	<ul style="list-style-type: none"> • Ceras epicuticulares não organizadas • Mau funcionamento dos estomas • Enraizamento deficiente 	<ul style="list-style-type: none"> • Excessiva transpiração • Dificuldades na absorção de nutrientes
<ul style="list-style-type: none"> • Concentração elevada de etileno • Elevada [CO₂] durante o período de noite • Baixa [CO₂] durante o período de luz 	<ul style="list-style-type: none"> • Promove/inibe diferenciação • Baixa taxa de fotossíntese líquida • Sem formação de novas folhas 	<ul style="list-style-type: none"> • Suprime fotossíntese
<ul style="list-style-type: none"> • Baixa irradiância 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificuldade em desenvolver autotrofia 	<ul style="list-style-type: none"> • Suprime fotossíntese
<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura constante 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada respiração nocturna 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidade ao stress ambiental
<ul style="list-style-type: none"> • Baixa [O₂] dissolvido no meio • Elevada concentração de iões inorgânicos 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificuldade no enraizamento • Elevada pressão osmótica no meio, elevada produção de etileno 	<ul style="list-style-type: none"> • Morte das plantas • Atraso no crescimento devido às baixas taxas de fotossíntese
<ul style="list-style-type: none"> • Meio com açúcar 	<ul style="list-style-type: none"> • Vitrificação e outras desordens fisiológicas • Contaminação por bactérias e fungos 	
<ul style="list-style-type: none"> • Deficiências de circulação de ar 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixas trocas de gases, iões e outros 	

(Adaptada de: Kozai, 1992)

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 (Brainerd & Fuchigami, 1981; Wetzstein & Sommer, 1982; Donnelly *et al.*, 1985).

Os estomas sofrem alterações na morfologia, distribuição, frequência e funcionalidade dos movimentos de abertura e fecho (Marín *et al.*, 1988; Sutter, 1988; Shackel *et al.*, 1990; Gonçalves *et al.*, 1998b) tornando-se um dos principais responsáveis pelo deficiente controlo da transpiração e, como tal, na desidratação das microplantas. As células-guarda são em geral, mais arredondadas, com maior desenvolvimento e numa posição sobrelevada, o que confere ao estoma uma maior

abertura do ostíolo (Wetzstein & Sommer, 1983; Conner & Conner, 1984; Capellades *et al.*, 1990). As condições *in vitro* contribuem para esta deficiência, 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; Gonçalves *et al.*, 1998b).

A frequência estomática, 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. O mesmo já não acontece quando se quantifica a frequência estomática através do índice estomático 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 & Bhajwani, 1987; Capellades *et al.*, 1990).

O revestimento epidérmico é geralmente deficiente, apresentando as folhas cutículas pouco espessas e com menor conteúdo em ceras (Sutter *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1990) e de estrutura alterada (Grout & Aston, 1977; Sutter & Langhans, 1979; Conner & Conner, 1984; Marín *et al.*, 1988). Ao nível da sua composição química tem sido referida uma menor proporção de componentes hidrofóbicos (hidrocarbonetos de cadeia longa) comparativamente aos componentes pouco hidrofóbicos (ésteres e componentes polares) (Sutter, 1984; Capellades, 1989), do que resulta um aumento das taxas transpiratórias através da cutícula. No entanto, alguns autores referem que a dificuldade de controlo na perda de água nas plantas micropropagadas não será tanto uma consequência do fraco desenvolvimento cuticular, mas sim do funcionamento estomático (Fuchigami *et al.*, 1981; Conner & Conner, 1984; Shackel *et al.*, 1990; Santamaria *et al.*, 1993; Santamaria & Kerstiens, 1994).

No que respeita ao caule, e apesar dos poucos estudos a nível deste órgão, Donnelly *et al.* (1985), referem-se a algumas alterações, como é o caso da redução ao nível do diâmetro, redução da quantidade de tecidos de suporte (esclerênquima e colênquima) e a redução no desenvolvimento da parede celular.

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; Gonçalves *et al.*, 1998a), 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, 1977).

2.2. Factores que condicionam a fase de aclimatização

2.2.1. Factores biológicos

As deficiências anatómicas das microplantas descritas no ponto 2.1., implicam, como consequência, um comportamento fisiológico anormal e que se traduz numa deficiente capacidade de regulação hídrica e baixas taxas de fotossíntese aparente (Gonçalves *et al.*, 1998c). No entanto, em algumas espécies, tem sido possível registar valores na capacidade fotossintética suficientemente elevados por forma a assegurarem o início do crescimento autotrófico (Lee *et al.*, 1985; Yue *et al.*, 1992; Gonçalves *et al.*, 1998c).

O 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 da autotrofia.

A funcionalidade do sistema radicular adventício é 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; Gonçalves *et al.*, 1998a). Se o balanço hídrico da planta depende da funcionalidade estomática, também 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 no solo, bem como por outros factores, tais como, salinidade, baixas temperaturas e fraco arejamento do substrato (Kramer, 1983).

Uma das desvantagens deste sistema radicular é a elevada mortalidade destas raízes durante as primeiras horas ou dias de aclimatização (Debergh & Read, 1991), a

juntar à sua hipertrofia, ausência de pêlos radiculares e deficientes conexões vasculares com o caule, como já foi referido anteriormente. Além de tudo isto, está o facto de a formação das 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 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 factor deverá trazer à planta quando for colocada em condições de aclimatização (Miranda & Fernandez, 1992; Sanchez *et al.*, 1997; Gonçalves *et al.*, 1998c)

As baixas taxas de fotossíntese das plantas *in vitro*, têm sido atribuídas à baixa actividade da enzima ribulose-1,5-bi-fosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) (Grout & Price, 1987; Grout, 1988), às baixas intensidades luminosas, ao desajustamento de trocas gasosas no interior dos contentores de multiplicação, que podem provocar variações significativas na concentração de CO₂ (Desjardins *et al.*, 1987; Fujiwara *et al.*, 1987; Fujiwara & Kozai, 1995; Yue *et al.*, 1993 b) e alto teor de açúcar (Capellades *et al.*, 1991).

A baixa actividade da Rubisco, que pode limitar a fotossíntese da folha (Desjardins *et al.*, 1995), parece estar relacionada com a presença de sacarose durante a fase de desenvolvimento foliar, (Kozai & Iwanami, 1988; Kozai *et al.*, 1988; Capellades *et al.*, 1991; Kozai, 1991b; Pospisilova *et al.*, 1992), 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). Para além do decréscimo na eficiência de carboxilação, no conteúdo da Rubisco, também se verifica uma alteração na concentração de proteínas solúveis (Stitt, 1991; Long & Drake, 1992; Bowes, 1993; Sage, 1994; Nie *et al.*, 1995 a, b).

Aumentar a capacidade fotossintética *in vitro*, por abaixamento da sacarose no meio e aumentar a intensidade da luz e a concentração de CO₂ pode ajudar a uma melhoria na aclimatização (Desjardins *et al.*, 1987; Kozai, 1991b). Por outro lado, Capellades *et al.* (1991), demonstraram que altos níveis de sacarose durante a cultura

in vitro facilita a aclimatização de plântulas de roseira, comparando com condições de desenvolvimento autotróficas. Contudo, este suplemento de açúcar tende a reduzir a taxa fotossintética e leva a uma inibição da Rubisco (Langford & Wainwright, 1987; Desjardins *et al.*, 1995). A acumulação de amido como nutriente de reserva, para lá do período de stress, durante o enraizamento e crescimento *ex vitro*, foi suposto ser a base de um melhor desenvolvimento quando era usada uma maior concentração de açúcar *in vitro* (Capellades *et al.*, 1991). Van Huylenbroeck & Debergh (1996), também concluíram que o principal requisito para ultrapassar o stress do transplante durante a primeira semana, é a presença de reservas de carboidratos em quantidades suficientes.

Para muitas espécies, o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura favorece a aclimatização, já que a alta produção de biomassa durante o desenvolvimento *in vitro* persiste após transplante.

Van Huylenbroeck & Debergh (1996), demonstraram o aumento da capacidade fotossintética com o aumento da concentração de sacarose, em *Spathiphyllum* cv. Petite. Relação similar também foi encontrada em outras espécies como por exemplo: roseira (Langford & Wainwright, 1987; Capellades *et al.*, 1991), batateira (Kozai *et al.*, 1988) e morangueiro (Hdider & Desjardins, 1995).

Até à data, há evidências que indicam que a acumulação de açúcares solúveis na folha pode desencadear a repressão da transcrição do gene fotossintético, o que é uma hipótese interessante para explicar a resposta fotossintética a elevado CO₂ (Cheng *et al.*, 1998). No entanto, pouca pesquisa tem sido dirigida no sentido de compreender os efeitos do CO₂ elevado na expressão do gene fotossintético (Van Oosten *et al.*, 1994; Van Oosten & Besford, 1995; Majeau & Coleman, 1996). Estes estudos indicaram que as plantas “modulam” os níveis de mRNAs fotossintéticos em paralelo com os níveis de hidratos de carbono da folha após exposição a CO₂ elevado.

A taxa transpiratória das microplantas é baixa, independentemente da abertura dos estomas (Shackel *et al.*, 1990), já que o material vegetal *in vitro*, se desenvolve em condições de reduzida pressão evaporativa, uma vez que a humidade relativa ambiente é elevada e a intensidade de luz é baixa. (Shackel *et al.*, 1990). Quando as microplantas são expostas a humidade relativa baixa, tal como ocorre durante o transplante, elas podem evidenciar taxas de transpiração elevadas em consequência do deficiente funcionamento 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 anômala da cutícula (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 *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 *et al.*, 1984; 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).

A situação a que as microplantas ficam sujeitas 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).

O ácido abscísico (ABA) é suposto ter um papel importante na resposta a défices hídricos. O fecho dos estomas por aumento das concentrações de ABA apoplástico é bem documentado. Juntamente, o ABA é conhecido pela influência na expressão do gene (Skriver & Mundy, 1990; Chandler & Robertson, 1994). Bartholomew *et al.* (1991), referem uma redução da transcrição dos genes fotossintéticos “rbcS” e “cab”, após aplicação externa de ABA. Slovik e Hartung (1992), sugerem que sob stress hídrico, o ABA é redistribuído do simplasto para o apoplasto, levando ao fecho dos estomas e subsequentemente à limitação estomática da fotossíntese.

2.2.2. Factores físicos

O défice hídrico a que as plantas ficam sujeitas logo após a sua remoção das condições *in vitro*, é um dos factores que mais condiciona a sua sobrevivência, 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, passarem a apresentar estruturas anatómicas e mecanismos fisiológicos mais próximos dos normais, em

simultâneo com o acréscimo de áreas e funcionalidade do sistema radicular (Gonçalves, 1998).

As plantas sujeitas ao stress hídrico rapidamente fecham os seus estomas, possivelmente mediado por um aumento do teor de ABA apoplástico (Davies & Zhang, 1991). Foi descrito que há inibição da assimilação de CO₂ em condições de stress hídrico, mas tal facto pode não ser apenas explicado pelo fecho dos estomas (Lauer & Boyer, 1992). A longo prazo a adaptação do metabolismo da folha a reduzida humidade é diferente da resposta ao stress a curto prazo e envolve alterações no metabolismo dos cloroplastos (Büßis *et al.*, 1998).

A intensidade da luz durante o processo de 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 (Lichtenthaller, 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).

A exposição das folhas a luz excessiva é uma causa conhecida de fotoinibição (Powles, 1984; Ögren & Evans, 1992). Nas condições naturais de luminosidade, a fotoinibição ocorre quando sujeita a stress, como alta temperatura (Ludlow & Björkman, 1984; Oberhuber & Edwards, 1993) ou baixa temperatura (Öquist & Ögren, 1985; Greer & Hardacre, 1989; Krause, 1994) ocorrem conjuntamente com insuficiente fornecimento de água (Björkman & Powles, 1984) ou azoto (Osmond, 1983).

A aplicação de uma intensidade luminosa mais elevada durante o período de cultura resulta num acréscimo de taxa de fotossíntese líquida, isto se os restantes factores não forem limitantes (Lee *et al.*, 1985; Kozai *et al.*, 1988; Dubé & Vidaver, 1992), e considerando cuidadosamente estes acréscimos na intensidade do fluxo fotossinteticamente activo, no sentido de prevenir fotoinibições (Dubé & Vidaver, 1992; Sorrentino *et al.*, 1997). Contudo, os acréscimos de intensidade luminosa têm sido referenciados como vantajosos para o acelerar do processo da adaptação (Lee *et al.*, 1985; Kozai, 1990; Reuther, 1991; Dubé & Vidaver, 1992).

A fraca intensidade de luz a que o material vegetal está sujeito pode não ser o factor mais limitante (Kozai, 1991b) para algumas espécies que atingem a saturação a intensidades de luz relativamente baixas; por exemplo, 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; no caso de *Liquidambar styraciflua*, atinge a saturação pela luz a $350\text{-}450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante o seu desenvolvimento *in vitro* (Lee *et al.*, 1985).

A baixa temperatura é um factor ambiental importante que limita a distribuição e a sobrevivência das plantas. A exposição a baixa temperatura (não temperatura de congelação), induz alterações genéticas, morfológicas e fisiológicas, por exemplo, o caso do desenvolvimento em roseta é considerado uma consequência morfológica ao desenvolvimento a baixa temperatura (Roberts, 1984).

A baixa temperatura reduz a capacidade dos sistemas fotossintéticos para utilizarem a radiação incidente, levando a um processo de fotoinibição caracterizado por sub-excitação das membranas dos tilacóides e subsequente enfraquecimento da função fotossintética (Öquist & Huner, 1991). A fotoinibição manifesta-se por redução no rendimento do PSII e é visível o decréscimo na fluorescência da Cl_a (Demming & Björkman, 1987). Jung & Steffen (1997), demonstraram no seu estudo que a aclimação a diferentes PPFD, influencia a capacidade de acumulação de xantofila, para resistência à fotoinibição.

Gray *et al.* (1997), demonstraram, pela primeira vez, que o efeito da excitação do PSII influencia a morfologia da planta e a expressão de um gene envolvido na resistência ao frio.

A fotossíntese a baixa temperatura envolve um aumento na capacidade de muitas enzimas do metabolismo primário; isto inclui enzimas de fixação de CO_2 (Badger *et al.*, 1982), particularmente Rubisco (Holaday *et al.*, 1992; Hurry *et al.*, 1995) bem como enzimas de síntese de hidratos de carbono solúveis em folhas (Crespi *et al.*, 1991; Guy *et al.*, 1992; Holaday *et al.*, 1992; Martindale & Leegood, 1997). A exposição a baixa temperatura é muitas vezes acompanhada pela síntese de proteínas associadas ao stress, a fim de facilitar a tolerância. Por exemplo, em trigo, as folhas que se desenvolvem a baixa temperatura contêm mais proteína solúvel (Lawlor *et al.*, 1987). No entanto, o mecanismo pelo qual o sinal à baixa temperatura é perceptível e traduzido

em específicas respostas bioquímicas não é ainda totalmente conhecido (Dhindsa *et al.*, 1993; Bowler & Chua, 1994).

2.2.3. Concentração de dióxido de carbono

Desde o início da revolução industrial que as concentrações de CO₂ na atmosfera aumentam. Esta subida está fortemente correlacionada com o rápido aumento no consumo global de combustíveis e desflorestação. Pensa-se que no ano 2060 a concentração de CO₂ atmosférico terá duplicado (Wolfe, 1995). Este aumento poderá provocar efeitos substanciais nos ecossistemas, afectando directa ou indirectamente o crescimento e desenvolvimento das plantas. Juntamente a esta duplicação na concentração de CO₂, também os modelos climáticos prevêm um acréscimo na temperatura média do planeta, situando-se entre o 1,5 °C e 4,5 °C (Wolfe, 1995).

É necessário compreender como será a resposta fotossintética das plantas, a longo-prazo (semanas, meses), a estes aumentos. Muitos estudos demonstraram que no curto-prazo de exposição ao CO₂ elevado, a taxa fotossintética pode aumentar, mas as plantas expostas ao CO₂ elevado durante largos períodos podem não mostrar estimulação continuamente ou tornarem-se insensíveis (Kramer, 1981; Hogan *et al.*, 1991) ou até possuírem uma mais baixa capacidade fotossintética das que as plantas em crescimento em CO₂ normal (Sage, 1994; Kalina & Ceulemans, 1997).

Alguns estudos demonstraram que a alta taxa de assimilação de CO₂ observada, quando as plantas que se desenvolvem em CO₂ ambiental são expostas a elevado CO₂, pode não ser mantida no longo prazo (Cure, 1985; Arp, 1991b; Stitt, 1991; Bowes, 1993; Gunderson e Wullschleger, 1994; Sage, 1994; Curtis, 1996), e que comparando os valores da fotossíntese medidos a CO₂ normal com os valores a CO₂ elevado, este último estimula a fotossíntese em cerca de 30-50%.

A concentração de CO₂, 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 CO₂ aumenta, atingindo o valor máximo no início do período de luz. A actividade fotossintética residual leva então ao rápido

consumo de CO₂, 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 CO₂ (Desjardins *et al.*, 1988; Infante *et al.*, 1989; Kozai, 1991b; Morini *et al.*, 1993). Parte do efeito benéfico do enriquecimento em CO₂ no crescimento é resultado do aumento do período de tempo durante o qual as microplantas podem assimilar CO₂ atmosférico. Contudo, um efeito complementar traz também vantagens: elevada concentração de CO₂ permite reduzir a actividade oxigenase da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), sendo a libertação de CO₂ devida à fotorrespiração 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 CO₂ e para dispêndio de energia sem benefício aparente de qualquer função.

Aumentar a concentração de CO₂ mostrou aumentar a taxa de sobrevivência e melhora o desenvolvimento das microplantas *in vitro* e *ex vitro* (Lasko *et al.*, 1986; Desjardins *et al.*, 1987). Efeitos positivos do enriquecimento em CO₂ podem resultar numa mais alta fixação de CO₂, aumentar a eficiência quântica e suprimir a fotorrespiração (Matysiak & Nowak, 1994). O aumento do CO₂ também alivia o stress hídrico das microestacas (Yue *et al.*, 1992) e o stress causado por um alto nível nutritivo (Matysiak & Nowak, 1995).

3. OBJECTIVOS DO TRABALHO

A fase de aclimatização é uma fase bastante crítica da micropropagação, mas de extrema importância no processo de adaptação das microplantas às condições naturais. Durante este período de transição, devem desenvolver-se adaptações anatómicas e fisiológicas às condições de cultura em autotrofia, a fim de permitir obter uma elevada taxa de sobrevivência, tendo em vista a utilização desta metodologia na multiplicação clonal da espécie em termos comerciais.

De facto este processo de aclimatização é muito complexo, já que as plantas 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 da autotrofia.

A manipulação de parâmetros ambientais, em especial os níveis de irradiância, a variação de humidade relativa e a concentração de CO₂, podem contribuir para uma mais rápida formação de folhas aclimatizadas, isto é, folhas morfo-fisiológicas em tudo semelhantes às desenvolvidas por plantas em condições ambientais naturais e, como tal, capazes de garantirem um desenvolvimento autotrófico às jovens plantas regeneradas *in vitro*. O enriquecimento da atmosfera em CO₂ tem sido referido como um potenciador do aumento de biomassa e de desenvolvimento radicular em várias espécies, tendo-se verificado um efeito sinérgico entre as concentrações elevadas de CO₂ e um suplemento de irradiância.

Neste contexto, este trabalho pretende avaliar alguns efeitos do aumento da concentração de CO₂ durante a aclimatização, na sobrevivência e desenvolvimento morfo-fisiológico de plantas de castanheiro (*Castanea sativa* x *Castanea crenata*) regeneradas *in vitro*.

Para a sua concretização, foram delineados ensaios que permitiram a avaliação e quantificação de diferentes parâmetros. Para cada tratamento efectuado, 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, foi feita por microscopia óptica. O desempenho fotossintético das folhas formadas foi feito através da quantificação da fixação de CO₂ e da evolução das taxas de libertação de O₂, com determinação dos índices de taxas de fotossíntese aparente, transpiração, condutância estomática, capacidade fotossintética e curvas de resposta a diferentes densidades de fluxo fotónico, rendimento quântico e ponto de compensação para a luz. Também foram avaliados os teores de alguns metabolitos, tais como, clorofilas e proteínas solúveis totais.

1. MATERIAL VEGETAL

Para a realização dos ensaios foi utilizado um clone de castanheiro adulto, híbrido de *Castanea sativa* x *Castanea crenata*, designado por M1, 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, Alcobça, 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, MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO

Para a micropropagação deste clone foi utilizado o esquema proposto por Murashige (1974) e Debergh & Maene (1981), que a seguir se descreve.

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 (Novembro a Janeiro), cortadas com ± 20 cm, desinfectadas durante dois minutos com Benlate 2 gl^{-1} . Posteriormente, foram envolvidas em plástico e colocadas 2 a 3 meses no frio a 4 °C, até à sua utilização. Após este período, as varas foram retiradas do frio e colocadas em estufa, em condições controladas por forma a permitir o abrolhamento dos gomos axilares. As varas foram mantidas durante 4 semanas com a base imersa em água, sob fotoperíodo de 16h luz e 8h noite, a 25 °C durante o dia e 20 °C durante a noite. Semanalmente foram pulverizadas com uma solução de 6-benzilaminopurina (BAP), numa concentração de 100 mg l^{-1} .

Fase 1. Estabelecimento de uma cultura asséptica

Após o abrolhamento, os rebentos com crescimento entre 3 e 5 cm foram isolados das estacas, retiradas as folhas e parafinados na base.

A desinfecção superficial iniciou-se por imersão dos rebentos numa solução de álcool a 70%, durante 30s, seguida de imersão numa 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. De seguida, efectuaram-se três passagens sucessivas em água destilada e esterilizada, a fim de remover o agente desinfectante, permanecendo os rebentos na quarta água.

Foram utilizados como explantes primários os ápices e gomos nodais (5 a 8 mm) dos rebentos que, após seccionamento, foram mantidos durante 15 m numa solução anti-oxidante (100 mg^l⁻¹ de ácido cítrico com 150 mg^l⁻¹ de ácido ascórbico). Para estabelecimento do material *in vitro*, foi colocado um explante por tubo de ensaio, em meio nutritivo, cuja composição é referida na Tabela 2.1.

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

Macronutrientes	Micronutrientes	Fe- EDTA	Vitaminas (mg ^l ⁻¹)	Reguladores de crescimento
½ MS (1962)	MS	MS	Tiamina	1 BAP 0,5 mg ^l ⁻¹
			Piridoxina	1
			Ácido nicotínico	1
			Pantotenato de cálcio	1
			Ácido ascórbico	1
			Inositol	100

Fase 2. Multiplicação

A multiplicação das culturas foi feita por repicagens sucessivas com intervalos de 4 semanas. Os ápices e os segmentos nodais provenientes da proliferação axilar dos rebentos, com 5 a 8 mm de comprimento e um mínimo de 2 gomos axilares, foram utilizados como explantes secundários de multiplicação. A composição do meio de cultura na fase de multiplicação está descrita na Tabela 2.2. Na Tabela 2.3 descreve-se a

composição do meio de cultura para a fase de alongamento. As condições físicas do ensaio são descritas adiante.

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

Macronutrientes	Micronutrientes	Fe- EDTA	Vitaminas (mg ^l ⁻¹)	Reguladores de crescimento
Greshoff e Doy (1972)	MS	MS	Tiamina	1 BAP 0,2mg ^l ⁻¹
			Piridoxina	1
			Ácido nicotínico	1
			Pantotenato de cálcio	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)	Reguladores de crescimento
½ MS (1962)	MS	MS	Tiamina	1 BAP 0,2 mg ^l ⁻¹
			Piridoxina	1
			Ácido nicotínico	1
			Pantotenato de cálcio	1
			Ácido ascórbico	1
			Inositol	100

Fase 3. Enraizamento

Os rebentos utilizados para enraizamento foram provenientes do meio de alongamento já descrito anteriormente. Aos rebentos provenientes desse meio, com comprimento superior a 4 cm, foram retiradas as folhas dos 1,5 cm basais e utilizados nesta fase.

A composição do meio base de cultura da fase de enraizamento está descrito na Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Composição do meio base de cultura na fase de enraizamento.

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

O enraizamento foi programado em duas fases, uma primeira fase de indução (*in vitro*) e, uma fase de expressão e desenvolvimento em substrato natural (*ex vitro*). Os rebentos do dia 0 de indução de rizogénese, provenientes do meio de alongamento, foram decapitados, isto é, foi cortado o ápice. Este procedimento para além de evitar o aparecimento de necrose apical, retira também o efeito de dominância apical facilitando assim, o desenvolvimento do gomo axilar. Nesta fase, os rebentos foram colocados em meio base de enraizamento (Tab. 2.4), com a presença indispensável de ácido 3-indol-butírico (AIB), na concentração de 3 mg l⁻¹, no qual estiveram em contacto durante 5 dias (Gonçalves *et al.*, 1998a).

Para a expressão e desenvolvimento radicular efectuada em condições *ex vitro*, transferiram-se 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 poliestireno expandido (60 x 40 x 20 cm). Estas foram tapadas com uma placa acrílica translúcida, e as plantas foram pulverizadas diariamente com água, e fertilizadas semanalmente com uma solução de macronutrientes e micronutrientes do meio base de enraizamento a pH 5,5. As caixas com os rebentos em fase de expressão e desenvolvimento, foram colocadas na sala de cultura, durante 4 semanas sob as condições standard de luz, fotoperíodo e temperatura, a seguir descritas, onde foram mantidas durante 4 semanas.

Em todos os meios o pH foi ajustado entre 5,5-5,6, 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 todos os meios de cultura. A todos os meios foram adicionados 30 g l⁻¹ de sacarose.

A esterilização dos meios de cultura foi feita por calor húmido em autoclave, durante 20 m a 121°C e 1 atm.

Figura 2.1. Rebentos de castanheiro na fase de indução (A) e expressão (B).

Os recipientes de cultura utilizados em cada fase, bem como as suas dimensões, tipo de tampa, volume e número de explantes ou rebentos estão indicados na Tabela 2.5.

A manipulação do material vegetal foi executada em câmara de fluxo laminar horizontal, sobre caixas de Petri esterilizadas por calor seco durante 2 horas a 180 °C. Os utensílios de corte e manuseamento, durante as operações, foram esterilizados em esterilizador de bancada (Steri™ 350) a uma temperatura de 250 °C e durante 8/10 s.

As culturas foram mantidas sob condições ambientais controladas em sala de cultura ARALAB™, com fotoperíodo de 16h luz e 8h de escuro, sob uma densidade de fluxo fotónico (PPFD) de $50 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo

TLD 18/40. A temperatura situou-se nos 25 °C dia e 22 °C noite, não controlando a humidade relativa do ar, mas que se manteve na ordem dos $35 \pm 5\%$.

Tabela 2.5. Características dos recipientes, volume de meio e número de explantes para as fases de estabelecimento, multiplicação/alongamento e fase de indução no enraizamento.

	Estabelecimento	Multiplicação/Alongamento	Enraizamento
Tipo de recipiente	Tubo de ensaio	Frasco	Frasco
Dimensões (mm)	150 x 25 Ø	90 x 75 Ø	125 x 65 Ø
Tipo de tampa	Metal opaco	plástico translúcido	plástico opaco
Volume de meio (ml)	10	50	50
Número de explantes	1	7	5

3. FASE DE ACLIMATIZAÇÃO

O material vegetal utilizado nos ensaios foi seleccionado por forma a constituir lotes homogéneos e apresentando sinais aparentes de crescimento, quer da parte aérea quer da parte radicular.

As plantas, após a sua expressão e desenvolvimento radicular *ex vitro*, foram retiradas das caixas de poliestireno expandido e colocadas directamente em vasos de plástico individuais com 200 cm³ de capacidade (Ø 9 x 8 cm). O substrato utilizado foi uma mistura igual à utilizada para a expressão e desenvolvimento radicular *ex vitro* (turfa:perlite, 1:2, v:v). Depois do envasamento cada planta foi regada com uma solução nutritiva com a seguinte formulação:

- Macronutrientes: ½ MS ¼ NO₃
- Micronutrientes: MS
- Fe-EDTA (MS)
- Inositol (100 mg l⁻¹) pH da solução nutritiva: 5,5

Após esta rega as plantas envasadas foram colocadas imediatamente nos estufins de aclimatização.

Para a fase de aclimatização das microplantas foram utilizados estufins equipados com dispositivos de controlo de luz, humidade, temperatura (Fitoclima 700 EDTU, ARALAB™) e CO₂ (Fitoclima 1600 EDTU, ARALAB™).

A iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes Osram ® colocadas no topo do estufim, com intensidade de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e fotoperíodo de 16h.

A humidade relativa (HR), controlada pela sonda higrométrica com controlo digital, foi 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 humidade relativa foram sendo gradualmente reduzidos desde os 98% no dia 0 de instalação 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.

Com a finalidade de distinguir entre as folhas formadas na fase de multiplicação que se mantiveram durante o enraizamento e aclimatização, designadas por folhas persistentes (*fP*), e as folhas cujo desenvolvimento e/ou expansão ocorreu exclusivamente durante a aclimatização, designadas por folha um (*f1*), folha dois (*f2*), folha três (*f3*) e restantes (que no seu conjunto serão designadas por folhas novas) de acordo com a sua ordem de diferenciação, procedeu-se no final da primeira semana de aclimatização à colocação de uma pequena etiqueta em papel no pecíolo da primeira folha diferenciada (*f1*).

A folha um formou-se e iniciou a sua diferenciação ainda durante a fase de enraizamento, mas o seu desenvolvimento e expansão ocorreu já em condições de aclimatização.

3.1. Tratamentos de aclimatização

Como foi referido, avaliar a influência da concentração de CO₂ na fase de aclimatização de microplantas de castanheiro, foi o principal objectivo deste trabalho, tendo-se estudado o efeito de duas concentrações de CO₂. Na Tabela 2.6 estão descritos os tratamentos de aclimatização efectuados às microplantas, indicando os factores ambientais definidos e o factor ambiental variável.

Tabela 2.6. *Tratamentos de aclimatização, utilizando duas concentrações de CO₂, 350 e 700 μL L⁻¹.*

Factores ambientais de aclimatização definidos	Factor ambiental de aclimatização variável
Temperatura: constante de 25 ± 2°C	Concentração de CO₂: 700 μL L ⁻¹
Fotoperíodo: 16h	350 μL L ⁻¹
Humidade relativa: redução gradual de 95 a 50%, durante as 4 semanas de aclimatização	
Irradiância: 250 ± 10 μmol m ⁻² s ⁻¹	

3.2. Parâmetros quantificadores

Os parâmetros quantificados foram os seguintes:

- *Análise de crescimento*
- *Histologia e anatomia foliar*
- *Quantificação de clorofilas*
- *Parâmetros fotossintéticos*
- *Quantificação da proteína solúvel total*

3.2.1. Análise de crescimento

Os parâmetros de crescimento foram determinados por planta e estas foram avaliadas no dia zero de aclimatização (no final da 4^a semana de enraizamento) e 4 semanas após o dia zero, ou seja, no final da aclimatização.

Estes parâmetros foram avaliados separadamente em folhas persistentes (*fP*), folha um (*f1*), folha dois (*f2*), folha 3 (*f3*) e folhas restantes.

A área foliar foi obtida por amostragem destrutiva, medida através do programa de análise de imagem WinRhizo (Régent Instruments Inc.).

A quantidade de biomassa acumulada durante o enraizamento e aclimatização foi obtida por amostragem destrutiva das plantas, determinando o peso fresco e posterior peso seco das diferentes partes da planta. A secagem do material vegetal foi efectuada em estufa com ventilação forçada de ar a 80° C, durante um mínimo de 48h, até à obtenção de peso constante. A pesagem foi feita em balança analítica digital com quatro casas decimais (AB 104, Metler Toledo, Switzerland), após o arrefecimento do material vegetal, em excicador com sílica gel.

A determinação do comprimento total das raízes, a área total de absorção da raiz, o volume e o diâmetro médio das raízes foi efectuada por amostragem destrutiva, medida através do programa de análise de imagem WinRhizo (Régent Instruments Inc.).

Os parâmetros e índices de crescimento calculados foram os seguintes:

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

a_f = altura final; a_i = altura inicial

∪ peso fresco total (mg)

∪ peso fresco foliar (mg)

∪ peso fresco aéreo (mg)

∪ peso fresco radicular (mg)

∪ peso seco total (mg)

∪ peso seco foliar (mg)

∪ peso seco aéreo (mg)

∪ peso seco radicular (mg)

∪ ganho de peso fresco (mg)

∪ biomassa foliar (mg)

∪ biomassa radicular (mg)

∪ biomassa total (mg)

∪ razão peso fresco parte aérea / parte radicular

∪ razão peso fresco / peso seco

∪ razão peso seco parte aérea / parte radicular

∪ razão de peso foliar (LWR) dada por:

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

∪ área foliar (cm²)

∪ área foliar específica (SLA) dada por:

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

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

$$\text{RGR (g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}) = \frac{1}{\overline{ps_0}} \frac{\overline{ps_f} - \overline{ps_0}}{t}$$

$\overline{ps_0}$ = peso seco médio das plantas no dia 0

$\overline{ps_f}$ = peso seco médio das plantas após o tratamento

t = número de dias do tratamento

∪ taxa líquida de assimilação (NAR) dada por:

$$\text{NAR (g m}^2 \text{ dia}^{-1}) = \frac{1}{\overline{Af_0}} \frac{\overline{ps_f} - \overline{ps_0}}{t}$$

$\overline{Af_0}$ = área foliar média das plantas no dia 0

$\overline{ps_f}$ = peso seco médio das plantas após o tratamento

t = número de dias do tratamento

∪ razão de área foliar (LAR) dada por:

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

∪ Morfologia radicular:

- comprimento total da raiz (cm)
- área total de absorção da raiz (cm²)
- volume da raiz (cm³)
- diâmetro médio da raiz (mm)

Cada determinação foi feita a partir de plantas distintas e casualizadas, tendo sido utilizadas 30 amostras (n=30) e as experiências foram repetidas 2 vezes para cada tratamento.

3.2.2. Histologia e anatomia foliar

Os estudos para a caracterização histológica e anatômica das folhas durante o processo da aclimatização, foram efectuados nas folhas persistentes (*fP*), folha um (*f1*), folha dois (*f2*) e folha três (*f3*) de aclimatização, após os respectivos tratamentos.

Para os estudos de anatomia e histologia foliar, feitos a partir de cortes transversais, a execução de preparações definitivas foi feita de acordo com as seguintes fases:

- *Material vegetal*

Fragmentos de $\pm 3 \times 5$ mm do limbo das folhas, com e sem nervura central.

- *Fixação*

O material vegetal foi fixado em FAA (formaldeído a 35%: ácido acético glacial: etanol absoluto: água destilada, 2:1:10:7, v:v:v:v), durante pelo menos 24 h.

- *Desidratação*

Após a fixação, o material vegetal foi lavado em etanol a 50% durante duas horas, e posteriormente 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 h na concentração de 99%.

• *Infiltração*

Feita com hidroxietilmetacrilato (LKB Historesin ®, Leica Comercial, Kit 70-2218-500), no vácuo, já que a principal dificuldade do fixador é a sua lenta penetração no tecido. Previamente, o material esteve na solução de infiltração diluída a 50% durante 2 horas, passando depois para a solução de infiltração pura durante 3 horas.

• *Inclusão*

Consiste em impregnar e envolver o tecido por uma substância que o suporte durante o corte. O meio de inclusão preenche os espaços resultantes da remoção da água e o material fica globalmente envolvido num bloco do mesmo meio. Foi efectuada 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 proceder à orientação do material vegetal nos alvéolos.

• *Montagem*

Foi efectuada com os respectivos suportes plásticos dos moldes de teflon utilizados.

• *Cortes*

Os cortes do material vegetal foram feitos num micrótomo rotativo (American Optical Company, modelo 820), com espessura de 5 a 7 µm.

• *Coloração*

A coloração foi efectuada com uma solução aquosa de azul de toluidina a 0,05% (p/v) durante 1 minuto. Após lavagem com água corrente e secagem, foi colocada

a lamela e fixa com Entellan ®, procedendo-se seguidamente à limpeza e etiquetagem das lâminas.

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 tipo de folha foram quantificados os seguintes parâmetros:

- ◆ espessura da nervura principal (medido perpendicularmente ao mesófilo);
- ◆ espessura do cilindro vascular;
- ◆ 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 de corte transversal;
- ◆ frequência estomática.

As observações e contagens de estomas, foram feitas na página inferior das folhas aclimatizadas sob os dois níveis de CO₂. 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.

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.

3.2.3. Quantificação de clorofilas

A quantificação das concentrações das clorofilas foi efectuada nas folhas de plantas submetidas aos dois níveis de CO₂, no final da fase de aclimatização, ou seja, 4

semanas após o dia zero. Foram quantificadas as concentrações de clorofilas em folhas persistentes (*fP*), folha um (*f1*), folha dois (*f2*) e folha três (*f3*).

A extracção foi feita em acetona a 80%, de acordo com o método de Arnon (1949), a partir de dois discos de tecidos foliares com \varnothing 7 mm (0,77 cm² de área), recolhidas em plantas distintas e casualizadas, tendo sido usadas 8 amostras (n=8) para cada tipo de folha. Após centrifugação a 12000 rpm durante 10 minutos, as absorvências dos extractos foram lidas no espectrofotómetro (Jasco Model 7800 UV/VIS), 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):

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

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

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

Abs₆₄₅ e *Abs₆₆₃*: absorvência a 645 e 663 nm, respectivamente.

V: volume final do extracto (ml).

S: área dos discos foliares (cm²).

As experiências foram repetidas duas vezes para cada tratamento.

Os resultados foram expressos em mg de clorofila por unidade de peso seco foliar (mg g⁻¹ ps) e em mg de clorofila por unidade de área foliar (g m⁻²). 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.

3.2.4. Fotossíntese

3.2.4.1. Taxa de fotossíntese aparente, transpiração e condutância estomática

A taxa de fotossíntese aparente (A), a taxa de transpiração (E) e a condutância estomática (G) foram medidas na folha um ($f1$), folha dois ($f2$) e folha três ($f3$) de plantas submetidas aos dois níveis de CO_2 , em final de aclimatização. Neste tipo de plantas, as medições foram efectuadas 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 situou-se nos $40 \pm 5\%$ e a concentração de CO_2 atmosférico de $350 \pm 5 \mu\text{L L}^{-1}$.

O equipamento utilizado foi um porómetro portátil com sistema de aquisição de dados integrado (LI-COR, LI-6400 Portable Photosynthesis), acoplado a uma cuvete circular com 6 cm^2 de área, a funcionar em sistema aberto.

A taxa de fotossíntese líquida ou aparente¹ é determinada através da taxa de CO_2 fixado por unidade de área foliar e por unidade de tempo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). A taxa de transpiração² é dada pelo fluxo de vapor de água por unidade de área foliar e por unidade de tempo ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a condutância estomática é dada pelo inverso da resistência estomática, que é calculada pela fórmula seguinte, conhecendo a transpiração e temperatura da superfície da folha e expressa em $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

$$R_{\text{folha}} = \frac{\frac{e_f - e_0}{e_0 - e_i} \times \frac{P - e_0}{P}}{W} - R_b$$

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

¹ $A = W \times (C_0 - C_i)$ onde W : fluxo molar por unidade de área ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) calculado em função da temperatura do ar, da pressão atmosférica, do volume de fluxo e da área da folha; C_0 e C_i : concentrações de CO_2 na saída e entrada da cuvete.

² $E = (e_0 - e_i) / (P - e_0) \times W \times 10^3$ onde e_0 e e_i : pressões de vapor à saída e entrada da cuvete; P : pressão atmosférica.

Efectuaram-se 3 leituras consecutivas para cada folha, sendo o valor considerado a média dessas três leituras. Foram utilizadas 10 plantas ($n=10$) para cada um dos tipos de folha. A experiência foi repetida duas vezes.

3.2.4.2. 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 O_2 em condições de CO_2 saturante. A densidade de 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 (7 a $140 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para o cálculo de ϕ . O sistema utilizado para fazer a determinação era 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). Para fornecer a PPFD pretendida foi utilizada uma lâmpada Björkman (Hansatech Ins. Ltd, LS2), com sistema de filtros neutros que podem ser associados entre si.

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. Esta unidade é constituída por três secções. As secções superior e inferior são ocas e no seu interior circula água à temperatura definida, que neste caso é de 25°C , vinda de um banho-maria termostaticado (Julabo Labortechnik, Modelo F10-UC). No topo da secção superior situa-se uma janela acrílica transparente onde se coloca a lâmpada, a fim de permitir a iluminação do material vegetal. Este material, constituído por discos foliares, é colocado na secção central, a câmara de reacção, 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 abóboda saliente central, e o ânodo de prata o fundo do sulco circular que o rodeia. Deitam-se algumas gotas de uma solução aquosa saturada de

cloreto de potássio (electrólito) sobre a abóboda e no sulco, cobre-se com uma película de papel, tipo mortalha de cigarro, de modo a assegurar a formação de uma camada uniforme entre o cátodo e o ânodo. Por fim, cobre-se com uma fina película de teflon. Entre as secções central e inferior, monta-se o disco do eléctrodo, de modo a que a abóboda 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.

É possível induzir diferenças de potencial entre os dois eléctrodos, provocando polarização, ou seja, o cátodo torna-se negativo e o ânodo positivo, através da caixa de controlo. 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).

Os discos foliares são colocados na câmara de reacção, com a página adaxial virada para cima, ficando dispostos em círculo e equidistantes, sendo a câmara preenchida também por discos de metal, feltro e espuma que servem de suporte aos discos foliares. A secção superior ao fechar-se, comprime os discos contra a janela transparente, pela qual irão receber a irradiância definida, sendo mantidos à temperatura da água que circula no sistema.

O passo seguinte é proceder à calibração do eléctrodo, após ajustamento do sinal e tendo escolhido o factor de amplificação apropriado na caixa de controlo. A finalidade da calibração 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, que é efectuada por uma seringa adaptável numa das entradas.

Nas condições padrão de temperatura e pressão (25°C , 1 atm), 1 ml de ar atmosférico (com 21% de O_2 e 0,0035% de CO_2) contém cerca de 210 μl de oxigénio, considerando que 1 mole de gás ocupa 22,414 litros, verifica-se que este volume de oxigénio contém 9,37 μl de oxigénio.

Quando se retira o mililitro de ar injectado, após a estabilização do sinal, fecham-se as torneiras de saída e de entrada, acende-se a lâmpada de iluminação e vai-se acompanhando a taxa de libertação de oxigénio durante 10 a 15 minutos, em média, para cada uma das densidades de fluxo fotónico fotossinteticamente activo (PPFD) pretendido.

No caso do ensaio, as taxas foram determinadas para as folhas persistentes (*fP*), folha dois (*f2*), folha três (*f3*) à temperatura constante de 25°C e a concentração de CO₂ foi de aproximadamente 5%, fornecido pela libertação de CO₂ a partir de uma solução tampão saturada de NaHCO₃.

Para a determinação das curvas de resposta à luz, a CO₂ saturante, após um período inicial de escuro, a densidade de fluxo fotónico (PPFD) variou progressivamente de 7 a 1120 μmol quanta m⁻² s⁻¹, durante o qual as taxas de libertação de O₂ por unidade de área foliar e por unidade de tempo (μmol m⁻² s⁻¹), foram calculadas pela seguinte expressão:

$$A = \frac{(l_f - l_i)}{(l_c - l_i)} \times \frac{1}{\Delta t} \times \frac{1}{s} \quad K = 15,62 \times (100 - CO_2) \times \frac{273}{273 + T}$$

[*l_f* e *l_i* são as leituras finais e iniciais dos valores da unidade LD2, de medida ou de calibração (*c*) respectivamente; Δt é o intervalo de tempo entre *l_i* e *l_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 taxas 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 & Chartier, 1977; Olsson & Leverenz, 1994). A *A_{max}* pode ser modelada pela seguinte equação:

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

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

A utilização deste modelo matemático permite fazer o melhor ajustamento da curva de resposta à PPFDF e, em simultâneo, calcular os parâmetros da equação através de um sistema de regressão não linear³.

O rendimento quântico aparente máximo da fotossíntese (ϕ) traduz os gastos na conversão de energia luminosa em energia química na fotossíntese e que foi quantificado como sendo o número de moles de O_2 libertados 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 da 0 a 140 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PPFDF.

O ponto de compensação para a luz (I_0) para cada tipo de folha 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 cm^2 de área) destacados da mesma folha a partir de plantas casualizadas. No caso das folhas persistentes, devido à sua área reduzida tornou-se 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.

3.2.5. Quantificação da proteína solúvel total

³ [Parâmetros]

$A_{max}=20$ (taxa de fotossíntese para PPFDF infinita)

$Q=0,09$ (rendimento quântico aparente)

$R=0,9$ (taxa de respiração no escuro)

$C=0,9$ (convexidade da curva de resposta)

[Variáveis]

$X=\text{col}(1)$

$Y=\text{col}()$

$f=((Q*x+A_{max}-\text{SQRT}(Q*x+A_{max})^2-4*A_{max}*Q*C*x))/(2*C) - R$

Ajuste x a y

A determinação da proteína solúvel total foi efectuada em folhas persistentes (*fP*), folha um (*f1*), folha dois (*f2*) e folha três (*f3*), de plantas aclimatizadas nos dois níveis de CO₂. Retiraram-se discos foliares com Ø 7 mm (0,77 cm² de área), recolhidas 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 discos foliares foram macerados em almofariz (arrefecido com gelo), com 1,5 ml de tampão Tris.HCl 100 mM pH 8,5 e 10 mg de polivinilpolipirrolidina (PVPP). O extracto foi centrifugado a 13000 rpm durante 5 minutos, aproveitando o sobrenadante para quantificação, sendo a mesma efectuada pelo método 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 (Jasco, Model 7800, UV/VIS). 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 concentrações conhecidas.

Os resultados foram expressos em mg de proteína por unidade de peso foliar (mg g⁻¹ ps). O peso seco de cada disco foi estimado pelo 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.

3.3. 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 determinação da proteína solúvel total, foram avaliados por análise de variância uni- ou bi-factorial, consoante os casos, utilizando o programa Statgraphics, Statistical Graphics System[®] Versão 6.0.

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 estas determinações utilizou-se o programa SigmaStat® Versão 1.0 da Jandel Scientific Corp™.

Para o cálculo do rendimento quântico foi ajustada a recta de regressão na fase linear das taxas da fotossíntese, sendo o rendimento quântico traduzido pelo declive dessa recta \pm erro-padrão, tal como para os resultados do ponto de compensação para a luz. Para estas determinações utilizou-se o programa Statgraphics, Statistical Graphics System® Versão 6.0.

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

Na elaboração das bases de dados foi utilizado o programa Microsoft Excel®, Versão 7 para Windows 95®. 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®.

1. ANÁLISE DE CRESCIMENTO

Os resultados que a seguir se apresentam referem-se aos parâmetros de crescimento, tendo as plantas sido avaliadas no dia zero de aclimatização (no final da 4ª semana de enraizamento) e quatro semanas após o dia zero, ou seja, no final da fase de aclimatização, sob duas concentrações de CO₂: 350 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$.

1.1. Crescimento relativo, biomassa total e razão peso seco parte aérea / raiz

As plantas aclimatizadas sob a concentração de 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO₂, apresentaram o valor de crescimento relativo em altura maior (3,81), cerca de uma vez e meia mais elevado do que as plantas aclimatizadas a 350 $\mu\text{L L}^{-1}$, verificando-se assim que a concentração de CO₂ provocou alterações significativas neste parâmetro (Fig. 3.1).

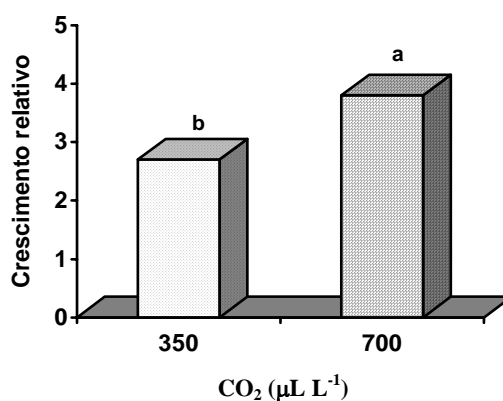


Figura 3.1. Efeito da concentração de CO₂ durante a fase de aclimatização no crescimento relativo em altura, em plantas de castanheiro micropropagadas.

A biomassa total por planta, dada pelo somatório do peso seco da raiz, do caule e das folhas no final da 4ª semana de aclimatização, não foi influenciada pelo factor em estudo, tendo-se verificado que as microplantas aclimatizadas a 350 e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$, não diferiram significativamente (Fig. 3.2). Nas plantas aclimatizadas a 350 $\mu\text{L L}^{-1}$, o

acrécimo foi de 1231,8 mg e nas plantas aclimatizadas a 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ o acréscimo foi de 1259,9 mg.

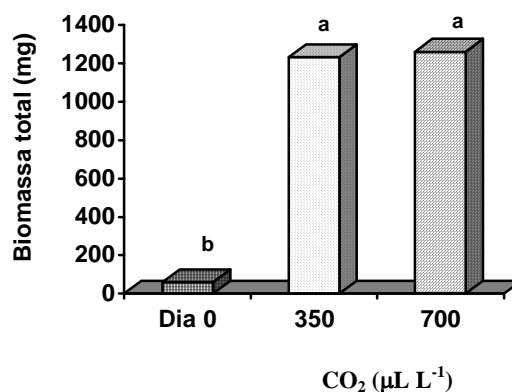


Figura 3.2. Efeito da concentração de CO₂ durante a fase de aclimatização na biomassa total, em plantas de castanheiro micropropagadas.

Comparando cada um dos tratamentos de aclimatização com o dia zero, foi possível registar os acréscimos que as microplantas obtiveram como consequência do factor em estudo. Assim, para ambos os tratamentos de aclimatização verificaram-se aumentos significativos de biomassa em relação ao dia zero, registando-se o maior acréscimo na concentração de 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 3.2).

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 verificado que a concentração de CO₂ afecta significativamente este parâmetro. Assim, verificou-se para o regime de maior concentração de CO₂, uma razão mais elevada (9,4) ou seja, o aumento do CO₂ favoreceu a acumulação de biomassa na parte aérea comparativamente à biomassa da parte radicular. A 350 $\mu\text{L L}^{-1}$ a razão foi mais baixa (6,6), pelo que a acumulação de biomassa radicular se mostrou favorecida (Fig. 3.3).

Comparativamente ao dia zero, a razão difere significativamente em relação aos restantes tratamentos, sendo de referir o relativo desequilíbrio que se verifica nas microplantas no dia zero de aclimatização, com uma razão de 4,1 contra 9,4 e 6,6 registados a 700 e 350 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 3.3).

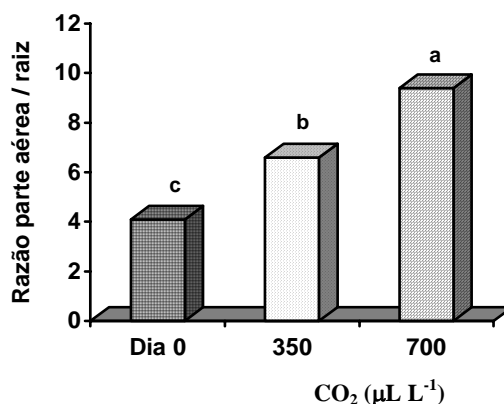


Figura 3.3. Efeito da concentração de CO₂ durante a fase de aclimatização na razão entre parte aérea e parte radicular, em plantas de castanheiro micropropagadas.

1.2. Peso fresco, razão peso fresco parte aérea / raiz e razão peso fresco / peso seco

Em relação ao peso fresco não se registaram diferenças significativas entre os dois tratamentos, mas o valor mais elevado ocorreu na concentração de 700 µL L⁻¹, com 5823,3 mg e o valor mais baixo de 5245,0 mg na concentração de 350 µL L⁻¹ (Fig. 3.4).

Comparativamente ao dia zero de aclimatização, o peso fresco difere significativamente dos dois tratamentos, apresentando um valor de 262,9 mg (Fig. 3.4).

No que respeita à razão peso fresco aéreo / raiz, registaram-se diferenças significativas entre os tratamentos, com 2,8 para as microplantas aclimatizadas a 350 µL L⁻¹ e 4 para as microplantas aclimatizadas a 700 µL L⁻¹. Verificou-se que as plantas aclimatizadas a mais baixa concentração de CO₂, apresentaram uma razão significativamente inferior comparativamente às plantas do dia zero, e estas não diferiram significativamente das microplantas aclimatizadas na concentração de CO₂ mais elevado (Fig. 3.5).

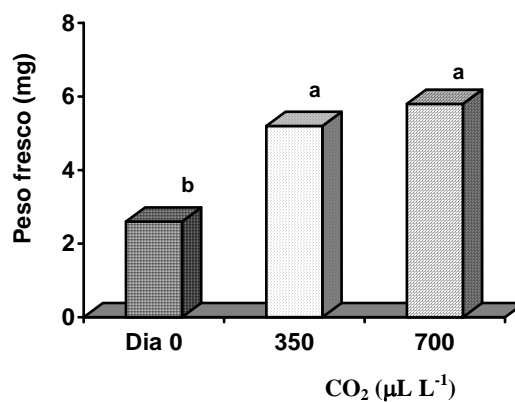


Figura 3.4. Efeito da concentração de CO₂ durante a fase de aclimatização no peso fresco, em plantas de castanheiro micropropagadas.

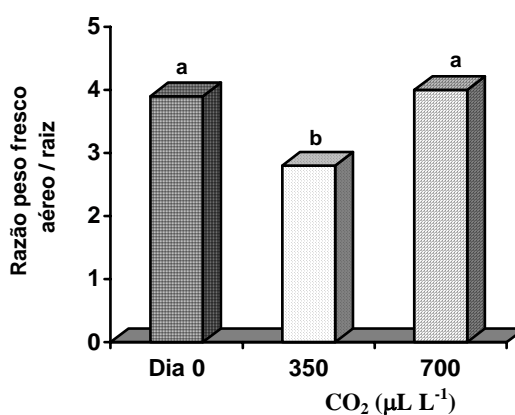


Figura 3.5. Efeito da concentração de CO₂ durante a fase de aclimatização na razão peso fresco aéreo / raiz.

A razão peso fresco / peso seco não foi afectada significativamente pela concentração de CO₂, registando-se o valor mais elevado na concentração de 700 µL L⁻¹ com 5 e a razão mais baixa foi de 4,5 na concentração de 350 µL L⁻¹ (Fig. 3.6).

Em relação à razão do dia zero, esta não difere significativamente em relação aos tratamentos, apresentando um valor ligeiramente superior à razão das microplantas aclimatizadas a 350 µL L⁻¹ e ligeiramente inferior à das plantas aclimatizadas a 700 µL L⁻¹ (Fig. 3.6).

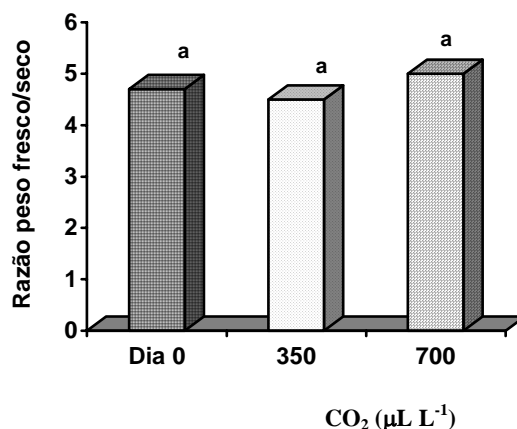


Figura 3.6. Efeito da concentração de CO₂ durante a fase de aclimatização na razão peso fresco / peso seco, em plantas de castanheiro micropropagadas.

1.3. Biomassa foliar, radicular e razão de peso foliar

A acumulação de biomassa foliar teve um comportamento semelhante ao da acumulação de biomassa total, não tendo ocorrido diferenças significativas entre as duas concentrações de CO₂ utilizadas, embora as microplantas do regime de 700 µL L⁻¹ apresentassem um valor ligeiramente superior comparativamente ao das microplantas aclimatizadas a 350 µL L⁻¹. Em relação ao dia zero, o ganho de biomassa foliar dos tratamentos foi significativamente diferente, permitindo um ganho de 852,2 mg na concentração de 350 µL L⁻¹ e de 858,8 mg na concentração de 700 µL L⁻¹ (Fig. 3.7).

O parâmetro biomassa radicular mostrou um comportamento inverso ao descrito para a biomassa foliar; as plantas aclimatizadas a 700 µL L⁻¹ apresentaram um valor de biomassa radicular inferior (139,4 mg) comparativamente ao das microplantas aclimatizadas na concentração de 350 µL L⁻¹ (163,4mg), embora estes valores não sejam significativamente diferentes. Em ambos os tratamentos, os acréscimos de biomassa radicular são significativamente diferentes do valor apresentado no dia zero de aclimatização (apenas 12,5 mg) (Fig. 3.8).

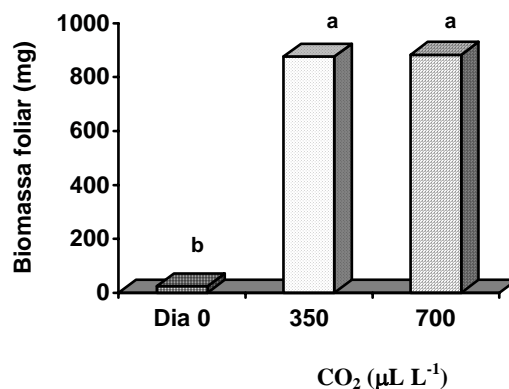


Figura 3.7. Efeito da concentração de CO₂ durante a fase de aclimatização na biomassa foliar, em plantas de castanheiro micropropagadas.

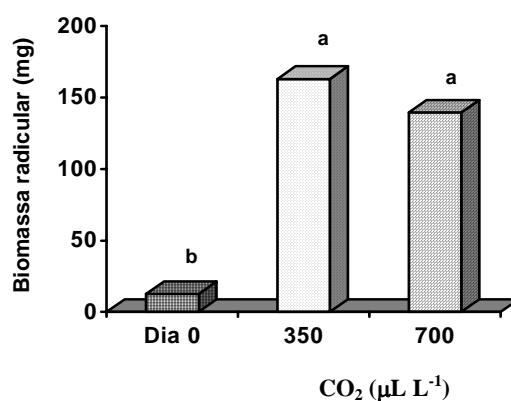


Figura 3.8. Efeito da concentração de CO₂ durante a fase de aclimatização na biomassa radicular, em plantas de castanheiro micropropagadas.

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. Em ambas as concentrações de CO₂ utilizadas durante a aclimatização, não se registaram diferenças significativas por influência do factor em estudo (Fig. 3.9).

No entanto, comparativamente ao início da aclimatização, dia zero, estes valores apresentaram-se significativamente diferentes para ambas as modalidades, e o investimento em biomassa foliar foi sempre superior a 68% (Fig. 3.9).

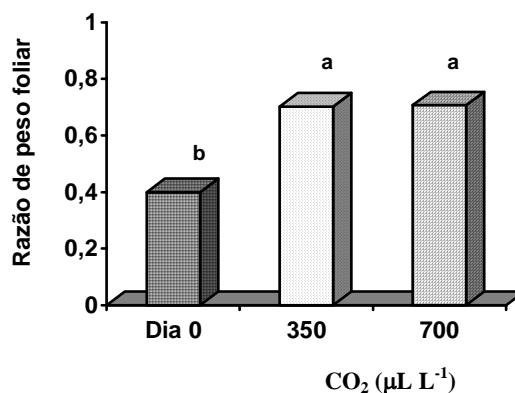


Figura 3.9. Efeito da concentração de CO₂ durante a fase de aclimatização na razão de peso foliar, em plantas de castanheiro micropropagadas.

1.4. Área foliar e área foliar específica

A área foliar é um importante indicador para avaliar a capacidade fotossintética da planta e as suas capacidades de crescimento e desenvolvimento. Verificou-se que as concentrações de CO₂ utilizadas durante a aclimatização não afectaram significativamente a área foliar, embora no regime de 700 µL L⁻¹ se registasse um valor superior de área foliar (254,0 cm²) comparativamente ao regime de 350 µL L⁻¹ (215,3 cm²) (Fig. 3.10).

Comparando estes valores de área foliar no final do período de aclimatização com a área foliar que as microplantas possuíam no dia zero de aclimatização, verificaram-se acréscimos significativos para ambos os grupos de microplantas (Fig. 3.10).

A área foliar específica (SLA) permite avaliar a relação entre o aumento de superfície foliar com o respectivo ganho em peso. A área foliar específica das plantas aclimatizadas a 350 µL L⁻¹ é significativamente diferente (271,5 cm² g⁻¹) das plantas aclimatizadas a 700 µL L⁻¹ (324,2 cm² g⁻¹) (Fig. 3.11), podendo-se afirmar que o significativo aumento de área foliar das microplantas aclimatizadas a mais baixa concentração de CO₂, não foi acompanhado de respectivo aumento de peso, pelo que será de admitir uma expansão foliar associada a um acréscimo de espaços intercelulares.

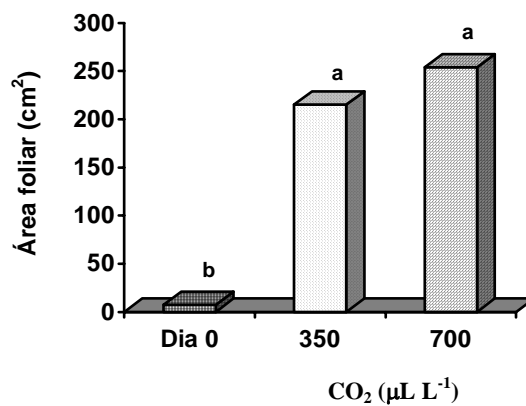


Figura 3.10. Efeito da concentração de CO₂ durante a fase de aclimatização na área foliar, em plantas de castanheiro micropropagadas.

Comparando os valores de SLA com o dia zero de aclimatização, verifica-se que as microplantas aclimatizadas na mais alta concentração de CO₂ não diferem significativamente do dia zero (310,3 cm² g⁻¹) (Fig. 3.11), o que traduz um relativo equilíbrio na funcionalidade das estruturas foliares das microplantas.

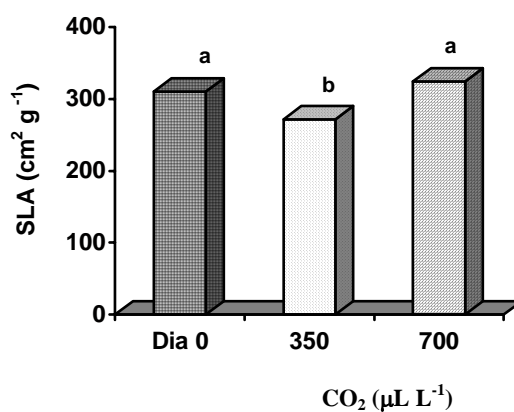


Figura 3.11. Efeito da concentração de CO₂ durante a fase de aclimatização na área foliar específica (SLA), em plantas de castanheiro micropropagadas.

1.5. Taxa de crescimento relativo, taxa líquida 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), verificou-se um ligeiro acréscimo nas microplantas aclimatizadas a maior concentração de CO₂ (0,732 g g⁻¹ dia⁻¹) em relação às aclimatizadas a 350 μL L⁻¹ (0,702 g g⁻¹ dia⁻¹) (Tab. 3.1).

Também no caso da taxa líquida de assimilação (NAR), a evolução não foi notória, registando-se valores muito semelhantes para ambas as concentrações de CO₂; 60,1 g m⁻² dia⁻¹ e 61,5 g m⁻² dia⁻¹, para as concentrações de 350 μL L⁻¹ e 700 μL L⁻¹, respectivamente (Tab. 3.1).

Quanto à razão de área foliar (LAR) registaram-se diferenças entre os tratamentos, parecendo ter sido influenciada positivamente pela concentração mais intensa de CO₂ a que as microplantas estiveram sujeitas durante a aclimatização. Para a concentração de 350 μL L⁻¹, a LAR foi de 0,0188 m² g⁻¹ e para a de 700 μL L⁻¹ foi de 0,0223 m² g⁻¹ (Tab. 3.1).

Tabela 3.1. Influência da concentração de CO₂ durante a fase de aclimatização, na taxa de crescimento relativo (RGR), na taxa líquida de assimilação (NAR) e na razão de área foliar (LAR), em plantas de castanheiro micropropagadas.

CO ₂ (μL L ⁻¹)	RGR (g g ⁻¹ dia ⁻¹)	NAR (g m ⁻² dia ⁻¹)	LAR (m ² g ⁻¹)
350	0,702	60,1	0,0188
700	0,732	61,5	0,0223

1.6. Morfologia radicular: comprimento total, área total de absorção, volume e diâmetro médio

As plantas aclimatizadas nas duas concentrações de CO₂ apresentaram diferenças significativas no comprimento total da raiz, verificando-se que as raízes que apresentaram maior comprimento total foram aclimatizadas a 350 µL L⁻¹ (284,5 cm) comparativamente às raízes das microplantas aclimatizadas a 700 µL L⁻¹ (223,7 cm) (Tab. 3.2). Comportamento semelhante ocorreu no parâmetro área total de absorção, verificando-se que a maior área total de absorção ocorreu na concentração mais baixa de CO₂ (76,0 cm²) diferindo significativamente da área radicular obtida na concentração de 700 µL L⁻¹ (62,0 cm²) (Tab. 3.2).

Relativamente ao volume das raízes não se registaram diferenças significativas (Tab. 3.2), pelo que o factor em estudo não parece ter influenciado este parâmetro.

Tabela 3.2. Influência da concentração de CO₂ durante a fase de aclimatização, no comprimento (cm), na área (cm²), no volume e no diâmetro radicular (mm), em plantas de castanheiro micropropagadas..

CO ₂ (µL L ⁻¹)	Comprimento total (cm)	Área (cm ²)	Volume (cm ³)	Diâmetro médio (mm)
350	284,5 a	76,0 a	1,6 a	0,82 b
700	223,7 b	62,0 b	1,4 a	0,86 a

O diâmetro médio da raiz foi influenciado pela concentração de CO₂ utilizada, tendo-se registado diferenças significativas entre os dois tratamentos, verificando-se que o maior diâmetro médio da raiz ocorreu na concentração de 700 µL L⁻¹ (0,86 mm) comparativamente ao diâmetro da raiz nas plantas aclimatizadas a 350 µL L⁻¹ (0,82 mm) (Tab. 3.2).

2. HISTOLOGIA E ANATOMIA FOLIAR

2.1. *Análise qualitativa*

2.1.1. Observações histológicas

As secções transversais dos diferentes tipos de folha analisados nas duas condições de aclimatização apresentaram uma maior ou menor diferenciação dorsiventral do mesófilo em parênquima em paliçada e lacunoso. Não se registaram diferenças susceptíveis de permitirem uma clara diferenciação, em termos qualitativos, entre o mesmo tipo de folha das microplantas sujeitas aos diferentes níveis de CO₂.

As folhas persistentes apresentaram uma reduzida espessura e uma diferenciação muito pouco nítida entre parênquima em paliçada e parênquima lacunoso (Fig. 3.13A e 3.15A). O parênquima em paliçada, está organizado numa só camada de células com forma ovóide, pouco alongadas. O parênquima lacunoso apresentou poucos espaços intercelulares e reduzido desenvolvimento vascular, que se pode observar através da organização da nervura principal onde não se registou desenvolvimento de novos elementos vasculares, bem como de tecidos de suporte (Fig. 3.12).

Analisando as folhas desenvolvidas durante a fase de aclimatização, folha um, folha dois e folha três, verifica-se uma adaptação gradual das estruturas histológicas ao longo do decorrer do processo, de acordo com as novas condições, em especial das progressivas reduções de humidade em que se foram desenvolvendo. O parênquima em paliçada mostrou uma gradual modificação estrutural que se traduziu pela aproximação da forma das células a uma forma mais rectangular, mas não foram significativas as mudanças ao nível da diminuição dos espaços intercelulares, em ambos os tratamentos (Fig. 3.13 e 3.15). O parênquima lacunoso composto por células esféricas também apresentou muitos espaços intercelulares que foram diminuindo ao longo da diferenciação das folhas, não se registando diferenças entre os tratamentos. A espessura total das folhas aumentou gradualmente. Também foi progressiva a diferenciação e desenvolvimento do sistema vascular ao nível da nervura principal (Fig. 3.12 e 3.14). Observou-se ainda uma gradual formação de tecidos de suporte, em especial

colênquima, que se mostrou bem desenvolvido na folha três das plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$. Na folha três de ambos os tratamentos, a diferenciação de tecidos vasculares, xilema e floema, apresentou-se bem nítida e desenvolvida, ao nível da nervura principal (Fig. 3.12D e 3.14D).

2.1.2. Estomas

A morfologia dos estomas foi mais um parâmetro que permitiu acompanhar o gradual processo das plantas micropropagadas às condições de CO_2 a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ e $700 \mu\text{L L}^{-1}$ e também às condições de humidade, durante a fase de aclimatização.

Durante a aclimatização, a análise da morfologia estomática no decorrer do processo de formação de novas folhas, mostrou uma gradual diferenciação e normalização.

Nas microplantas aclimatizadas quer a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ quer a $700 \mu\text{L L}^{-1}$, observaram-se morfologias estomáticas muito semelhantes, sendo bastante evidente a diferenciação entre células guarda e células companheiras e a forma elipsoidal que os estomas começaram a apresentar, a partir da folha dois. No entanto, a acentuada abertura estomática presente nas folhas persistentes (Fig. 3.16A) foi gradualmente diminuindo nas novas folhas formadas (Fig. 3.16B,C e D).

***Fig. 3.12.** Cortes transversais ao nível da nervura principal dos diferentes tipos de folhas analisadas em plantas de castanheiro micropropagadas e aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$. (A) Folha persistente (fP). (B) Folha um (f1). (C) Folha dois (f2). (D) Folha três (f3).*

***Fig. 3.13.** Cortes transversais ao nível do mesófilo dos diferentes tipos de folhas analisadas em plantas de castanheiro micropropagadas e aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$. (A) Folha persistente (fP). (B) Folha um (f1). (C) Folha dois (f2). (D) Folha três (f3).*

***Fig. 3.14.** Cortes transversais ao nível da nervura principal dos diferentes tipos de folhas analisadas em plantas de castanheiro micropropagadas e aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$. (A) Folha persistente (fP). (B) Folha um (f1). (C) Folha dois (f2). (D) Folha três (f3).*

***Fig. 3.15.** Cortes transversais ao nível do mesófilo dos diferentes tipos de folhas analisadas em plantas de castanheiro micropropagadas e aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$. (A) Folha persistente (fP). (B) Folha um (f1). (C) Folha dois (f2). (D) Folha três (f3).*

Fig. 3.16. Imagens ao MO da morfologia estomática em diferentes tipos de folhas de plantas de castanheiro micropropagadas e aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$. (A) Folha persistente (fP). (B) Folha um (f1). (C) Folha dois (f2). (D) Folha três (f3).

2.2. Indicadores quantitativos

2.2.1. Espessura da folha, espessura da nervura principal e cilindro vascular e número de células

A espessura da folha não foi influenciada significativamente pela concentração de CO₂ utilizada durante a aclimatização, independentemente do tipo de folha (Tab. 3.3).

Tabela 3.3. *Influência da concentração do CO₂ na espessura da folha, no diâmetro da nervura principal e diâmetro do cilindro vascular, no final da fase de aclimatização em plantas de castanheiro micropropagadas.*

CO ₂ (μL L ⁻¹)	Espessura (μm)	Nervura (μm)	Cilindro vascular (μm)
350	116,2 a	712,9 a	269,7 a
700	115,4 a	660,9 a	261,3 a

O desenvolvimento e conseqüente espessura da nervura principal, não mostrou ser afectada significativamente pelo parâmetro em estudo, não apresentando diferenças significativas entre os valores das plantas aclimatizadas a 350 μL L⁻¹ e as plantas aclimatizadas a 700 μL L⁻¹. Também o diâmetro do cilindro vascular apresentou comportamento semelhante, não havendo diferenças significativas entre as concentrações de CO₂ utilizadas (Tab. 3.3).

A análise dos resultados da influência da concentração de CO₂ sobre cada um dos tipos de folhas para cada um dos tratamentos de aclimatização, na espessura da folha, estão apresentados na Figura 3.17. Verifica-se que a concentração de CO₂ não influenciou significativamente este parâmetro, não havendo diferenças significativas entre o mesmo tipo de folha analisada para cada tratamento. As folhas persistentes, em ambos os tratamentos, apresentaram o valor médio de espessura mais baixo, com 75,0 μm para as folhas aclimatizadas na concentração mais baixa de CO₂ e 82,1 μm para as folhas aclimatizadas na concentração mais elevada de CO₂, salientando-se ainda que estes valores diferem significativamente das restantes folhas (Fig. 3.17).

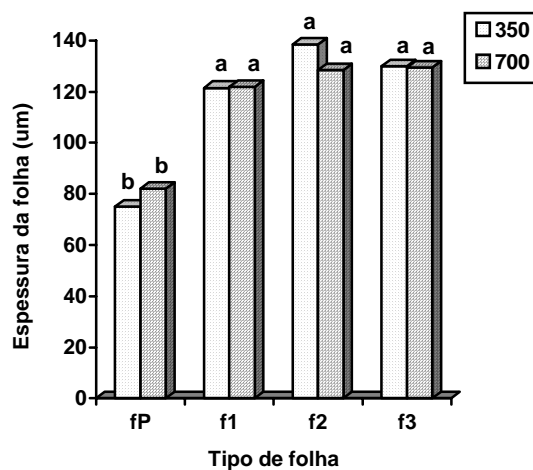


Figura 3.17. Efeito da concentração de CO_2 durante a fase de aclimatização de plantas de castanheiro micropropagadas, na espessura da folha para cada um dos tipos de folhas analisadas em cada um dos tratamentos.

Em relação ao diâmetro da nervura principal, este vai gradualmente aumentando nas folhas que se vão diferenciando ao longo da fase de aclimatização, havendo diferenças significativas entre todos os tipos de folha, embora não se tenham verificado diferenças significativas entre os tratamentos (Fig. 3.18).

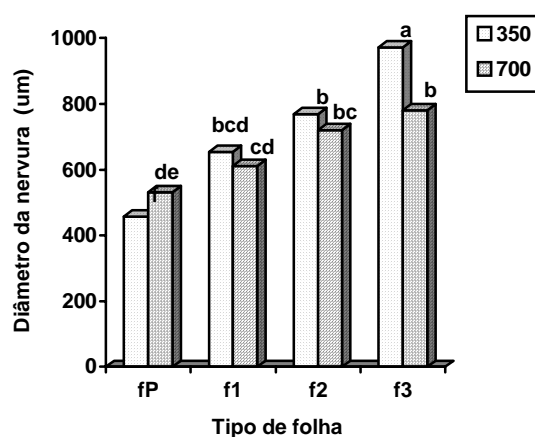


Figura 3.18. Efeito da concentração de CO_2 durante a fase de aclimatização de plantas de castanheiro micropropagadas, no diâmetro da nervura principal para cada um dos tipos de folhas analisadas em cada tratamento.

As folhas desenvolvidas no tratamento de $350 \mu\text{L L}^{-1}$, registaram sempre maior diâmetro da nervura principal no caso da folha um, folha dois e folha três em relação ao tratamento de $700 \mu\text{L L}^{-1}$, o que mostra uma influência positiva pelo regime de menor concentração de CO_2 (Fig. 3.18).

No caso do diâmetro do cilindro vascular é visível o acréscimo gradual do diâmetro ao longo da diferenciação das folhas, registando-se os valores médios de diâmetro mais elevados na folha três, em ambos os tratamentos, com $382,5 \mu\text{m}$ para as folhas das plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ e $333,9 \mu\text{m}$ para as folhas das plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 3.19).

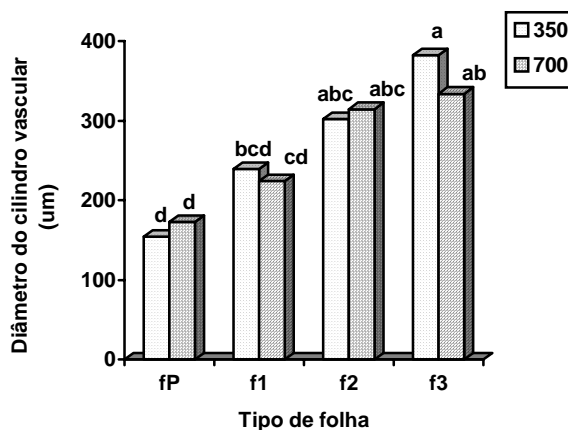


Figura 3.19. Efeito da concentração de CO_2 durante a fase de aclimatização de plantas de castanheiro micropropagadas, no diâmetro do cilindro vascular, para cada um dos tipos de folhas analisadas em cada tratamento.

Na Tabela 3.4 estão indicados os resultados obtidos da quantificação do número de células por unidade de comprimento, nos cortes transversais dos diferentes tipos de folhas analisadas. Verificou-se que a concentração de CO_2 provocou diferenças significativas neste parâmetro, tendo as folhas das plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ um valor médio de 29,8 células por $100 \mu\text{m}$ e as folhas das plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ uma média de 32,9 células por μm (Tab. 3.4). Fazendo a análise por tecido, verifica-se que estas diferenças se devem ao número de células do parênquima lacunoso que é significativamente diferente entre os dois tratamentos, não se registando diferenças

significativas entre a epiderme superior, parênquima em paliçada e epiderme inferior (Tab. 3.4).

Tabela 3.4. Influência da concentração de CO₂ durante a aclimatização de plantas de castanheiro micropropagadas, no número de células em 100 µm de comprimento de corte transversal da folha.

CO ₂ (µL L ⁻¹)	Ep. superior	P. paliçada	P. lacunoso	Ep. inferior	Total
350	4,7 a	8,1 a	10,8 b	6,2 a	29,8 b
700	4,7 a	8,2 a	13,7 a	6,3 a	32,9 a

Fazendo a análise com base no tipo de folha analisada verifica-se que o número de células é significativamente afectado entre as folhas persistentes e os restantes tipos de folhas, observando-se um decréscimo no número de células por área à medida que as novas folhas se vão diferenciando, embora não haja diferenças significativas entre as folhas um, dois e três. Verifica-se uma situação semelhante, fazendo a análise por tecido, em que as diferenças significativas situam-se ao nível da epiderme superior, parênquima em paliçada, parênquima lacunoso e epiderme inferior da folha persistente para as restantes folhas; em relação aos tecidos das folhas um, dois e três não se registam diferenças significativas no número de células dos tecidos (Tab. 3.5).

Tabela 3.5. Número de células em 100 µm de comprimento de corte transversal nos diferentes tipos de folhas e seus tecidos, no final da aclimatização de plantas de castanheiro micropropagadas.

Folha	Ep. superior	P. paliçada	P. lacunoso	Ep. Inferior	Total
FP	7,2 a	11,3 a	19,4 a	8,5 a	46,9 a
f1	4,1 b	6,9 b	10,1 b	5,3 b	26,4 b
f2	3,8 b	7,1 b	10,1 b	5,6 b	26,5 b
f3	3,8 b	7,3 b	9,3 b	5,7 b	26,1 b

Analisando a influência da concentração do CO₂ sobre o número de células total nos diferentes tipos de folha, para ambos os tratamentos, verifica-se que as folhas persistentes registaram um significativo acréscimo deste parâmetro que foi superior no caso das plantas aclimatizadas a 350 µL L⁻¹. Nas folhas um, dois e três não se registaram

diferenças significativas entre os tratamentos, mas as plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram sempre um maior número de células (Fig. 3.20).

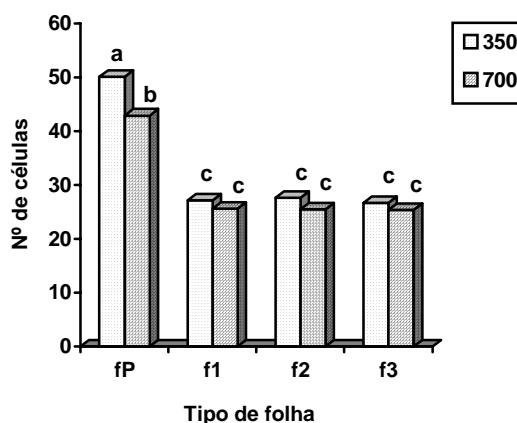


Figura 3.20. Efeito da concentração de CO_2 no número de células existentes em $100 \mu\text{m}$ de comprimento em corte transversal, para cada um dos tipos de folhas analisadas em cada tratamento de aclimatização.

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 registam-se na Tabela 3.6.

Tabela 3.6. Influência da concentração de CO_2 , no desenvolvimento de cada um dos tecidos constituintes da folha, no final da fase de aclimatização de plantas de castanheiro micropropagadas. Os valores apresentados referem-se à % de cada um em relação à espessura total da folha.

CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Ep. superior (%)	P. paliçada (%)	P. lacunoso (%)	Ep. inferior (%)
350	14,3 b	41,0 a	34,6 b	10,1 a
700	16,5 a	35,7 b	37,2 a	10,6 a

Analisando a Tabela 3.6 verificamos que apenas a epiderme inferior não mostra ser afectada pelo factor em estudo. No caso da epiderme superior e do parênquima lacunoso, além de se verificarem diferenças significativas entre as plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ e a $700 \mu\text{L L}^{-1}$, verifica-se também que a maior percentagem destes tecidos se localiza nas plantas aclimatizadas a maior concentração de CO_2 . No caso do parênquima em paliçada inverte-se a situação, apresentando a concentração mais baixa de CO_2 a maior percentagem deste tecido.

Os resultados obtidos em cada um dos tratamentos de aclimatização, independentemente, e sob o efeito das duas concentrações de CO_2 , estão representados na Figura 3.21.

Analisando o gráfico da Figura 3.21, facilmente nos apercebemos do progressivo acréscimo da % do parênquima em paliçada, e do conseqüente decréscimo da parênquima lacunoso à medida que as novas folhas se vão diferenciando. A epiderme superior apresenta diferenças mais significativas entre os dois tratamentos na folha dois e três, e a epiderme inferior praticamente não apresenta diferenças significativas.

A frequência estomática, expressa pelo número de estomas por mm^2 , determinada nas plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ e $700 \mu\text{L L}^{-1}$, foi influenciada pelo regime de CO_2 a que foram sujeitas durante a aclimatização (Tab. 3.7).

Analisando os resultados em função do tipo de folha, também se registam diferenças significativas, verificando-se uma progressiva redução da densidade estomática com o decorrer da aclimatização e de acordo com o desenvolver de novas folhas, com diferenças significativas logo para a folha um, comparativamente às folhas persistentes (Tab. 3.8).

Analisando a frequência estomática nos diferentes tipos de folhas para cada um dos tratamentos, verifica-se que na concentração de $700 \mu\text{L L}^{-1}$ ocorrem as mais altas frequências estomáticas em relação à concentração de $350 \mu\text{L L}^{-1}$. Estas diferenças significativas são notórias na folha persistente, folha um e folha dois, mas na folha três já não se registam diferenças (Fig. 3.22).

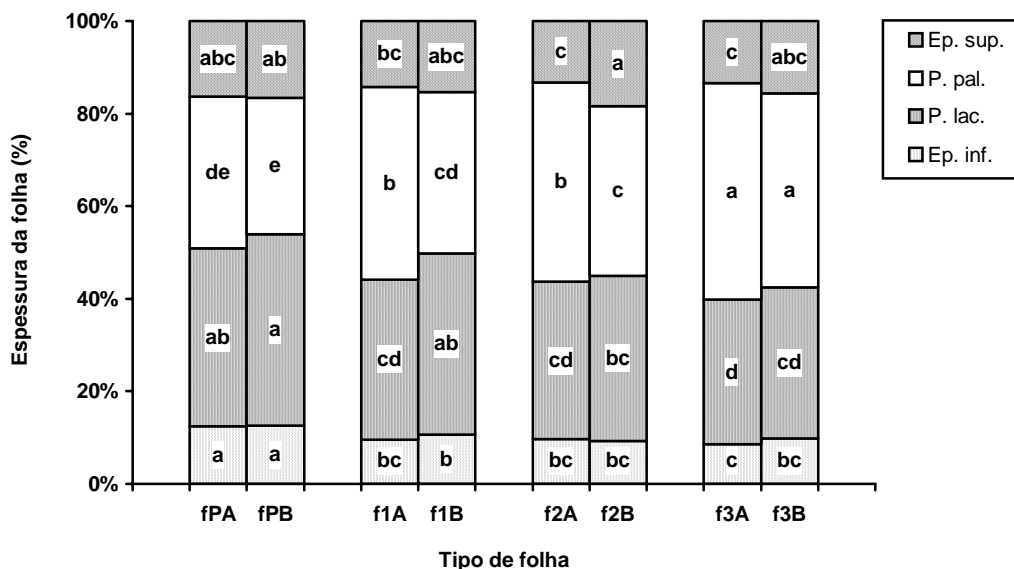


Figura 3.21. Espessura dos diferentes tecidos da folha, epiderme superior (ep. sup.), parênquima em paliçada (p. pal.), parênquima lacunoso (p. lac.) e epiderme inferior (ep. inf.), indicada em % da espessura total da folha, para cada um dos tipos de folha analisada. Plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ (A) e $700 \mu\text{L L}^{-1}$ (B). Comparação múltipla de médias feita entre cada tecido.

Tabela 3.7. Influência da concentração de CO_2 na frequência estomática, em cada tratamento de aclimatização.

CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Frequência estomática
350	291,1 b
700	345,6 a

Tabela 3.8. Influência da concentração de CO_2 na frequência estomática, nos diferentes tipos de folhas analisadas em cada tratamento.

Folha	Frequência estomática
fP	463,6 a
f1	328,3 b
f2	260,5 c
f3	229,2 d

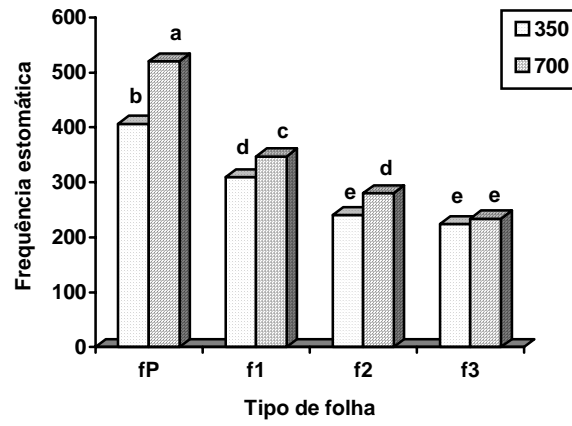


Figura 3.22. Efeito da concentração de CO₂, na frequência estomática (mm²), para cada um dos tipos de folhas analisadas em cada tratamento de aclimatização.

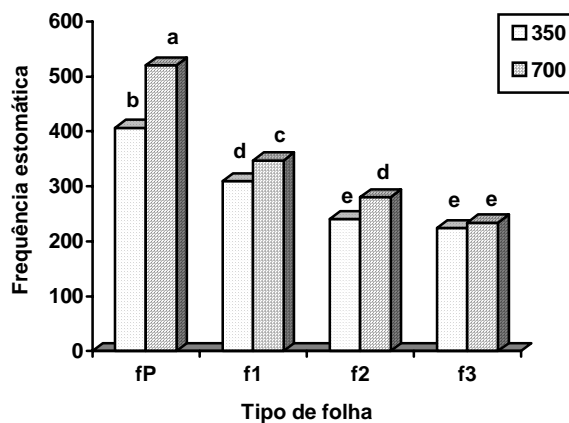


Figura 3.22. Efeito da concentração de CO_2 , na frequência estomática (mm^2), para cada um dos tipos de folhas analisadas em cada tratamento de aclimatização.

3. 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 3.2.3. do capítulo II.

Os resultados dessas determinações são apresentados na Tabela 3.9, onde se avalia a influência da concentração de CO_2 na concentração de Cl_a , Cl_b e Cl_{total} em $mg\ g^{-1}\ ps$, e na razão Cl_a/Cl_b . Na Tabela 3.10 é avaliada a concentração de Cl_a , Cl_b e Cl_{total} em $mg\ g^{-2}$. Na Figura 3.23A pode verificar-se, para cada um dos tratamentos de aclimatização, a influência da concentração de CO_2 em cada um dos tipos de folhas analisadas.

Tabela 3.9. Influência da concentração de CO_2 ($\mu L\ L^{-1}$) na concentração de Cl_a , Cl_b e Cl_{total} e razão Cl_a/Cl_b , no final da fase da aclimatização.

CO_2 ($\mu L\ L^{-1}$)	Cl_a ($mg\ g^{-1}\ ps$)	Cl_b ($mg\ g^{-1}\ ps$)	Cl_{total} ($mg\ g^{-1}\ ps$)	Razão Cl_a/Cl_b
350	6,85 a	4,13 a	10,97 a	1,73 b
700	5,18 b	1,56 b	6,74 b	3,84 a

Tabela 3.10. Influência da concentração de CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$) na concentração de Cl_a , Cl_b e Cl_{total} , no final da fase da aclimatização.

CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Cl_a (mg m^{-2})	Cl_b (mg m^{-2})	Cl_{total} (mg m^{-2})
350	223,78 a	134,60 a	358,28 a
700	168,78 b	50,30 b	219,03 b

Para todos os parâmetros em análise (Cl_a , Cl_b , Cl_{total} e razão Cl_a/Cl_b) verificaram-se efeitos significativos da concentração de CO_2 utilizada na aclimatização. As plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ foram as que apresentaram concentrações mais elevadas de Cl_a , Cl_b e Cl_{total} (Tab.3.10) mas razão Cl_a/Cl_b significativamente inferior relativamente às plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tab. 3.9).

A análise da influência da concentração de CO_2 , para cada um dos tipos de folhas analisadas (Figura 3.23A e B), permite avaliar mais em detalhe a variação das concentrações de clorofilas. O valor médio mais elevado registou-se na folha dois, com $246,6 \text{ mg m}^{-2}$ para as plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ e $206,2 \text{ mg m}^{-2}$ para as plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 3.23A). Em ambos os tratamentos de aclimatização verifica-se um acréscimo da concentração de Cl_a ao longo da diferenciação de novas folhas, registando-se um decréscimo na folha três (Fig. 3.23A e B).

Para a clorofila a, expressa em mg g^{-1} ps, verificam-se diferenças significativas na concentração desta clorofila, em função do tratamento e do tipo de folha analisada (Fig. 3.23B). O valor médio mais elevado foi registado nas folhas um e dois, com $7,45 \text{ mg g}^{-1}$ ps (nas plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$) e $7,47 \text{ mg g}^{-1}$ ps (nas plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$), respectivamente. Há ainda a registar o gradual acréscimo desta clorofila das folhas persistentes até à folha dois e o ligeiro decréscimo na folha três, em ambos os tratamentos (Fig. 3.23A e B).

Para a clorofila b (Cl_b), expressa em mg m^{-2} , verifica-se que a concentração de CO_2 utilizada influenciou significativamente este parâmetro (Fig. 3.24A e B). Os valores das concentrações da Cl_b (em mg m^{-2}) das plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ são

significativamente superiores aos das plantas aclimatizadas na concentração de $700 \mu\text{L L}^{-1}$, em qualquer das folhas analisadas (Fig. 3.24A).

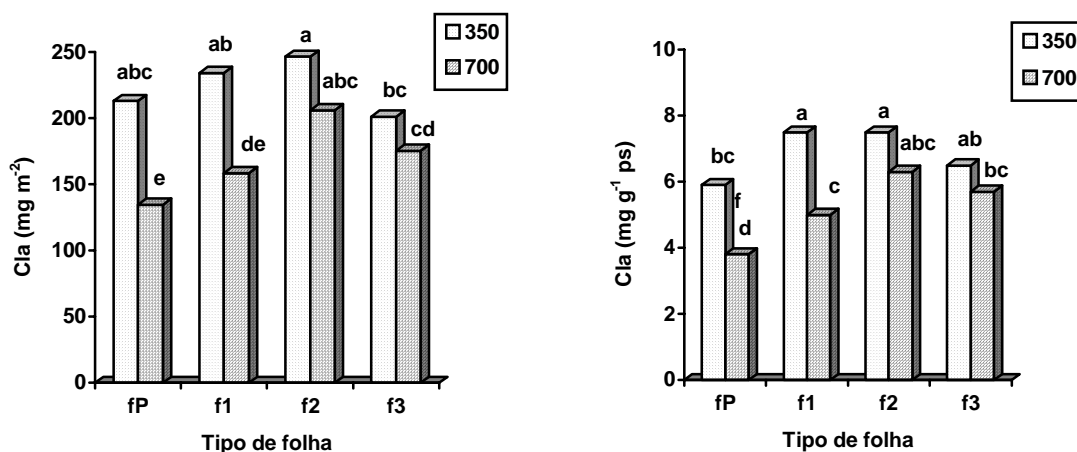


Figura 3.23. Efeito do nível de CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$) nas concentrações de clorofila a (Cl_a), para cada um dos tipos de folha analisada em cada tratamento de aclimatização, expressas por área (A) e por peso seco (B).

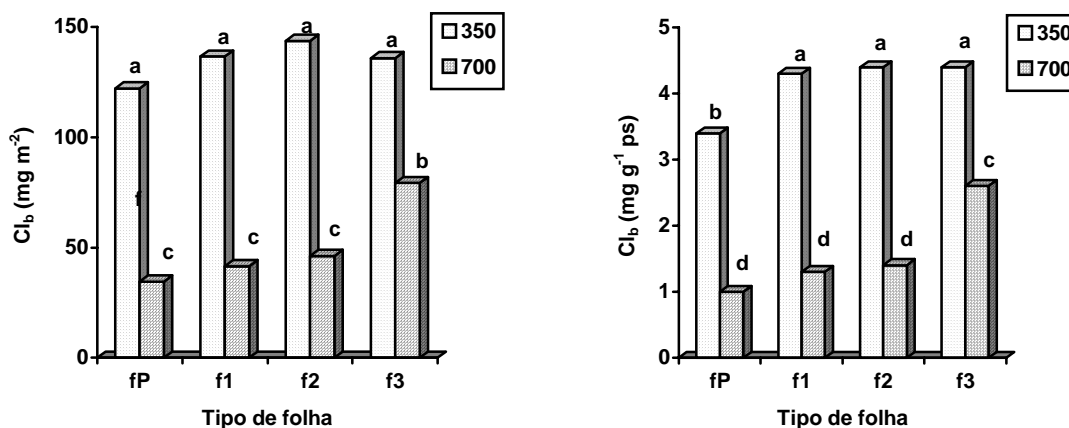


Figura 3.24. Efeito do nível de CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$) nas concentrações de clorofila b (Cl_b), para cada um dos tipos de folha analisada em cada tratamento de aclimatização, expressas por área (A) e por peso seco (B).

Verifica-se também um acréscimo da concentração da Cl_a ao longo da diferenciação das folhas em ambos os tratamentos, à exceção da folha três aclimatizada

a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ que apresenta um valor ligeiramente inferior ao das folhas diferenciadas anteriormente (Fig. 3.24A e B).

Para a Cl_b , expressa em mg g^{-1} ps a situação foi idêntica à ocorrida para a Cl_b , expressa em mg m^{-2} (Fig. 3.24B).

A concentração de clorofila total reflecte, conseqüentemente, o padrão de variação conjunto das concentrações de Cl_a e Cl_b em função do tratamento de aclimatização, e do tipo de folha analisada. Em relação à clorofila total expressa em mg m^{-2} , verifica-se que o valor médio mais elevado nas plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ foi de $390,2 \text{ mg m}^{-2}$ e registado na folha três, diferindo de forma significativa das restantes folhas; nas plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$, o valor médio mais elevado registou-se na folha três, embora não diferindo da folha dois mas diferindo significativamente das restantes (Fig. 3.25).

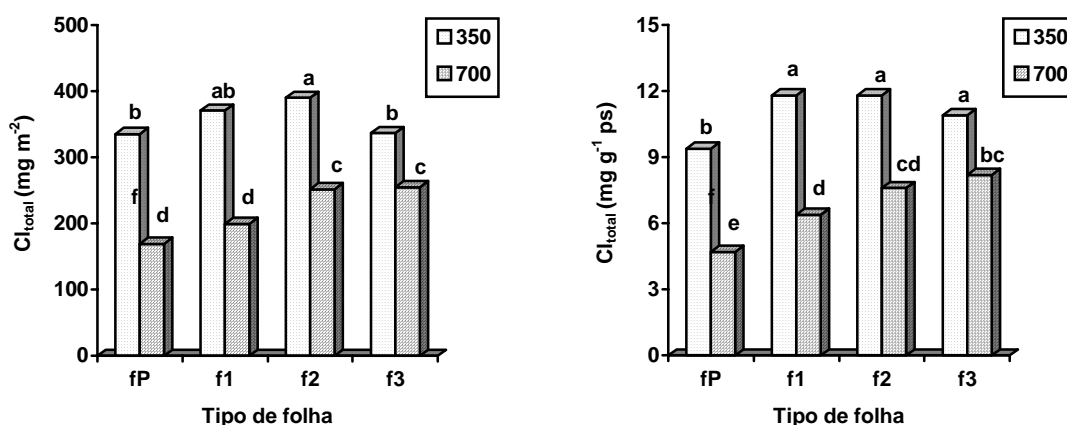


Figura 3.25. Efeito do nível de CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$) nas concentrações de clorofila_{total} (Cl_t), para cada um dos tipos de folha analisada em cada tratamento de aclimatização expressas por área (A) e por peso seco (B).

Verifica-se também que a clorofila total, expressa em mg m^{-2} , vai aumentando significativamente ao longo da diferenciação das folhas, da persistente para a folha dois, no caso das plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ e decrescendo significativamente na folha três (Fig. 3.25A). Nas plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ o acréscimo ao longo da diferenciação das folhas também é visível, embora na folha persistente e folha um o

acrécimo não seja significativamente diferente, bem como na folha dois e três (Fig. 3.25A).

No caso da clorofila total, expressa em mg g^{-1} ps, verificou-se nas plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ que os valores registados na folha um, dois e três não diferem significativamente, embora sejam significativamente diferentes da folha persistente (Fig. 3.25B). No caso das plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$, verificam-se significativos acréscimos ao longo da diferenciação das folhas (Fig. 3.25B). Em relação aos dois tratamentos há a salientar o facto das plantas aclimatizadas na concentração de CO_2 a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ registarem os valores mais baixos de clorofila total (Fig. 3.25A e B).

Na razão Cl_a/Cl_b registaram-se valores mais elevados nas folhas sujeitas a maior concentração de CO_2 durante a aclimatização (Fig. 3.26). Nas plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ os valores da razão Cl_a/Cl_b não mostraram qualquer diferença significativa em função do tipo de folha analisada, tendo os valores oscilado entre 1,6 para a folha três e 1,8 para a folha persistente e folha um. Nas plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ também não ocorreram diferenças significativas entre as folhas persistente, um e dois, embora o valor da folha três seja significativamente diferente das restantes (Fig. 3.26).

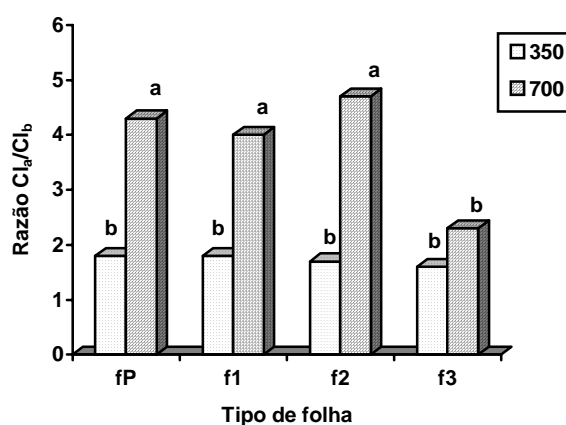


Figura 3.26. Efeito do nível de CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$) na razão Cl_a/Cl_b , para cada um dos tipos de folha analisada em cada um dos tratamentos de aclimatização.

4. FOTOSSÍNTESE

4.1. 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 na folha um ($f1$), folha dois ($f2$) e folha três ($f3$), após os tratamentos de aclimatização, com concentração de CO_2 a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ e a $700 \mu\text{L L}^{-1}$.

Na Tabela 3.11 estão indicados os resultados obtidos na taxa de fotossíntese aparente, transpiração e condutância estomática, para as microplantas de cada um dos tratamentos no final da fase de aclimatização.

Para a taxa de fotossíntese aparente não se registaram diferenças significativas entre os tratamentos, pelo que a concentração de CO_2 não influenciou este parâmetro (Tab. 3.11).

Tabela 3.11. Influência da concentração de CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$) na taxa de fotossíntese aparente (A), taxa de transpiração (E) e condutância estomática (G), quantificados na folha um ($f1$), folha dois ($f2$) e folha três ($f3$) dos respectivos tratamentos, no final da fase de aclimatização.

CO_2	A	E	G
($\mu\text{L L}^{-1}$)	($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
350	4,93 a	0,13 b	1,72 b
700	4,72 a	0,31 a	2,52 a

Para a taxa de fotossíntese aparente não se registaram diferenças significativas entre os tratamentos, pelo que a concentração de CO_2 não influenciou este parâmetro.

No caso da taxa de transpiração e da condutância estomática verificaram-se diferenças significativas entre os dois tratamentos de aclimatização. Os valores mais elevados destes dois parâmetros foram registados na concentração de $700 \mu\text{L L}^{-1}$, com $0,31 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de taxa de transpiração e $2,52$ de condutância estomática, diferindo significativamente dos valores apresentados pela concentração de $350 \mu\text{L L}^{-1}$, $0,13$ e $1,72 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente (Tab. 3.11).

Na Figura 3.27 apresentam-se os valores da taxa de fotossíntese aparente, transpiração e condutância estomática, para as microplantas de cada um dos tratamentos no final da fase de aclimatização, avaliando o comportamento de cada tipo de folha.

Pela análise da Fig. 3.27A, pode-se verificar que as mais baixas taxas de fotossíntese aparente ocorreram na folha um, independentemente do regime de CO₂ a que estiveram sujeitas durante a aclimatização, com 3,9 $\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ para as plantas do regime de CO₂ a 350 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 4,1 $\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ para as do regime de 700 $\mu\text{L L}^{-1}$. Também se pode constatar o acréscimo na taxa de fotossíntese aparente na sequência da diferenciação foliar, da folha um para a folha dois, quer nas plantas aclimatizadas a 350 $\mu\text{L L}^{-1}$, quer nas plantas aclimatizadas a 700 $\mu\text{L L}^{-1}$. Entre as folhas dois e três, em ambos os tratamentos, embora haja acréscimos na taxa de fotossíntese aparente, estes valores não são significativos (Fig. 3.27A).

Na taxa de transpiração os valores mais elevados ocorreram na concentração mais elevada de CO₂, diferindo significativamente dos valores do tratamento de 350 $\mu\text{L L}^{-1}$. Nas plantas aclimatizadas a 350 $\mu\text{L L}^{-1}$ não se registaram diferenças significativas entre os valores da taxa de transpiração para cada tipo de folha (Fig. 3.27B).

A condutância estomática foi significativamente diferente entre os dois tratamentos em todos os tipos de folhas, mostrando haver influência da concentração de CO₂ neste parâmetro. Em todos os tipos de folhas, os valores mais elevados registaram-se na concentração de 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 3.27C).

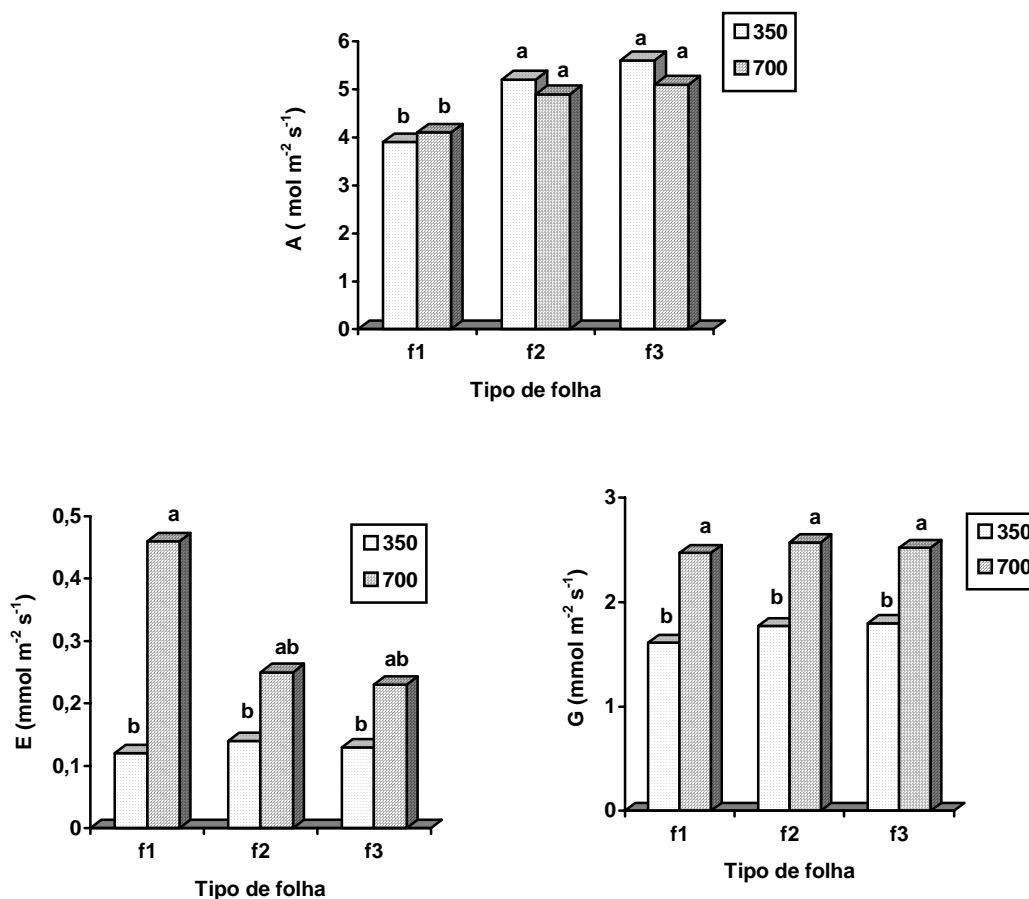


Figura 3.27. Efeito da concentração de CO₂ na taxa de fotossíntese aparente (A), taxa de transpiração (B) e condutância estomática (C), quantificados na folha um (f1), folha dois (f2) e folha três (f3) dos respectivos tratamentos, no final da fase de aclimatização., para cada um dos tipos de folhas analisadas.

4.2. Curvas de resposta à luz e capacidade fotossintética

As curvas de resposta à luz foram calculadas nas folhas persistentes (fP), na folha dois (f2) e folha três (f3), das plantas aclimatizadas nas duas concentrações de CO₂, 350 e 700 μL L⁻¹.

As curvas de resposta da taxa de fotossíntese em função da densidade de fluxo fotónico (PPFD), medida a CO_2 saturante, apresentadas nas Figuras 3.28 e 3.29, 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.

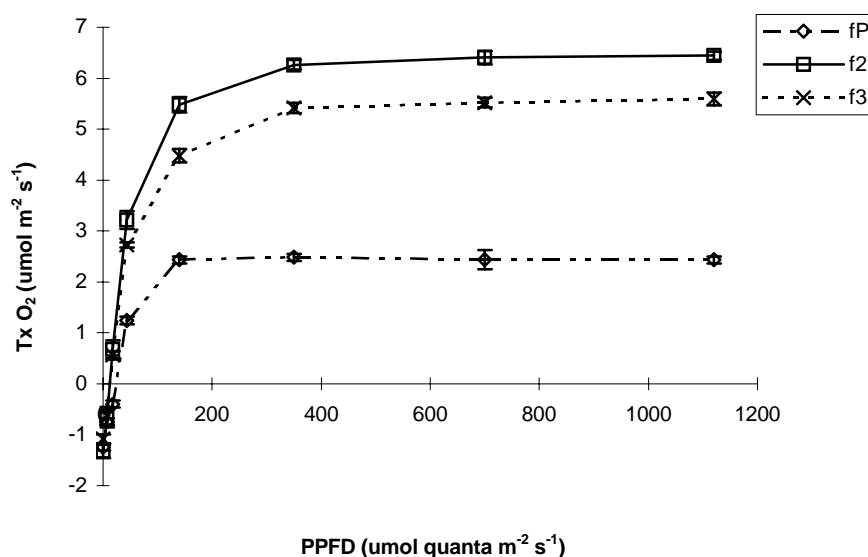


Figura 3.28. Curvas de resposta à irradiância da taxa de libertação de O_2 , medida a 25°C e CO_2 saturante, em discos foliares dos diferentes tipos de folhas analisadas (fP, f2 e f3), de plantas de castanheiro com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$, após 4 semanas de aclimatização. Os valores representam médias \pm erro padrão de três repetições.

Verifica-se nas folhas persistentes uma reduzida capacidade fotossintética em qualquer dos tratamentos, não só em termos de rápida saturação, que é atingida a baixos níveis de PPFD a que se submeteram, entre 100 e 200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para as plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ e de 200 a 400 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para as plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$, como também o valor de A_{max} que apresentaram, não ultrapassando $3,66 \pm 0,10 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ e $6,31 \pm 0,17 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$.

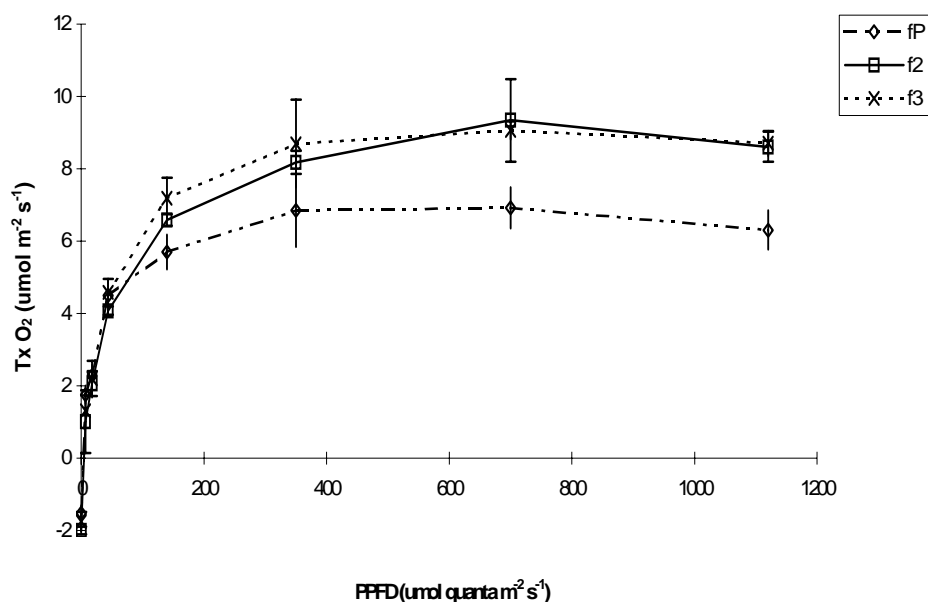


Figura 3.29. Curvas de resposta à irradiância da taxa de liberação de O₂, medida a 25 °C e CO₂ saturante, em discos foliares dos diferentes tipos de folhas analisadas (fP, f2 e f3), de plantas de castanheiro com enraizamento in vitro e aclimatizadas a 700 μL L⁻¹, após 4 semanas de aclimatização. Os valores representam médias ± erro padrão de três repetições.

No caso das folhas dois e três, a saturação da fotossíntese na taxa de liberação de O₂ verifica-se a níveis de irradiância mais elevados, entre 300 e 400 μmol m⁻² s⁻¹, nas plantas aclimatizadas a 350 μL L⁻¹ e 500 e 600 μmol m⁻² s⁻¹, nas plantas aclimatizadas a 700 μL L⁻¹

As curvas de resposta à luz das folhas dois e três, das plantas aclimatizadas a 700 μL L⁻¹ apresentam um comportamento diferente das plantas aclimatizadas a mais baixa concentração de CO₂. No caso das plantas aclimatizadas a 350 μL L⁻¹, a folha dois apresenta sempre valores superiores ao da folha três (Fig. 3.28). Nas plantas aclimatizadas a 700 μL L⁻¹, verifica-se uma 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 (Fig. 3.29).

Estes aspectos são apoiados pela análise dos valores estimados para as taxas de fotossíntese a luz saturante (A_{max}), calculados com base no ajustamento da recta de regressão não linear, às curvas de resposta à densidade de fluxo fotónico

fotossinteticamente activo (PPFD), para os diferentes tipos de folhas em cada um dos tratamentos (Tab. 3.12).

Tabela 3.12. 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.

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	FP	f2	f3
350	3,66 ± 0,10	7,99 ± 0,11	6,95 ± 0,15
700	6,31 ± 0,17	11,89 ± 0,78	11,31 ± 0,90

As folhas persistentes, em cada tratamento, apresentam valores inferiores aos registados na folha dois e três, com diferenciação e expansão já em condições de aclimatização. Em ambos os tratamentos, a folha dois apresentou sempre valores superiores em relação à folha três, o que não será de estranhar face à diferença de tempo de desenvolvimento para com a folha dois. As plantas aclimatizadas a 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram uma melhor capacidade fotossintética, independentemente do tipo de folha, comparativamente às plantas aclimatizadas a 350 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Tab. 3.12). Neste grupo de plantas também é visível a sua melhor capacidade de resposta face a níveis de irradiância mais elevados, pois a saturação ocorre próximo dos 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

4.3. Rendimento quântico

Os valores do rendimento quântico, dados pelo valor do declive da recta de regressão na fase linear entre a taxa fotossintética e a densidade de fluxo fotónico, e que traduzem a eficiência da conversão da energia luminosa em energia química na fotossíntese, estão referidos na Tabela 3.13, juntamente 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 três, independentemente do tratamento (Tab. 3.13).

Tabela 3.13. 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.

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	FP	f2	f3
350	0,0249 $y = -0,7863 + 0,0249x$ $r^2 = 0,86$	0,0461 $y = -0,4538 + 0,0461x$ $r^2 = 0,86$	0,0379 $y = -0,3748 + 0,0379x$ $r^2 = 0,85$
700	0,0845 $y = -0,1514 + 0,0845x$ $r^2 = 0,76$	0,1215 $y = -0,8286 + 0,1215x$ $r^2 = 0,81$	0,1259 $y = -0,5878 + 0,1259x$ $r^2 = 0,84$

A eficiência das folhas dois e três, determinada para cada um dos tratamentos, apresentou valores muito semelhantes, traduzindo a rápida adaptação fisiológica das folhas três, apesar de um menor tempo de diferenciação, comparativamente ao das folhas dois.

Tal como já se verificou para a A_{max} , o rendimento quântico das plantas aclimatizadas a 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ é muito superior ao das plantas submetidas a menor concentração de CO₂, em qualquer dos tipos de folhas (Tab. 3.13).

O valor de maior eficiência fotoquímica foi registado na folha três das plantas aclimatizadas a maior concentração de CO₂, 0,1259 $\mu\text{mol O}_2 / \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tab. 3.13).

4.4. Ponto de compensação para a luz

Os valores do ponto de compensação para a luz estão apresentados na Tabela 3.14. Este parâmetro que traduz o valor da irradiância para o qual a quantidade de CO₂ fixada iguala a que é libertada pela actividade respiratória, apresenta uma tendência de diminuição das folhas dois para as folhas três, em ambos os tratamentos, traduzindo assim a maior capacidade de aproveitamento da radiação luminosa por parte destas folhas (Tab. 3.14).

Tabela 3.14. Valores do ponto de compensação para a luz, I_0 ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para as folhas persistentes (fP), folha dois (f2) e folha três (f3) no final dos tratamentos de aclimatização em plantas de castanheiro micropropagadas.

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f2	f3
350	35,5	9,8	9,8
700	1,8	6,8	4,7

5. PROTEÍNA SOLÚVEL TOTAL

As concentrações de proteína solúvel total foram determinadas de acordo com o descrito no ponto 3.2.5. do capítulo II.

Os resultados dessas determinações são apresentados na Tabela 3.15, onde se avalia o parâmetro em estudo, para cada um dos tratamentos de aclimatização.

Tabela 3.15. Influência da concentração de CO₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$), na concentração de proteína solúvel, no final da fase de aclimatização.

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Proteína solúvel (mg g ⁻¹ ps)
350	11,43 a
700	11,32 a

Este parâmetro não foi influenciado pela concentração de CO₂ utilizado durante a fase de aclimatização, uma vez que não se registaram diferenças significativas entre os dois tratamentos (Tab. 3.15), pelo que as plantas aclimatizadas a 350 e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ parecem apresentar a mesma capacidade de síntese e armazenamento de proteína nos tecidos foliares.

Avaliando a variação da concentração de proteína solúvel total em cada um dos tipos de folhas analisadas (Fig. 3.30), verifica-se que a folha persistente e a folha dois apresentam valores superiores na concentração de 350 $\mu\text{L L}^{-1}$, embora as diferenças sejam pouco significativas. Comportamento inverso mostram as folhas um e três, mas apenas a folha um apresenta um valor significativamente diferente (Fig. 3.30).

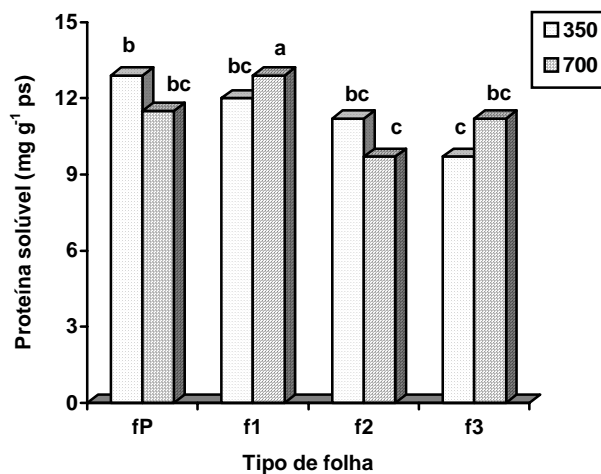


Figura 3.30. Efeito da concentração de CO_2 ($\mu L L^{-1}$) na concentração de proteína solúvel total, em cada um dos tratamentos de aclimatização para cada um dos tipos de folhas analisadas.

Na Figura 3.31, estão apresentados alguns aspectos relacionados com a fase de aclimatização dos rebentos de castanheiro micropropagados *in vitro*.

Figura 3.31. Aspectos de plantas de castanheiro micropropagadas durante a fase de aclimatização. (A) Plantas aclimatizadas com CO₂ ambiental (350 μL L⁻¹). (B) Plantas aclimatizadas a CO₂ elevado (700 μL L⁻¹). (C) Plantas no fitoclima de aclimatização a CO₂ elevado.

1. Análise de crescimento

O crescimento de plantas de castanheiro regeneradas *in vitro* durante a fase de aclimatização, foi significativamente influenciado pelo factor em estudo, em muitos parâmetros e índices quantificadores. Nas condições de maior concentração de CO₂, a 700 $\mu\text{L L}^{-1}$, registou-se um significativo acréscimo no crescimento relativo em altura (Fig. 3.1), na razão parte aérea / raiz (Fig. 3.3), na razão peso fresco parte aérea / raiz (Fig. 3.5), na área foliar específica (Fig. 3.11), na razão de área foliar (Tab. 3.1), e no diâmetro da raiz (Tab. 3.2), tendo as plantas submetidas a 350 $\mu\text{L L}^{-1}$ de CO₂ durante a aclimatização apresentado valores de crescimento superior no comprimento total da raiz, área radicular e volume de raiz.

As plantas aclimatizadas a 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram um maior crescimento relativo em altura, o que parece demonstrar um maior vigor por parte destas plantas. Este resultado é também apoiado pela razão de biomassa parte aérea/raiz (Fig. 3.2) que foi significativamente superior nas microplantas aclimatizadas a 700 $\mu\text{L L}^{-1}$, isto é, o acréscimo de biomassa foliar superou o acréscimo de biomassa da parte radicular. É de referir o relativo equilíbrio que as microplantas apresentam no dia zero de aclimatização. No entanto, em termos de biomassa total não se verificaram diferenças significativas entre os dois tratamentos, pelo que as microplantas aclimatizadas a 350 $\mu\text{L L}^{-1}$, não apresentando maior crescimento relativo, possuem idêntica biomassa total e uma razão de biomassa parte aérea / raiz menor, o que leva a concluir que o seu investimento foi mais direccionado para a parte radicular.

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. Entre os tratamentos não se registaram diferenças significativas, mas os acréscimos de biomassa radicular são significativamente diferentes do valor apresentado no dia zero de aclimatização, o que demonstra a funcionalidade do sistema radicular. Este facto permite

garantir a sobrevivência das microplantas pelo menos durante os primeiros dias de aclimatização. Muitos dos fotoassimilados deverão ser consumidos na formação de novas raízes para garantir essa sobrevivência, o que deverá condicionar a utilização dos fotoassimilados na formação de novas partes aéreas. A biomassa radicular não foi significativamente diferente entre os tratamentos, mas as plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram raízes com valores de comprimento total, área total de absorção e diâmetro médio significativamente maiores do que as plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$. Em termos de volume da raiz não apresentaram diferenças significativas.

Relativamente ao peso fresco não houve diferenças significativas a assinalar, no entanto a razão peso fresco da parte aérea/raiz mostrou-se estimulada pela maior concentração de CO_2 utilizada, formando maior número de estruturas novas, folhas e caules. Em termos de razão peso fresco/peso seco não houve alterações significativas entre os tratamentos.

Em relação à influência da concentração de CO_2 durante a aclimatização de espécies micropropagadas, alguns trabalhos têm vindo a ser publicados, fazendo referência aos efeitos positivos que este factor poderá ter no desenvolvimento vegetativo das microplantas. Assim, verifica-se também em *Ficus benjamina* cultivada a elevado CO_2 (de 600 a $1500 \mu\text{mol mol}^{-1}$) que as plantas são mais altas, mais fortes e possuem uma superfície foliar mais larga do que as plantas cultivadas em concentrações de CO_2 ambientais (Papenhagen, 1983). Nesta cultivar de *Ficus benjamina* a concentração de CO_2 e a irradiância têm significativo efeito no peso fresco do rebento, no peso fresco da raiz e na área da folha. O aumento da concentração de CO_2 a baixo nível de PPF não aumentou o crescimento de *Ficus benjamina*. Um efeito similar também foi encontrado em microestacas de *Rosa*, no seu crescimento *ex vitro* (Matysiak *et al.*, 1997). Aumentar o CO_2 , acelera o desenvolvimento destas plantas mas apenas a alto nível de PPF. Isto também foi demonstrado em outras ornamentais, como por exemplo, *Anthurium x cultorum*, *Dieffenbachia*, *Spathiphyllum wallisii*, para além do respectivo aumento de qualidade (Matysiak, 1996) e *Homalomena* (Matysiak & Nowak, 1994).

Para espécies com altas necessidades de luminosidade, o aumento da concentração de CO_2 pode não compensar a insuficiente intensidade de luz durante a aclimatização (Matysiak & Nowak, 1998). Tal facto, também se verificou em *Panicum laxum* (C_3), em que a elevada concentração de CO_2 mas com baixa irradiância, reduziu a

resposta dos rebentos e diminuiu o peso seco da raiz. O enriquecimento de CO₂ não permitiu nesta C₃ (*Panicum laxum*), um efeito significativo no peso da folha ou na concentração de hidratos de carbono, o que está em oposição com muitas espécies herbáceas (Farrar & Williams, 1991).

Em relação aos parâmetros de biomassa foliar e área foliar não se registaram acréscimos significativos (Fig. 3.7 e Fig. 3.10), apesar das plantas aclimatizadas a 700 µL L⁻¹ apresentarem valores superiores em especial de área foliar. Em relação ao dia zero o acréscimo na área foliar e biomassa foliar foi significativo para ambos os tratamentos; sendo este acréscimo consequência do aumento do número de folhas e não do desenvolvimento das folhas persistentes.

A área foliar específica (SLA), que traduz a razão entre a área das folhas e a sua biomassa, mostrou ser afectada pela concentração de CO₂ utilizada durante o enraizamento. As plantas aclimatizadas a 700 µL L⁻¹ apresentaram uma área foliar específica significativamente maior, podendo-se afirmar que o significativo aumento da área foliar destas microplantas foi acompanhado de respectivo aumento de peso. Nas plantas aclimatizadas a 350 µL L⁻¹, a expansão foliar não foi acompanhada de aumento de peso, pelo que se poderá admitir uma expansão foliar associada a um acréscimo de espaços celulares.

A taxa de crescimento relativo (RGR) que traduz o aumento de biomassa por unidade de biomassa pré-existente e por unidade de tempo ao longo da aclimatização, representa a eficiência da planta como produtora de novo material. Esta taxa apresentou valores médios superiores para as plantas sujeitas a maior concentração de CO₂, embora não significativos, o que pode ser explicado como consequência de um balanço de carbono favorável entre os ganhos fotossintéticos e as perdas respiratórias ao nível do caule e da raiz. O índice que poderá ter contribuído mais para este facto deve ter sido a razão de área foliar (LAR), uma vez que a variação na taxa líquida de assimilação (NAR) entre os tratamentos é pequena.

A razão de área foliar (LAR), 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 e Ricardo, 1983; Gonçalves, 1998). No caso do ensaio as plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram uma razão de área foliar significativamente maior, apresentando um aparelho com capacidade fotossintética relativamente maior, com grandes possibilidades de assimilação, o que não se verificou relativamente às plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$, já que a taxa líquida de assimilação (NAR), não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos.

O aumento de peso seco induzido pelo enriquecimento em CO_2 , é muitas vezes acompanhado pelo aumento desta taxa líquida de assimilação (NAR), pelo menos no curto prazo (Long, 1991). Contudo, este aumento da NAR pode desaparecer no longo prazo de exposição a elevada concentração de CO_2 . Isto verificou-se em *Prunus* (*Prunus avium* x *pseudocerasus*), após dez meses de crescimento a elevado CO_2 , a NAR não foi significativamente diferente das plantas que cresceram a CO_2 normal. Por outro lado, a área das folhas de *Prunus* a CO_2 elevado foi cerca de 87% mais elevada do que a área das folhas de plantas em CO_2 normal (Atkinson *et al.*, 1997).

Quanto à razão de peso foliar (LWR) que permite avaliar o investimento que a planta faz em biomassa foliar, proporcionalmente à biomassa das estruturas caulinares e radiculares não se registaram diferenças significativas entre os tratamentos.

2. Histologia e anatomia foliar

As folhas persistentes apresentaram uma reduzida espessura e uma diferenciação muito pouco nítida entre parênquima em paliçada e parênquima lacunoso (Fig. 3.13A e 3.15A). O parênquima em paliçada, está organizado numa só camada de células com forma ovóide, pouco alongadas. O parênquima lacunoso apresenta poucos espaços intercelulares e reduzido desenvolvimento vascular, que se pode observar através da organização da nervura principal (Fig. 3.12). Os tecidos de suporte, que conferem resistência mecânica ao nível da nervura principal, são praticamente inexistentes. Observações idênticas foram referidas por outros autores noutras espécies. Em

Liquidambar styraciflua as folhas formadas *in vitro* 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). 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.

No final do período de aclimatização, as folhas persistentes (*fP*), apresentam uma estrutura anatômica diferente. Verifica-se pois, um aumento do número de células a nível do mesófilo, com a conseqüente diminuição de espaços intercelulares, apesar de continuar a não se observar nítida diferenciação dorsiventral do mesófilo, ou seja, não houve diferenciação entre células do parênquima em paliçada e parênquima lacunoso. Estas alterações revelam uma capacidade de adaptação destas folhas às novas condições ambientais a que foram sujeitas.

Analisando as folhas desenvolvidas durante a fase de aclimatização, folha um, folha dois e folha três, verifica-se uma adaptação gradual das estruturas histológicas ao longo do decorrer do processo, de acordo com as novas condições, quer da concentração de CO₂ quer das progressivas reduções de humidade em que se foram desenvolvendo (Figuras 3.13 e 3.15).

As folhas novas, formadas no decorrer da fase de aclimatização, apresentaram características anatômicas bem desenvolvidas e que se traduziram por um aumento gradual de espessura do mesófilo (Fig. 3.13 e 3.15), do diâmetro da nervura principal e do diâmetro do cilindro vascular (Fig. 3.12 e 3.14), e um gradual acréscimo da espessura relativa do parênquima em paliçada com a conseqüente diminuição do parênquima lacunoso. Contudo, a organização destes tecidos continua ainda bastante diferente da que se regista em folhas de campo, continuando os espaços intercelulares ainda presentes em elevada proporção (Gonçalves *et al.*, 1998b). Isto foi demonstrado pelo acréscimo de espessura do parênquima em paliçada ao longo da diferenciação das folhas, sem ser acompanhado pelo respectivo acréscimo significativo do número de células (Tab. 3.4). 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. O parênquima em paliçada mostrou gradual modificação estrutural que se traduziu pela aproximação da forma das células a uma forma mais rectangular.

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 semelhantes 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.

Sabe-se 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.

A frequência estomática foi afectada pela concentração de CO₂ utilizada e ocorreram alterações significativas entre os diferentes tipos de folhas. As folhas persistentes exibiram uma densidade estomática elevada, apresentando-se com o ostíolo completamente aberto (Fig. 3.16A). 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 cada vez mais semelhante às observadas nas folhas de plantas crescendo em condições naturais. Este aspecto foi confirmado, nas folhas dois e três, em que se verificou uma aproximação às características morfológicas observadas nas folhas de plantas crescendo no campo (Gonçalves *et al.*, 1998a); diminuição da

frequência estomática, estomas mais elípticos, diferenciação nítida entre células guarda e células companheiras, ostíolo quase completamente fechado (Fig. 3.16C e D).

3. 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*. Em 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.

As concentrações de clorofilas foram significativamente diferentes nas plantas aclimatizadas a 350 e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$, verificando-se a maior concentração de Cl_a bem como de Cl_b e Cl_{total} no tratamento a 350 $\mu\text{L L}^{-1}$. No entanto, a razão de Cl_a/Cl_b foi significativamente superior nas plantas aclimatizadas a maior concentração de CO_2 .

São apontados valores de Cl_a/Cl_b de $2,85 \pm 0,09$ para espécies de sombra e de $3,50 \pm 0,15$ para espécies de sol (Boardman, 1977). No caso do ensaio, as plantas aclimatizadas a 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ e com a intensidade luminosa de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apresentaram uma razão de Cl_a/Cl_b de 3,84, muito semelhante às espécies de sol. Estas plantas parecem possuir 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.

As folhas formadas *in vitro* e que se mantiveram durante as fases de enraizamento e aclimatização, apresentaram capacidade de síntese de clorofila (Fig. 3.23A e B), apesar da sua funcionalidade ser muito limitada em termos de competência fotossintética. De facto, este tipo de folhas apresentaram as menores taxas de fotossíntese aparente e de capacidade fotossintética comparativamente aos valores registados para as folhas dois e três (Fig. 3.27A), apresentando também o menor valor de

PPFD a que ocorre saturação para a luz, entre 100 e 200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 3.28) para as plantas aclimatizadas a 350 $\mu\text{L L}^{-1}$, e de 200 a 400 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para as plantas aclimatizadas a 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 3.29). Estes resultados traduzem uma menor organização estrutural e, conseqüentemente funcional, do seu aparelho fotossintético.

Lees *et al.* (1991), verificaram em folhas de *Clematis* diferenciadas *in vitro*, a existência de clorofila fora dos centros de reacção e desorganização dos pigmentos fotossintéticos, a qual pode ser responsável pela baixa capacidade fotossintética das folhas desenvolvidas *in vitro* e posteriormente aclimatizadas, apesar de apresentarem elevadas concentrações de clorofila total. Também alguns autores sugerem uma possível inibição pela sacarose possa permanecer neste tipo de folhas, uma vez que pode haver inibição do ciclo de Calvin por “feedback” dos açúcares, tendo como resultado um fluxo excessivo de electrões nas membranas dos tilacóides que provocam fotoinibição e fotooxidação (Cappellades *et al.*, 1991; Dubé & Vidaver, 1992; Huylenbroeck *et al.*, 1995).

O comportamento das 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, ou seja, na ausência de folhas novas. Deverá ainda ter 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. Por este facto, o castanheiro deverá ser incluído dentro das espécies competentes, no que diz respeito ao comportamento das folhas persistentes.

As folhas dois e três, apresentaram valores significativamente superiores de taxa de fotossíntese aparente (A) (Fig. 3.27) em relação à folha um, mas não mostraram valores significativamente diferentes entre as folhas dois e três dos dois tratamentos. De facto, a taxa de fotossíntese aparente não se mostrou afectada pela concentração de CO_2 utilizada durante a aclimatização, apesar das plantas aclimatizadas a 700 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentarem uma capacidade fotossintética muito superior às plantas aclimatizadas a 350 $\mu\text{L L}^{-1}$, bem como uma eficiência superior de conversão de energia luminosa em energia química (rendimento quântico). Este facto leva-nos a crer que o aparelho fotossintético das plantas aclimatizadas a 700 $\mu\text{L L}^{-1}$, apesar de possuir elevada

capacidade fotossintética, está a ser subaproveitado. De facto, verifica-se ainda que a saturação da fotossíntese para estas plantas ocorre a valores superiores aos das plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$, respondendo positivamente ao acréscimo de PPFD, como adiante se refere.

Em relação à transpiração e condutância estomática, a concentração de CO_2 influenciou significativamente estes parâmetros, apresentando a concentração de $700 \mu\text{L L}^{-1}$, os valores mais elevados.

As folhas formadas *de novo* apresentaram uma saturação a uma intensidade luminosa superior ao registado para as folhas persistentes, sendo entre 300 e 400 para as plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 3.28) e entre 500 e 600 para as plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 3.29), bem como uma capacidade fotossintética muito superior ao das folhas persistentes (Tab. 3.12).

Dubé & Vidaver (1992) sugerem que um progressivo ganho fotossintético pode ser obtido por incrementos na intensidade da luz, mas segundo os mesmos autores, aumentos na intensidade de luz sem o correspondente incremento na concentração de CO_2 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).

Também as plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentam valores de rendimento quântico superiores em relação às plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tab. 3.13), o que traduz a melhor eficiência do aparelho fotossintético desenvolvido em condições de CO_2 elevado.

No que respeita ao ponto de compensação para a luz, as plantas aclimatizadas a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram valores mais baixos relativamente à concentração de $350 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tab. 3.14), registando-se na folha dois o valor superior ($6,8 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e baixando na folha três ($4,7 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Convém referir que o valor do ponto de compensação para a luz verificado nas folhas persistentes, deverá ser encarado com uma certa reserva, já que o valor do coeficiente de correlação da recta de regressão linear para determinação do rendimento quântico é de 76%. O mesmo deverá ser considerado para o valor do rendimento quântico aparente para as folhas persistentes, dado pelo declive da mesma recta de regressão linear.

Verificou-se nas plantas aclimatizadas a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ um decréscimo das folhas persistentes para as folhas dois e três, embora estas apresentem valores semelhantes de ponto de compensação para a luz.

Estes decréscimos nos valores dos pontos de compensação para a luz, bem como das folhas persistentes para as folhas diferenciadas posteriormente, traduz um ganho de funcionalidade do sistema fotossintético na sequência do acréscimo da concentração de CO_2 .

Pesquisa efectuada às respostas das plantas ao elevado CO_2 , foi primeiramente realizada nas espécies C_3 , visto que o seu metabolismo fotossintético e desenvolvimento são significativamente limitados pela concentração actual de CO_2 (Allen, 1990). No curto prazo, muitas C_3 apresentam um estímulo na fotossíntese (Eamus & Jarvis, 1989; Gifford, 1992) quando expostas a elevada concentração de CO_2 . Para algumas espécies altas taxas fotossintéticas foram mantidas a longo prazo de exposição a elevada concentração de CO_2 (Campbell *et al.*, 1990; Ziska *et al.*, 1990; Arp & Drake, 1991).

A exposição das plantas C_3 a elevado CO_2 , resulta num aumento imediato da taxa de assimilação de CO_2 ; contudo, a redução na capacidade fotossintética após longos períodos de exposição ao CO_2 ocorre muitas vezes (dias a semanas) (Stitt, 1991; Griffin & Seemann, 1996) e geralmente isto é acompanhado por um largo aumento de hidratos de carbono na folha. Em média, os açúcares solúveis da folha aumentam 52% e o teor de amido aumenta cerca de 160% (Long & Drake, 1992; Webber *et al.*, 1994). O desenvolvimento a CO_2 elevado pode também resultar num declínio da Rubisco, para mais de 60% (Sage *et al.*, 1989; Besford *et al.*, 1990; Rowland-Bamford *et al.*, 1991) e significativos decréscimos nos níveis de transcrição dos genes que codificam a pequena (*rbcS*) e a grande (*rbcL*) subunidade da Rubisco (Nie *et al.*, 1995a; Van Oosten & Besford, 1995).

Em *Arabidopsis thaliana* (L.) a elevado CO_2 , os níveis da Rubisco e do mRNA *rbcL* reduziram-se para 40%, enquanto que o mRNA *rbcS* reduziu-se para aproximadamente 60% (Cheng *et al.*, 1998).

O enriquecimento de CO_2 também não provocou efeito em *Panicum laxum*, onde obtiveram um decréscimo da concentração da Rubisco em paralelo com uma baixa taxa de fotossíntese, e uma acentuada redução na condutância estomática, o que é provável ser um efeito directo do CO_2 na abertura estomática (Ghannoum, 1997). No entanto, a

frequência estomática não diminuiu como acontece noutras espécies (Woodward, 1987; Clifford *et al.*, 1995).

4. Proteína solúvel total

As concentrações de proteína registadas após os tratamentos de aclimatização não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tab. 3.15), reflectindo a mesma capacidade de síntese. Neste parâmetro as folhas persistentes apresentaram os valores superiores no tratamento a $350 \mu\text{L L}^{-1}$, e no tratamento a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ as folhas um apresentaram valores superiores (Fig. 3.30).

Gonçalves (1998), obteve para plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância com CO_2 ambiental, valores de proteína solúvel total nas folhas persistentes muito superiores ao presente estudo, com $76,2 \pm 4,4 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$. No entanto, nas plantas aclimatizadas a irradiância menor ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) registou decréscimos acentuados no mesmo tipo de folha, com $40,2 \pm 3,4 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$.

Em videira, Rebordão (1994) refere que a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância, o teor de proteína decresce cerca de 50% em relação aos valores obtidos a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância, não verificando diferenças significativas resultantes do tipo de folha.

Na Tabela 3.16 apresentam-se os resultados mais significativos provocados pelo factor em estudo nas plantas de castanheiro regeneradas *in vitro* e registados no final da fase de aclimatização.

Tabela 3.16 Características das microplantas após a fase de aclimatização

CO ₂ (μL L ⁻¹)	Análise de crescimento	Estrutura interna	Clorofilas	Fotossíntese	Proteína
350	> comprimento total da raiz		+ Cl_a	< E	≈ Proteína
			+ Cl_b	< G	
	> área radicular		+ Cl_{total}	≈ A	
	> volume radicular		< Cl_a/Cl_b	< A_{max} < ϕ > I_0	
700	+ crescimento relativo	> n° células parênquima lacunoso	- Cl_a - Cl_b	> E > G ≈ A	≈ Proteína
	> aérea/raiz	> n° total de células	- Cl_{total}	> A_{max} > ϕ	
	+ peso fresco aéreo/raiz	> espessura: Ep. superior P. paliçada P. lacunoso Ep. inferior	> Cl_a/Cl_b	< I_0	
	> SLA	> frequência estomática			
	> LAR				
	> diâmetro da raiz				

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. No entanto, a sua área de distribuição tem vindo a diminuir, em parte pela problemática doença da tinta, mas também devido à gradual substituição por espécies de maior rentabilidade. Alguns trabalhos surgiram no sentido de obter híbridos resistentes ao fungo causador da doença da tinta, mas a propagação vegetativa destes clones híbridos apresenta dificuldades uma vez que esta espécie é difícil de enraizar por métodos convencionais. Assim sendo, a micropropagação surge como uma alternativa de extrema importância no sentido de permitir a multiplicação em larga escala de clones seleccionados pelas suas características. Neste contexto, este trabalho pretendeu abordar alguns aspectos de uma das fases mais críticas e limitantes de todo o processo de micropropagação.

No caso do castanheiro, a micropropagação por rebentamento axilar tem sido o método mais utilizado, envolvendo a cultura de explantes e a produção de rebentos que são induzidos a formar raízes adventícias, geralmente após estímulo auxínico. Estes rebentos enraizados serão aclimatizados e posteriormente plantados no campo. Este processo inclui assim, duas fases: uma primeira fase em condições artificiais, sob elevada humidade relativa, baixas intensidades luminosas, restrição de trocas gasosas e na presença de uma fonte de carbono assimilável; a segunda fase, aclimatização, é uma fase de progressiva aquisição da capacidade autotrófica das plantas regeneradas *in vitro* para posterior desenvolvimento e crescimento em condições naturais. Neste processo é determinante o controlo dos factores ambientais, luz, humidade, temperatura e níveis de CO₂.

Neste trabalho foi estudado o efeito da concentração de CO₂ na fase de aclimatização, tendo-se utilizado duas concentrações: 350 µL L⁻¹ e 700 µL L⁻¹. Para avaliar as plantas em termos de crescimento e desempenho fisiológico, foram quantificados parâmetros de crescimento, de anatomia e fisiologia foliar e de natureza fisiológica, como concentração de clorofilas, avaliação do desempenho fotossintético, concentração foliar de proteína. As microplantas aclimatizadas a 350 µL L⁻¹, apresentaram resposta significativamente superior em alguns parâmetros, tais como: maior comprimento total da raiz, maior área radicular, maior volume de raiz, maior

concentração de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila *total* e valor superior do ponto de compensação para a luz. As microplantas aclimatizadas a 700 $\mu\text{L L}^{-1}$, apresentaram resposta significativamente superior nos seguintes parâmetros: maior crescimento relativo, maior razão peso seco parte aérea/raiz, maior razão peso fresco parte aérea/raiz, maior área foliar específica (SLA), maior razão de área foliar (LAR), maior diâmetro da raiz, maior razão de clorofila *a*/clorofila *b*, maior taxa de transpiração (E), maior condutância estomática (G), valor superior da taxa de fotossíntese a luz saturante (A_{max}), maior rendimento quântico (ϕ), maior número de células do parênquima lacunoso, maior número de células total, maior espessura da epiderme superior, parênquima em paliçada, parênquima lacunoso e epiderme inferior e maior frequência estomática.

Contudo, até ao momento, os sinais metabólicos e os mecanismos bioquímicos/moleculares subjacentes a esta aclimatização a elevado CO_2 , ainda não são bem conhecidos. Compreender os mecanismos que determinam a resposta à quase certa duplicação do CO_2 no próximo século, é um passo de extrema importância a fim de se poder prever o impacto desta mudança nos ecossistemas terrestres.

Por último, pretende-se ainda fazer referência às condições de luminosidade a que as microplantas estiveram sujeitas, já que a baixa intensidade luminosa é frequentemente um factor limitante do crescimento e desenvolvimento. É conhecido o efeito estimulador do aumento da concentração de CO_2 na fotossíntese, mas associado a alto PPFD. Neste contexto, pensa-se que os ganhos obtidos com o uso de CO_2 poderão ser ainda mais significativos se for usada uma maior intensidade de luz, já que a saturação da fotossíntese na taxa de libertação de O_2 deste tipo de plantas se verificam a níveis entre 500 e 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Para efeitos de aplicação prática a utilização combinada de condições de enraizamento *ex vitro*, com acréscimos graduais na irradiância luminosa e CO_2 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 possível redução de custos indirectos e directos num sistema comercial de micropropagação de castanheiro.

- Alves, A.M., 1988. *Técnicas de Produção Florestal*. Instituto Nacional de Investigação Científica, Lisboa.
- Allen, L.H., 1990. Plant responses to rising carbon dioxide and potential interactions with air pollutants. *J. Environ. Qual.*, 19: 15-34.
- Ahuja, M.R. (ed.), 1993. *Micropropagation of Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 507 pp.
- Areses, M.R. & 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.
- Arnon, D.I., 1938. Micronutrients in culture-solution experiments with higher plants. *Ann. J. Bot.*, 25:322.
- Arp, W.J., 1991. Vegetation of a North American salt marsh and elevated carbon dioxide. Doctoral Thesis, Vrije Universiteit Amsterdam, the Netherlands.
- Arp, W.J. & Drake, B.G., 1991. Increased photosynthetic capacity of *Scirpus olneyi* after 4 years of exposure to elevated CO₂. *Plant Cell Environ*, 14: 1003-1006.
- Atkinson, C.J., Taylor, J.M., Wilkins, D. & Besford, R.T., 1997. Effects of elevated CO₂ on chloroplast components, gas exchange and growth of oak and cherry. *Tree Physiology*, 17: 319-325.
- Badger, M.R., Björkman, O. & Armond, P.A., 1982. An analysis of photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants: temperature acclimation in the desert evergreen *Nerium oleander* L. *Plant Cell and Envir.*, 5:85-89.
- Bartholomew, D.M., Bartley, G.E. & Scolnik, P.A., 1991. Abscisic acid control of *rbcS* and *cab* transcription in tomato leaves. *Plant Physiology*, 96: 291-296.
- Besford, R.T., Ludwig, L.J. & Withers, A.C., 1990. The green house effect: acclimation of tomato plants growing in high CO₂: photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase protein. *Jour. Exp. Bot.*, 41: 925-931.
- 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.
- Björkman, O. & Powles, S.B., 1984. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. *Planta*, 161:490-504.
- 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.
- 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.
- Borrod, G., 1971. *Contribution à l'étude des cultures in vitro des tissus de châtaignier*. C. R. Acad. Sci., Paris, 272: 56-58.
- Bowes, G., 1993. Facing the inevitable: plants and increasing atmospheric CO₂. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44:309-332.
- Bowler, C. Chua N-H, 1994. Emerging themes of plant signal transduction. *Plant Cell*, 6: 1529-1541.
- 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, mannitol, 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.
- Büßis, D. & Heineke, D., 1998. Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit. II. Contents and subcellular distribution of organic solutes. *J. Exp. Bot.*, 49:1361-1370.
- Campbell, W.J., Allen, L.H. Jr. & Bowes, G., 1990. Responses of soybean canopy photosynthesis to CO₂ concentration, light and temperature. *Jour. Exp. Bot.*, 41: 427-433.
- Cappellades, 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.
- Cappellades, M., Fontarnau, R., Carulla, C. & Debergh, P., 1990. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. *J. Amer. Hortic. 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.
- 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. 1-18. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht.
- Chandler, P.M. & Robertson, M., 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review of Plant Molecular Biology*, 45:113-141.

- Cheng, S., Brandon, M. & Seeman, R., 1998. Effects of short - and long-term elevated CO₂ on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Phys.*, 116:715-723.
- 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.
- Clifford, S.C. *et al.*, 1995. The effects of elevated atmospheric CO₂ and drought on stomatal frequency in groundnut (*Arachis hypogaea* (L.)). *Jour. Exp. Bot.*, 46: 847-852.
- 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. Ver.*, 6:120-154.
- Cournac, 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.
- Crespi, M.D., Zabaleta, Z.J., Pontis, H.G., Salerno, G.L., 1991. Sucrose synthase expression during cold acclimation in wheat. *Plant Physiol.*, 96:887-891.
- Critchley, C., 1988. The molecular mechanism of photoinhibition – Facts and fiction. *Aust. J. Plant Physiol.*, 15: 27-41.
- Cure, J.D., 1985. Carbon dioxide doubling responses: A crop survey. In: *Direct Effects of Increasing Carbon Dioxide on Vegetation*. Chap 5 DOE/ER – 238: pp 99-116. Department of Energy, Washington, DC, USA.
- Curtis, P.S., 1996. A meta-analysis of leaf gas exchange and nitrogen in trees grown under elevated carbon dioxide. *Plant Cell Environ*, 19: 127-137.
- Dale, 1988. The control of leaf expansion. *Ann.Rev. Plant Physiol.*, 39: 291-300.
- Davies, W.J. & Zhang, J., 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Ann. Rev. of Plant Phys. and Plant Molecular Biology*, 42: 55-76.
- Debergh, P.C. & Maene, L., 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.

- Demming, B. & Björkman, O., 1987. Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta*, 171:171-184.
- De Proft, M.P., Maene, L.J. & Debergh, P., 1985. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 65:375-379.
- Dermen, H. & Diller, J.D., 1962. Colchicoidy of chestnuts. *For. Sci.*, 8:43:50.
- 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.
- Dhindsa, R.S., Monory, A.F., Wolfraim, L.A. & Dong, D., 1993. Signal transduction and gene expression during cold acclimation of alfalfa. In PH Li, L. Christersson, (eds.), *Advances in Plant Cold Hardiness*. CRC, Boca Raton, FL, pp. 57-71.
- Diáz-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.
- Dietrich, B., Mertinat, H. & Luckner, M., 1992. Reduction of water loss during *ex vitro* acclimatization of micropropagated *Digitalis lanata* clone plants. *Biochemie und Physiologie 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. & Colbow, K., 1984. Fixation of ¹⁴CO₂ 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.
- Dubé, S.L. & Vidaver, W., 1992. Photosynthetic competence of plantlets grow *in vitro*. Na automated system for measurement of photosynthesis *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 84: 409-416.

- Economu, A.S. & Read, P.E., 1987. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. *HortScience*, 22: 751-754.
- 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.
- Farrar, J.F. & Williams, M.L., 1991. The effects of increased atmospheric carbon dioxide and temperature on carbon partitioning, source-sink relations and respiration. *Plant, Cell and Environment*, 14: 819-830.
- Eamus, D. & Jarvis, P.G., 1989. The direct effects of an increase in the global atmospheric CO₂ concentration on natural and commercial temperate trees and forests. *Adv. Ecol. Res.*, 19: 1-55.
- 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., 1982. O castanheiro e a nogueira. Sua importância do ponto de vista sócio-económico. *Revista de Ciências Agrárias*, V:113-142.
- Franco, S., 1971. *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*. Vol 1 – Lisboa.
- Fuchigami, L.H., Cheng, T. Y. & Soelner, A., 1981. Abaxial transpiration and water loss in aseptically 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 Publishers, Dordrecht.
- Fujiwara, K., Kozai, T. & Watanabe, I., 1987. Measurements 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.
- Gamborg, O.L.; Miller, R.A. & Ojima, K., 1968. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- George, E.F. & Sherrington, P.D., 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd., England. 710 pp.
- Ghannoum, O., Von Caemmerer, S., Barlow, E.W. R. & Conroy, J.P., 1997. The effect of CO₂ enrichment and irradiance on the growth, morphology and gas exchange of a C₃ (*Panicum laxum*) and a C₄ (*Panicum antidotale*) grass. *Aust. J. Plant Physiol.*, 24: 227-237.
- Gifford, R.M., 1992. Interaction of carbon dioxide with growth limiting environmental factors in vegetation productivity: implications for the global carbon cycle. *Advances in Bioclimatology*, 1: 24-58.

- Gonçalves, J.C., 1991. *Influência de alguns factores na micropropagação de castanheiro (Castanea Miller)*. Tese de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa (113 pp).
- Gonçalves, J.C., 1998. *Micropropagação de Castanheiro: Estudo das Fases de Enraizamento e Aclimatização*. Dissertação de Doutoramento, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 234 pp.
- Gonçalves, J.C., Amâncio, S. & Pereira, J.S., 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. Lumdsen, J. R. Nicholas & W. J. Davies (eds.), *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*, pp. 303-308. Kluwer Academic Pub., Dordrecht.
- Gonçalves, J.C.; Diogo, G. & Amâncio, S., 1998a. *In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa*): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Scientia Horticulturae*. 72: 265-275.
- Gonçalves, J.C.; Diogo, G., Coelho, M.T. & Amâncio, S., 1998b. Foliar morphology and anatomy changes of *in vitro*-cultured chestnut plantlets during acclimatization. *XXV International Horticultural Congress*. Bruxelas, Bélgica.
- Gonçalves, J.C.; Diogo, G., Coelho, M.T. & Amâncio, S., 1998c. Photosynthesis in micropropagated chestnuts during *in vivo* acclimatization. *IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture*. Jerusalem, Israel.
- Gonçalves, J.C.; Diogo, G., Coelho, M.T. & Amâncio, S., 1998d. Effect of rooting conditions on survival and growth during acclimatization of micropropagated chestnut plants (*Castanea sativa* x *C. crenata*). *The second International Chestnut Symposium*. Bordéus, França.
- Gray, G.R. *et al.*, 1997. Photosystem II excitation pressure and development of resistance to photoinhibition. II. Adjustment of photosynthetic capacity in winter wheat and winter rye. *Plant Physiol.*, 110: 61-71.
- Greenwood, M. S., 1986. Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regulation*, 6:1-12.
- Greer, D.H. & Hardacre, A.K., 1989. Photoinhibition of photosynthesis and its recovery in two maize hybrids varying in low temperature tolerance. *Aust. J. Plant Physiol.*, 16:189-198.
- Greshoff, P.M. & Doy, C.H., 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta*, 107:161-170.
- Griffin, K.L. & Seemann, J.R., 1996. Plants, CO₂ and photosynthesis in the 21st century. *Chemistry and Biology*, 3: 245:254.
- 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 Hortic.*, 230:129-135.
- Grout, B.W.W. & Aston, M.J., 1977. 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., 1978. Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. *Ann. Bot.*, 42:993-995.
- 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.
- Gunderson, C.A. & Wullschleger, S.D., 1994. Photosynthetic acclimation in trees to rising atmospheric CO₂: A broader perspective. *Photosynth.*, 39: 369-388.
- Guy, C.L., Huber, J.L., Huber, S.C., 1992. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiol.*, 100: 1105-1114.
- Heller, R., 1953. Recherches sur la nutrition minerale des tissues végétaux *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.*, 14:1-22.
- Hdider, C. & Desjardins, Y., 1994. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 36:27-33.
- Hogan, K.P., Smith, A.P. & Ziska, L.H., 1991. Potential effects of elevated CO₂ and changes in temperature on tropical plants. *Plant Cell Environ.*, 14: 763-778.
- Holaday, A.S., Martindale, W., Alred R., Brooks, A., Leegood, R.C., 1992. Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure to low temperature. *Plant Physiology*, 98:1105-1114.
- Hurry, V.M., Keeberg, O. Pärnik, T., Gardeström, P. & Öquist, G., 1995. Cold hardening results in increased activity of enzymes involved in carbon metabolism in leaves of winter rye (*Secale cereale* L.). *Planta*, 195:554-562.
- 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.
- Imai, K. & Okamoto-Sato, M., 1991. Effects of temperature on CO₂ dependence of gas exchanges in C₃ and C₄ crop plants. *Jpn. J. Crop Sci.*, 60: 139-145.
- 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.
- Instituto Nacional de Estatística, 1992. *Portugal Agrícola*, p.192. Lisboa.

- Instituto Nacional de Estatística, 1997. *Comércio Internacional*. Lisboa.
- Instituto Nacional de Estatística, 1997. *Estatísticas Agrícolas*, p.27. Lisboa.
- Jacquot, C., 1950. Sur la culture *in vitro* du tissue cambial du châtaigner (*Castanea vesca* Gaerth.). *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 tissue cambial d'essences forestières cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270: 493-495.
- Jaynes, R.A., 1976. New developments in chestnut research. In: *Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, pp. 305-310.
- Jaynes, R.A., 1962. Chestnut chromossomes. *For. Sci.*, 8:372-377.
- Jaynes, R.A., 1963. Male sterility in *Castanea*. *Proc. 11th Int. Cong. Genetics*, p.203 (abst.), The Hague.
- 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.
- Jung, S. & Steffen, K.L., 1997. Influence of photosynthetic photon flux densities before and during long-term chilling on xanthophyll cycle and chlorophyll fluorescence quenching in leaves of tomato (*Lycopersicon hirsutum*). *Physiologia Plantarum*, 100: 958-966.
- Kalina, J. & Ceulemans, R., 1997. Clonal differences in the response of dark and light reactions of photosynthesis to elevated atmospheric CO₂ in poplar. *Photosynthetica*, 33: 51-61.
- Keys, R.N. & Cech, F.C., 1981. Plantlet formation in American chestnut embryonic tissue *in vitro*. In: *Proc. of 2nd North and Central Trees Imp. Conf.*, pp. 189-194.
- Kozai, T., 1990. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: *Micropropagation, Technology and Application*. Debergh, P. C. and Zimmerman, R. H. (eds.), pp. 449-471. Kluwer Academic Publishers, 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., 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.
- Krammer, P.J., 1981. Carbon dioxide concentration, photosynthesis and dry matter production. *BioScience*, 31: 29-33.
- Kramer, P.J., 1983. *Water Relations of Plants*. Academic Press, New York. 500 pp.
- Krause, G.H., 1994. Photoinhibition induced by low temperatures. In: Baker, N. R., Bowyer, J. R. (Eds), *Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field*, Bios, Oxford, pp. 331-348.
- Kubota, C. & Kozai, T., 1992. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum* *in vitro* under forced and natural ventilation. *HortScience*, 27: 1312-1314.
- 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. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 11: 634-638.
- Langford, P.J. & Wainwright, H., 1987. Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. *Ann. Bot.*, 60:633-640.
- Lauer, M.J. & Boyer, J.S., 1992. Internal CO₂ measured directly in leaves. *Plant Physiol.*, 98:1310-1316.
- Lawlor, D.W., Boyle F.A., Kendall, A.C. & Keys, A.J., 1987. Nitrate nutrition and temperature effects on wheat: Enzyme composition, nitrate and total amino acid content of leaves. *Journal of Experimental Botany*, 38: 378-392.
- Leathers, R.R., Smith, M.A.L. & Aitken-Christie, 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.
- Lichtentaller, H.K. *et al.*, 1981. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynth. Res.*, 2:115-141.
- Lindsey, R. & Jones, M.G.K., 1989. *Plant Biotechnology in Agriculture*. Open University Press, Milton Keynes. 242 pp.

- Long, S.P., 1991. Modification of the response of photosynthetic productivity to rising temperature by atmospheric CO₂ concentrations: Has its importance been underestimated? *Plant Cell Environ*, 14: 729-739.
- Long, S.P. & Drake, B.G., 1992. Photosynthetic CO₂ assimilation and rising atmospheric CO₂ concentrations. In: N. R. Baker and H. Thomas (eds.), *Crop Photosynthesis: Spatial and temporal Determinants*, pp. 69-103. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands.
- Ludlow, M.M. & Björkman, O., 1984. Paraheliotropic leaf movement in *Siratro* as a protective mechanism against drought-induced damage to primary photo synthetic reaction: damage by excessive light and heat. *Planta*, 161:505-518.
- MacKinney, G., 1941. Absorption of light by chlorophyll solution. *J. Biol. Chem.*, 140: 315-322.
- Majeau, N. & Coleman, J.R., 1996. Effects of CO₂ concentration on carbonic anhydrase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase expression in pea. *Plant Physiol.*, 112:569-574.
- Manzanera, J.A. & Pardos, J.A., 1990. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L.. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21: 1-8.
- 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.
- Martindale, W. & Leegood, R.C., 1987. Acclimation of photosynthesis to low temperature in spinach. I. Effects of acclimation on CO₂ assimilation and carbon partitioning. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1865-1872.
- Matysiak, B. 1996. The effects of environmental conditions on acclimatization and the growth of tissue-cultured plants from *Araceae* family. Dissertation, Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, Poland.
- Matysiak, B. & Nowak, J., 1994. Carbon dioxide and light effects on photosynthesis, transpiration and *ex vitro* growth of *Hamalomena* 'Emeralda Gem' plantlets. *Scientia Hortic.*, 57:353-358.
- Matysiak, B. & Nowak, J., 1995. Acclimatization of *ex vitro Homalomena* 'Emerald Gem' as affected by nutrient solution concentration and CO₂ enrichment. *Acta Horticulturae*, 390: 157-160.
- Matysiak, B. & Nowak, J., 1998. Acclimatization and growth of *Ficus benjamina* microcuttings as affected by carbon dioxide concentration. *J. Hort. Sci. & Biotec.*, 73: 185-188.
- Matysiak, B., Kubik, M., Podwyszyńska, M. & Nowak, J., 1997. Effect of photon flux density on CO₂ fixation and growth of *Rosa hybrida* 'White Gem' microcuttings. *Acta Horticulturae (in print)*.
- 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.

- Minocha, S.C., 1987. Plant Growth Regulators and Morphogenesis in Cell and Tissue Culture of Forest Trees. In: *Cell and Tissue in Forestry*. Bonga, J. N. & Durzan, D. J. (eds), Vol. 1, pp.50-66. Martinus Neijhoff Publishers, Dordrecht.
- 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.
- 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.
- 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 Hort.*, 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.
- Nie, G.Y., Hendrix, D.L., Webber, A.N., Kimball, B.A. & Long, S.P., 1995a. Increased accumulation of carbohydrates and decreased photosynthetic gene transcript levels in wheat grown at an elevated CO₂ concentration in the field. *Plant Physiol.*, 108:975-983.
- Nie, G.Y., Long, S. P., Kimball, B.A., Lamorte, R.A., Pinter, P.A., Walls, G.W.A. & Webber, A.N., 1995b. Effects of free-air CO₂ enrichment on the development of the photosynthetic apparatus in wheat, as indicated by changes in leaf proteins. *Plant Cell Environ.*, 18:855-864.
- Oberhuber, W. & Edwards, G.E., 1993. Temperature dependence of the linkage of quantum yield of photosystem II to CO₂ fixation in C₄ and C₃ plants. *Plant Physiology*, 101:507-512.
- Ögren, E. & Evans, J.R., 1992. Photoinhibition of photosynthesis *in situ* in six species of *Eucalyptus*. *Aust. J. Plant Physiol.*, 19:223-232.
- 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.
- Öquist, G. & Huner, N.P.A., 1991. Effects of cold acclimation on the susceptibility of photosynthesis to photoinhibition in Scots pine and in winter and spring cereals: A fluorescence analysis. *Funct. Ecol.*, 5:91-100.
- Öquist, G. & Ögren, E., 1985. Effects of winter stress on photosynthetic electron transport and energy distribution between the two photosystems of pine as assayed by chlorophyll fluorescence kinetics. *Photosynth. Res.*, 7:19-30.

- Osmond, C.B., 1983. Interactions between irradiance, nitrogen nutrition and water stress in the sun-shade responses of *Solanum dulcamara*. *Oecologia*, 57:316-321.
- Papenhagen, A., 1983. Bessere Erträge durch CO₂ – aber nicht überall. *Gärterbörse Gartenwelt*, 49: 1244-1249.
- Pierick, R.L.M., 1987. In Vitro *Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 344 pp.
- Pospisilova, J., Solárová, J. & Catsky, J., 1992. Photosynthetic responses to stresses during *in vitro* cultivation. *Photosynthetica*, 26:3-18.
- Potvin, C. & Strain, B.R., 1985. Effects of CO₂ enrichment and temperature on growth in two C₄ weeds, *Echinochloa crus-gali* and *Eleusine indica*. *Can. J. Bot.*, 63: 1495-1499.
- Powles, S.B., 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35:15-44.
- 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.
- 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.
- 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. 111 pp.
- Reuther, G., 1991. Stimulation of the photoautotrophy of *in vitro* plants. *Acta Hortic.*, 300: 59-75.
- 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.
- Roberts, D.W.A., 1984. The effect of light on development of the rosette growth habit of winter wheat. *Can. J. Bot.*, 62:818-822.
- Rodriguez, R., 1982. *In vitro* propagation of *Castanea sativa* Mill. through meristem-tip culture. *Plant Cell Reports*, 1:161-164.
- Rowland-Bamford, A.J., Baker, J.T., Allen, L.H.Jr & Bowes, G., 1991. Acclimation of rice to changing atmospheric CO₂ on growth, photosynthesis and water relations of salt marsh grass species. *Aquat. Bot.*, 39: 45-55.
- Sage, R.F., 1994. Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO₂: The gas exchange perspective. *Photosynth. Res.*, 39:351-368.
- Sage, R.F., Sharkey, T.D. & Seemann, J.R., 1989. Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ in five C₃ species. *Plant Physiol.*, 89:590-596.

- 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.
- Sanchez, M.C., San-José, M.C., Ferro, E., Ballester, A. & Vieitez, A.M., 1997. Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnuts. *J. Hort. Sci.*, 72:433-443.
- 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.
- Scenk, R.V. & Hilderbrandt, A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledoneous and dicotyledoneous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50:199-204.
- Scackel, 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.
- Sesták, Z. (ed.), 1985. *Photosynthesis During Leaf Development*. Dr W. Junk Publishers. Dordrecht. 396 pp.
- Shafer, J., 1966. A chestnut challenge. *Ann. Rep. North Nut Growers Assoc.*, 57:32-35.
- Shull, C.H., 1912. "Phenotype" and "Clone". *Science*, 35:182-183. (Cit. Hartman e Kester, 1984).
- Skriver, K. & Mundy, J., 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *The Plant Cell*, 2:503-512.
- Slovik, S. & Hartung, W., 1992. Compartmental distribution and redistribution of abscisic acid in intact leaves. III. Analysis of stress-signal chain. *Planta*, 187:37-47.
- Stern, W.T., 1943. The use of the term "clone". *Jour. Roy. Hort. Soc.*, 74:41-47. (Cit. Hartman e Kester, 1984).
- Stitt, M., 1991. Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant Cell Environ*, 14:741-762.
- Smith, M.A.L., Palta, J. P. & McCown, B. H., 1986. Comparative anatomy and physiology of micropropagated, seedlings and greenhouse-grown asian birch. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 111:437-442.
- 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.

- Sorrentino, G. Cerio, L. & Alvino, A., 1997. Effect of shading and air temperature on leaf photosynthesis, fluorescence and growth in lily plants. *Scientia Horticulturae*, 69: 259-273.
- 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* cultured. *J. Amer. Soc Hort. Sci.*, 113:234-238.
- 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 effects on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. *Can. J. Bot.*, 60:2896-2902.
- Sutter, E.G., Novello, V. & Shackel, K., 1988. Physiological and anatomical aspects of water stress of cultured plants. *Acta Hortic.*, 230: 113-119.
- Teasdale, R.D., 1987. Micronutrients. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Vol 1, pp.17-49. Bonga, J. M. & Durzan, D. J. (eds). Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht.
- Teixeira, A.R.N. & Ricardo, C.P., 1983. *Fotossíntese*. Didáctica Editora, Lisboa. 344pp.
- Van 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. Plantarum*, 96:298-304.
- Van Huylenbroeck, J.M., Huygens, H. & Debergh, P.C., 1996. Photoinhibition during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* "Petite" plantlets. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 31:160-164.
- Van Oosten, J.J. & Besford, R.T., 1995. Some relationships between the gas exchange, biochemistry and molecular biology of photosynthesis during leaf development of tomato plants after transfer to different carbon dioxide concentrations. *Plant Cell Environ*, 18:1253-1266.
- Van Oosten, J.J. Wilkins, S. & Besford, R.T., 1994. Regulation of the expression of photosynthetic nuclear genes by high CO₂ is mimicked by carbohydrates: a mechanism for the acclimation of photosynthesis to high CO₂. *Plant Cell Environ*, 17:913-923.
- 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.
- Vieitez, A.M. & Vieitez, E., 1978. *In vitro* culture of cotyledon tissue of *Castanea sativa* Mill. *Scientia Hortic.*, 8:243-247.

- 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, M.L. & Vieitez, A.M., 1981. Injerto en hipocótilo de plântulas de castaño. In. *Edafol. Agrobio.*, 40:467-655.
- 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., 1986. Chestnut (*Castanea* ssp). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Bajaj, Y.P.S., ed.), Vol.1, pp.393-414, Springer-Verlag, Berlin.
- Vieitez, A.M., Ballester, A. & Vieitez, M.L., 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: *Abstr. Inaugural Meet. Fespp*, pp.552-553, Edinburgh.
- Vieitez, A.M.; Sánchez, C. & San-José, C., 1989. Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak. *Scientia Hort.*, 41:151-159.
- Vieitez, A.M.; San-José, M.C. & Vieitez, E., 1985. *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L.. *J. Hort. Sci.*, 60:99-106.
- 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.
- Walker, D.A., 1990. *Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis*. Oxygraphics Ltd., Brighton/Packard Pub., Chichester.
- 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.
- Webber, A.N., Nie, G.Y. & Long, S.P., 1994. Effects of rising CO₂ concentration on expression of photosynthetic proteins. *Photosynth. Res.*, 39: 413-425.
- 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, P.R., 1963. *The cultivation of animal & plant cells*. 2^a Ed. Ronald Press, New York (cit George e Sherrington, 1984).
- Winton, L.L., 1968. Plantlets from aspen tissue cultures. *Science*, 160:1234-1235.

- Wolfe, D., 1995. Physiological and growth responses to atmospheric carbon dioxide concentration. In: M. Pessarakli (ed.) *Handbook of Plants and Crop Physiology*, pp. 223-242. Marcel Dekber, Inc. New York.
- Woodward, F.I., 1987. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from pre-industrial levels. *Nature*, 327: 617-618.
- Woodrow, I.E., Berry, J.A., 1988. Enzymatic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39: 533-594.
- 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.
- Ziska, L.H., Drake, B.G. & Chamberlain, S., 1990. Long-term photosynthetic response in single leaves of a C₃ and C₄ salt marsh species grown at elevated CO₂ *in situ*. *Oecologia*, 83: 469-472.
- 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.

1. Composição dos meios de cultura

Tabela 7.1. Composição do meio de cultura.

	MS (1962)
<i>Substâncias químicas</i>	<i>Concentração (mg l⁻¹)</i>
<i>KNO₃</i>	<i>1900,000</i>
<i>NH₄NO₃</i>	<i>1650,000</i>
<i>CaCl₂.2H₂O</i>	<i>440,000</i>
<i>MgSO₄.7H₂O</i>	<i>370,000</i>
<i>KH₂PO₄</i>	<i>170,000</i>
<i>H₃BO₃</i>	<i>6,200</i>
<i>MnSO₄.4H₂O</i>	<i>22,300</i>
<i>ZnSO₄.7H₂O</i>	<i>8,600</i>
<i>KI</i>	<i>0,830</i>
<i>NaMoO₄.2H₂O</i>	<i>0,250</i>
<i>CuSO₄.5H₂O</i>	<i>0,025</i>
<i>CoCl₂.6H₂O</i>	<i>0,025</i>
<i>SO₄Fe.7H₂O</i>	<i>27,850</i>
<i>Na₂EDTA</i>	<i>37,250</i>
<i>C₁₂H₁₇ClN₄O₈.HCl</i>	<i>0,100</i>
<i>C₆H₅NO₂</i>	<i>0,500</i>
<i>C₈H₁₁NO₃.HCl</i>	<i>0,500</i>
<i>C₂H₅NO₂</i>	<i>2,000</i>
<i>C₆H₁₂O₆</i>	<i>100,000</i>

2. Análises de variância

2.1. Análise de crescimento

Tabela 7.2. Análise de variância do crescimento relativo (Fig. 3.1).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	1	19,961886	19,961886	16,343	0,0002
Erro	58	70,842452	1,221422		
Total ajustado	59	90,804338			

Tabela 7.3. Análise de variância da biomassa total (Fig. 3.2)

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	2	28147718	14073859	43,835	0,000
Erro	87	27932378	321062		
Total ajustado	89	56080095			

Tabela 7.4. Análise de variância da razão peso seco parte aérea/raiz (Fig. 3.3).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	2	422,12192	211,06096	18,923	0,000
Erro	87	970,35965	11,15365		
Total ajustado	89	1392,4816			

Tabela 7.5. Tabela de médias para o crescimento relativo em altura (Fig.3.1), biomassa total (Fig.3.2) e razão peso seco parte aérea/raiz (Fig. 3.3).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Crescimento relativo	Biomassa total (mg)	Razão peso seco parte aérea/raiz
350	2,66	1231,77	6,63
700	3,81	1259,87	9,40
Dia 0	-----	59,74	4,10

Tabela 7.6. Análise de variância do peso fresco (Fig.3.4).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	2	5,6075E0008	2,8037E0008	68,046	0,0000
Erro	87	3,5847E0008	4,1203E0006		
Total ajustado	89	9,1921E0008			

Tabela 7.7. Análise de variância da razão peso fresco parte aérea/raiz (Fig.3.5).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	2	25,55492	12,777458	6,371	0,0026
Erro	87	174,48013	2,005519		
Total ajustado	898	200,03505			

Tabela 7.8. Análise de variância da razão peso fresco/peso seco (Fig.3.6).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	2	2,87321	1,4366044	1,175	0,3136
Erro	87	106,35437	1,2224641		
Total ajustado	89	109,22758			

Tabela 7.9. Tabela de médias para o peso fresco (Fig.3.4), razão peso fresco parte aérea/raiz (Fig.3.5) e razão peso fresco/peso seco (Fig.3.6).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Peso fresco (mg)	Razão peso fresco parte aérea/raiz	Razão peso fresco/peso seco
350	5244,94	2,80	4,52
700	5823,32	3,95	4,96
Dia 0	262,85	3,90	4,73

Tabela 7.10. Análise de variância da biomassa foliar (Fig. 3.7).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	2	14636435	7318217,4	39,257	0,000
Erro	87	16218478	186419,3		
Total ajustado	89	30854913			

Tabela 7.11. Análise de variância da biomassa radicular (Fig. 3.8).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	2	394303,33	197151,67	38,042	0,000
Erro	87	450871,41	5182,43		
Total ajustado	89	845174,75			

Tabela 7.12. Análise de variância da razão de peso foliar (Fig. 3.9).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	2	1,7821612	0,8910806	338,019	0,000
Erro	87	0,2293481	0,0026362		
Total ajustado	89	2,0115093			

Tabela 7.13. Tabela de médias para a biomassa foliar (Fig. 3.7), biomassa radicular (Fig. 3.8) e razão de peso foliar (Fig. 3.9).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Biomassa foliar (mg)	Biomassa radicular (mg)	Razão de peso foliar
350	876,38	163,36	0,70
700	882,99	139,43	0,69
Dia 0	24,24	12,52	0,40

Tabela 7.14. Análise de variância da área foliar (Fig. 3.10).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	2	1054154,7	527077,35	79,963	0,000
Erro	87	573463,0	6591,53		
Total ajustado	89	1627617,7			

Tabela 7.15. Análise de variância da área foliar específica (Fig. 3.11).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	2	44820,91	22410,455	5,062	0,0083
Erro	87	385141,88	4426,918		
Total ajustado	89	429962,79			

Tabela 7.16. Tabela de médias para a área foliar (Fig. 3.10) e área foliar específica (Fig. 3.11).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Área foliar (cm ²)	Área foliar específica (cm ²)
350	215,26	271,45
700	253,82	324,19
Dia 0	7,40	310,28

Tabela 7.17. Análise de variância do comprimento total da raiz (Tab. 3.2).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	1	55510,42	55510,417	9,792	0,0027
Erro	58	328811,49	5669,164		
Total ajustado	59	384321,91			

Tabela 7.18. Análise de variância da área total de absorção da raiz (Tab. 3.2).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	1	2965,254	2965,2540	4,822	0,0321
Erro	58	35666,389	614,9377		
Total ajustado	59	38631,643			

Tabela 7.19. Análise de variância do volume da raiz (Tab. 3.2).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	1	0,988167	0,9881667	2,292	0,1354
Erro	58	25,001667	0,4310632		
Total ajustado	59	25,989833			

Tabela 7.20. Análise de variância do diâmetro médio da raiz (Tab. 3.2).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	1	0,0240000	0,0240000	4,589	0,0364
Erro	58	0,3033333	0,0052299		
Total ajustado	59	0,3273333			

2.2. Histologia e anatomia foliar

Tabela 7.21. Análise de variância da espessura da folha (Tab. 3.3).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	5,483	5,4834	0,036	0,8521
B: Folha	3	19199,136	6399,7118	42,401	0,0000
A * B	3	368,46997	122,82332	0,814	0,4957
Erro	32	4829,8403	150,93251		
Total ajustado	39	24402,929			

Tabela 7.22. Análise de variância da espessura da folha (Fig. 3.17).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	19573,089	2796,1556	18,526	0,0000
Erro	32	4829,840	150,9325		
Total ajustado	39	24402,929			

Tabela 7.23. Tabela de médias para a espessura da folha (μm) (Fig. 3.17).

CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	75,03	121,54	138,38	129,8
700	82,13	121,86	128,44	129,35

Tabela 7.24. Análise de variância do diâmetro da nervura principal (Tab. 3.3).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO_2	1	27069,13	27069,13	2,402	0,1310
B: Folha	3	793186,89	264395,63	23,465	0,0000
A * B	3	86689,484	28896,495	2,565	0,0719
Erro	32	360561,30	11267,541		
Total ajustado	39	1267506,8			

Tabela 7.25. Análise de variância do diâmetro da nervura principal (μm) (Fig.3.18).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	906945,50	129563,64	11,499	0,0000
Erro	32	360561,30	11267,54		
Total ajustado	39	1267506,8			

Tabela 7.26. Tabela de médias para o diâmetro da nervura principal (μm) (Fig. 3.18).

CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	457,87	653,43	769,08	971,21
700	530,53	611,11	720,58	781,23

Tabela 7.27. Análise de variância do diâmetro do cilindro vascular (μm) (Tab. 3.3).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO_2	1	706,78	706,776	0,150	0,7053
B: Folha	3	219636,53	73212,176	15,530	0,0000
A * B	3	6999,2841	2333,0947	0,495	0,6884
Erro	32	150852,86	4714,1519		
Total ajustado	39	378195,45			

Tabela 7.28. Análise de variância do diâmetro do cilindro vascular (μm) (Fig. 3.19).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	227342,59	32477,513	6,889	0,0001
Erro	32	150852,86	4714,152		
Total ajustado	39	378195,45			

Tabela 7.29. Tabela de médias para o diâmetro do cilindro vascular (μm) (Fig. 3.19).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	154,40	239,52	302,22	382,51
700	172,66	224,06	314,40	333,91

Tabela 7.30. Análise de variância do número de células / 100 μm (Tab. 3.4).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	91,2946	91,2946	8,151	0,0075
B: Folha	3	3049,9435	1016,6478	90,772	0,0000
A * B	3	57,792587	19,264196	1,720	0,1826
Erro	32	358,40068	11,200021		
Total ajustado	39	3557,4314			

Tabela 7.31. Análise de variância do número de células (Fig. 3.20).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	3199,0307	457,00439	40,804	0,0000
Erro	32	358,4007	11,20002		
Total ajustado	39	3557,4314			

Tabela 7.32. Tabela de médias para número de células / 100 μm de comprimento de corte transversal (Fig. 3.20).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	50,06	27,12	27,57	26,72
700	42,90	25,58	25,48	25,42

Tabela 7.33. Análise de variância do número de células da epiderme superior (Tab. 3.4).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	0,004000	0,004000	0,008	0,9293
B: Folha	3	85,368700	28,456233	58,389	0,0000
A * B	3	0,0774600	0,0258200	0,053	0,9836
Erro	32	15,595400	0,4873563		
Total ajustado	39	101,04556			

Tabela 7.34. Tabela de médias para o número de células da epiderme superior (Tab. 3.4).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	7,26	4,12	3,67	3,75
700	7,20	4,07	3,84	3,77

Tabela 7.35. Análise de variância do número de células do parênquima em paliçada (Tab. 3.4).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	0,05550	0,055503	0,051	0,8250
B: Folha	3	137,56513	45,855042	42,239	0,0000
A * B	3	1,9158875	0,6386292	0,588	
Erro	32	34,739560	1,0856113		
Total ajustado	39	174,27608			

Tabela 7.36. Tabela de médias para o número de células do parênquima em paliçada (Tab. 3.4).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	10,99	6,90	6,99	7,51
700	11,69	6,80	7,20	7,01

Tabela 7.37. Análise de variância do número de células do parênquima lacunoso (Tab. 3.4).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	80,71281	80,71281	27,953	0,0000
B: Folha	3	690,60241	230,20080	79,725	0,0000
A * B	3	47,592050	15,864017	5,494	0,0037
Erro	32	92,398440	2,8874513		
Total ajustado	39	911,30571			

Tabela 7.38. Tabela de médias para o número de células do parênquima lacunoso (Tab.3.4).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	16,10	9,41	9,33	8,40
700	22,71	10,87	10,79	10,24

Tabela 7.39. Análise de variância do número de células da epiderme inferior (Tab. 3.4).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	0,077440	0,077440	0,116	0,7391
B: Folha	3	67,039980	22,346660	33,507	0,0000
A * B	3	0,2477800	0,0825933	0,124	0,9453
Erro	32	21,341560	0,6669238		
Total ajustado	39	88,706760			

Tabela 7.40. Tabela de médias para o número de células da epiderme inferior (Tab. 3.4).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	8,55	5,15	5,48	5,76
700	8,46	5,38	5,75	5,72

Tabela 7.41. Análise de variância da espessura da epiderme superior (Tab.3.5).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	48,847488	48,847488	10,398	0,0029
B: Folha	3	25,568139	8,522713	1,814	0,1644
A * B	3	34,585287	11,528429	2,454	0,0811
Erro	32	150,32635	4,6976984		
Total ajustado	39	259,32726			

Tabela 7.42. Análise de variância da espessura da epiderme superior (Fig. 3.21).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	109,00091	15,571559	3,315	0,0091
Erro	32	150,32635	4,697698		
Total ajustado	39	259,32726			

Tabela 7.43. Tabela de médias para a espessura da epiderme superior (μm) (Fig. 3.21).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	16,40	14,24	13,26	13,38
700	16,62	15,43	18,44	15,63

Tabela 7.44. Análise de variância da espessura do parênquima em paliçada (Tab.3.5).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	284,07561	284,07561	39,459	0,0000
B: Folha	3	907,39863	302,46621	42,014	0,0000
A * B	3	19,631284	6,5437615	0,909	0,4476
Erro	32	230,37469	7,1992090		
Total ajustado	39	1441,4802			

Tabela 7.45. Análise de variância da espessura do parênquima em paliçada (Fig. 3.21).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	1211,1055	173,01507	24,033	0,0000
Erro	32	230,3747	7,19921		
Total ajustado	39	1441,4802			

Tabela 7.46. Tabela de médias para a espessura do parênquima em paliçada (μm) (Fig. 3.21).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	32,67	41,68	42,96	46,69
700	29,39	34,83	36,59	41,86

Tabela 7.47. Análise de variância da espessura do parênquima lacunoso (Tab. 3.5).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	68,33669	68,33669	8,914	0,0054
B: Folha	3	332,68498	110,89499	14,466	0,0000
A * B	3	14,665296	4,8884320	0,638	0,5963
Erro	32	245,30801	7,6658754		
Total ajustado	39	660,99497			

Tabela 7.48. Análise de variância da espessura do parênquima lacunoso (Fig. 3.21).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	415,68696	59,383852	7,747	0,0000
Erro	32	245,30801	7,665875		
Total ajustado	39	660,99497			

Tabela 7.49. Tabela de médias para a espessura do parênquima lacunoso (μm) (Fig. 3.21).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	38,56	34,58	34,05	31,31
700	41,34	39,10	35,78	32,74

Tabela 7.50. Análise de variância da espessura da epiderme inferior (Tab. 3.5).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	2,421276	2,421276	1,683	0,2038
B: Folha	3	68,328923	22,776308	15,832	0,0000
A * B	3	4,9206904	1,6402301	1,140	0,3477
Erro	32	46,037409	1,4386690		
Total ajustado	39	121,70830			

Tabela 7.51. Análise de variância da espessura da epiderme inferior (Fig. 3.21).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	75,670890	10,810127	7,514	0,0000
Erro	32	46,037409	1,438669		
Total ajustado	39	121,70830			

Tabela 7.52. Tabela de médias para a espessura da epiderme inferior (μm) (Fig. 3.21).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	F3
350	12,38	9,51	9,73	8,62
700	12,63	10,63	9,18	9,78

Tabela 7.53. Análise de variância da frequência estomática (Tab. 3.7).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	30557,57	30557,57	34,791	0,0000
B: Folha	3	389599,10	129866,37	147,860	0,0000
A * B	3	17933,129	5977,7097	6,806	0,0008
Erro	40	35132,238	878,30596		
Total ajustado	47	473222,03			

Tabela 7.54. Análise de variância da frequência estomática (Fig. 3.22).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	438089,80	62584,257	71,256	0,0000
Erro	40	35132,24	878,306		
Total ajustado	47	473222,03			

Tabela 7.55. Tabela de médias para a frequência estomática (Fig. 3.22).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	406,45	309,15	240,77	224,20
700	520,67	347,37	280,25	234,13

2.3. Clorofilas

Tabela 7.56. Análise de variância dos teores de clorofila a ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$) (Tab. 3.9).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	44,182931	44,182931	32,467	0,0000
B: Folha	3	34,004244	11,334748	8,329	0,0001
A * B	3	6,8249643	2,2749881	1,672	0,1835
Erro	56	76,207192	1,3608427		
Total ajustado	63	161,21933			

Tabela 7.57. Análise de variância dos teores de clorofila a ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$) (Fig. 3.23B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	85,012139	12,144591	8,924	0,0000
Erro	56	76,207192	1,360843		
Total ajustado	63	161,21933			

Tabela 7.58. Tabela de médias para a concentração de clorofila a ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$) (Fig. 3.23B).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	5,95	7,45	7,47	6,51
700	3,76	5,05	6,25	5,68

Tabela 7.59. Análise de variância dos teores de clorofila a (mg m^{-2}) (Tab. 3.10).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	48406,862	48406,862	33,496	0,0000
B: Folha	3	23433,246	7811,082	5,405	0,0024
A * B	3	8147,5799	2715,8600	1,879	0,1436
Erro	56	80928,152	1445,1456		
Total ajustado	63	160915,84			

Tabela 7.60. Análise de variância dos teores de clorofila a (mg m^{-2}) (Fig. 3.23A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	79987,688	11426,813	7,907	0,0000
Erro	56	80928,152	1445,146		
Total ajustado	63	160915,84			

Tabela 7.61. Tabela de médias para a concentração de clorofila a (mg m^{-2}) (Fig. 3.23A).

CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	213,14	234,25	246,55	201,18
700	134,89	158,61	206,18	175,43

Tabela 7.62. Análise de variância dos teores de clorofila b ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$) (Tab. 3.9).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO_2	1	105,43848	105,43848	210,124	0,0000
B: Folha	3	13,43183	4,47728	8,923	0,0001
A * B	3	3,7002432	1,2334144	2,458	0,0723
Erro	56	28,100324	0,5017915		
Total ajustado	63	150,67088			

Tabela 7.63. Análise de variância dos teores de clorofila b ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$) (Fig. 3.24B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	122,57055	17,510079	34,895	0,0000
Erro	56	28,10032	0,501792		
Total ajustado	63	150,67088			

Tabela 7.64. Tabela de médias para a concentração de clorofila b ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$) (Fig. 3.24B).

CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	3,41	4,35	4,36	4,40
700	0,96	1,32	1,40	2,56

Tabela 7.65. Análise de variância dos teores de clorofila b (mg m^{-2}) (Tab. 3.10).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO_2	1	113690,94	113690,94	214,558	0,0000
B: Folha	3	7131,27	2377,09	4,486	0,0068
A * B	3	4303,7415	1434,5805	2,707	0,0538
Erro	56	29673,522	529,88431		
Total ajustado	63	154799,47			

Tabela 7.66. Análise de variância dos teores de clorofila b (mg m^{-2}) (Fig. 3.24A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	125125,95	17875,136	33,734	0,0000
Erro	56	29673,52	529,884		
Total ajustado	63	154799,47			

Tabela 7.67. Tabela de médias para a concentração de clorofila b (mg m^{-2}) (Fig. 3.24A).

CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	122,16	136,62	143,77	135,85
700	34,48	41,37	46,14	79,24

Tabela 7.68. Análise de variância dos teores de clorofila total ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$) (Tab. 3.10).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO_2	1	258,92474	258,92474	124,326	0,0000
B: Folha	3	74,28136	24,76045	10,766	0,0000
A * B	3	16,273853	5,4246177	2,359	0,0813
Erro	56	128,78892	2,2998021		
Total ajustado	63	505,26887			

Tabela 7.69. Análise de variância dos teores de clorofila total ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$) (Fig. 3.25B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	376,47996	53,782851	23,386	0,0000
Erro	56	128,78892	2,299802		
Total ajustado	63	505,26887			

Tabela 7.70. Tabela de médias para a concentração de clorofila total ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$) (Fig. 3.25B).

CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	F3
350	9,35	11,80	11,83	10,90
700	4,72	6,36	7,65	8,24

Tabela 7.71. Análise de variância dos teores de clorofila total (mg m^{-2}) (Tab. 3.10).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO_2	1	310254,97	310254,97	125,824	0,0000
B: Folha	3	39158,50	13052,83	5,294	0,0028
A * B	3	19796,039	6598,6797	2,676	0,0558
Erro	56	138083,69	2465,7802		
Total ajustado	63	507293,20			

Tabela 7.72. Análise de variância dos teores de clorofila total (mg m^{-2}) (Fig. 3.25A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	369209,51	52744,216	21,390	0,0000
Erro	56	138083,69	2465,780		
Total ajustado	63	507293,20			

Tabela 7.73. Tabela de médias para a concentração de clorofila total (mg m^{-2}) (Tab. 3.10).

CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	f3
350	335,21	370,78	390,22	336,93
700	169,33	199,93	252,27	254,60

Tabela 7.74. Análise de variância da razão entre clorofila a e b (Tab. 3.9).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO_2	1	71,083177	71,083177	106,757	0,0000
B: Folha	3	15,635045	5,211682	7,827	0,0002
A * B	3	10,840183	3,6133944	5,427	0,0024
Erro	56	37,287172	0,6658424		
Total ajustado	63	134,84558			

Tabela 7.75. Análise de variância da razão entre clorofila a e b ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$) (Fig. 3.25B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	97,558405	13,936915	20,931	0,0000
Erro	56	37,287172	0,665842		
Total ajustado	63	134,84558			

Tabela 7.76. Tabela de médias para a razão de clorofila a e b ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$) (Fig. 3.25B).

CO_2 ($\mu\text{L L}^{-1}$)	fP	f1	f2	F3
350	1,82	1,78	1,74	1,57
700	4,26	4,00	4,74	2,34

2.4. Fotossíntese

Tabela 7.77. Análise de variância da taxa de fotossíntese aparente (Tab. 3.11).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO_2	1	0,634482	0,6344817	0,959	0,3422
B: Folha	2	19,485373	9,7426867	14,729	0,0000
A * B	2	1,1760933	0,5880467	0,889	0,4170
Erro	54	35,719110	0,6614650		
Total ajustado	59	57,015058			

Tabela 7.78. Análise de variância da taxa de fotossíntese aparente (Fig. 3.27A).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	5	21,295948	4,2591897	6,439	0,0001
Erro	54	35,719110	0,6614650		
Total ajustado	59	57,015058			

Tabela 7.79. Tabela de médias para a taxa de fotossíntese aparente ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Fig. 3.27A).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	f1	f2	f3
350	3,95	5,22	5,61
700	4,13	4,90	5,14

Tabela 7.80. Análise de variância da taxa de transpiração (Tab. 3.11).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	0,5111574	0,5111574	5,231	0,0261
B: Folha	2	0,1398946	0,0699473	0,716	0,4933
A * B	2	0,1940511	0,0970256	0,993	0,3771
Erro	54	5,2762366	0,0977081		
Total ajustado	59	6,1213397			

Tabela 7.81. Análise de variância da taxa de transpiração (Fig. 3.27B).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	5	0,8451031	0,1690206	1,730	0,1435
Erro	54	5,2762366	0,0977081		
Total ajustado	59	6,1213397			

Tabela 7.82. Tabela de médias para a taxa de transpiração ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Fig. 3.27B).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	f1	f2	f3
350	0,12	0,14	0,13
700	0,46	0,25	0,23

Tabela 7.83. Análise de variância da condutância estomática (Tab. 3.11).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	9,4089600	9,4089600	49,644	0,0000
B: Folha	2	0,2125433	0,1062717	0,561	0,5741
A * B	2	0,0472900	0,0236450	0,125	
Erro	54	10,234580	0,1895293		
Total ajustado	59	19,903373			

Tabela 7.84. Análise de variância da condutância estomática (Fig. 3.27C).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	5	9,668793	1,9337587	10,203	0,0000
Erro	54	10,234580	0,1895293		
Total ajustado	59	19,903373			

Tabela 7.85. Tabela de médias para a condutância estomática ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Fig. 3.27C).

CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)	f1	f2	f3
350	1,61	1,77	1,80
700	2,47	2,57	2,52

Tabela 7.86. Análise de variância da capacidade fotossintética da folha persistente após tratamento de aclimatização a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tab. 3.12).

	gl	SQ	MQ	F	P
Regressão	3	55,165	18,3884	701,0	<0,0001
Erro	20	0,525	0,0262		
Total	23	55,690	2,42132		

Tabela 7.87. Análise de variância da capacidade fotossintética da folha dois após tratamento de aclimatização a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tab.3.12).

	gl	SQ	MQ	F	P
Regressão	3	231,174	77,0580	3117,5	<0,0001
Erro	20	0,494	0,0247		
Total	23	231,669	10,0725		

Tabela 7.88. Análise de variância da capacidade fotossintética da folha três após tratamento de aclimatização a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tab. 3.12).

	gl	SQ	MQ	F	P
Regressão	3	169,765	56,5882	1437,2	<0,0001
Erro	20	0,787	0,0394		
Total	23	170,552	7,4153		

Tabela 7.89. Análise de variância da capacidade fotossintética da folha persistente após tratamento de aclimatização a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tab. 3.12).

	gl	SQ	MQ	F	P
Regressão	3	187,5	62,51	50,7	<0,0001
Erro	20	24,7	1,23		
Total	23	212,2	9,23		

Tabela 7.90. Análise de variância da capacidade fotossintética da folha dois após tratamento de aclimatização a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tab. 3.12).

	gl	SQ	MQ	F	P
Regressão	3	355,8	118,605	149,9	<0,0001
Erro	20	15,8	0,791		
Total	23	371,6	16,158		

Tabela 7.91. Análise de variância da capacidade fotossintética da folha três após tratamento de aclimatização a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tab. 3.12).

	gl	SQ	MQ	F	P
Regressão	3	345,1	115,05	97,8	<0,0001
Erro	20	23,5	1,18		
Total	23	368,7	16,03		

Tabela 7.92. Regressão linear para cálculo do rendimento quântico da folha persistente, após tratamento de aclimatização a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tab. 3.13).

Parâmetro	Valor estimado	Erro padrão	Teste T	Nível de significância
Intercepção	-0,786294	0,179853	-4,37187	0,00076
Declive	0,0249959	2,71701E-3	9,19976	0,00000

Tabela 7.93. Regressão linear para cálculo do rendimento quântico da folha dois, após tratamento de aclimatização a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tab. 3.13).

Parâmetro	Valor estimado	Erro padrão	Teste T	Nível de significância
Intercepção	-0,453762	0,32745	-1,38574	0,18914
Declive	0,0461203	4,94674E-3	9,32337	0,00000

Tabela 7.94. Regressão linear para cálculo do rendimento quântico da folha três, após tratamento de aclimatização a $350 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tab. 3.13).

Parâmetro	Valor estimado	Erro padrão	Teste T	Nível de significância
Intercepção	-0,374827	0,284948	-1,31542	0,21110
Declive	0,0379033	4,30467E-3	8,80518	0,00000

Tabela 7.95. Regressão linear para cálculo do rendimento quântico da folha persistente, após tratamento de aclimatização a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tab. 3.13).

Parâmetro	Valor estimado	Erro padrão	Teste T	Nível de significância
Intercepção	-0,256349	0,430916	-0,594894	0,56513
Declive	0,116312	0,0179354	6,48506	0,00007

Tabela 7.96. Regressão linear para cálculo do rendimento quântico da folha dois, após tratamento de aclimatização a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tab. 3.13).

Parâmetro	Valor estimado	Erro padrão	Teste T	Nível de significância
Intercepção	-0,828614	0,443675	-1,86762	0,09136
Declive	0,121509	0,0184664	6,58	0,00006

Tabela 7.97. Regressão linear para cálculo do rendimento quântico da folha três, após tratamento de aclimatização a $700 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tab. 3.13).

Parâmetro	Valor estimado	Erro padrão	Teste T	Nível de significância
Intercepção	-0,587873	0,40684	-1,44497	0,17906
Declive	0,125922	0,0169333	7,43636	0,00002

2.5. Proteína total solúvel

Tabela 7.98. Análise de variância dos teores de proteína solúvel total (Tab. 3.15).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
A: CO ₂	1	0,207025	0,207025	0,31	0,8617
B: Folha	3	57,004038	19,001346	2,890	0,0434
A * B	3	29,695437	9,8984792	1,505	0,2231
Erro	56	368,19548	6,5749192		
Total ajustado	63	455,10198			

Tabela 7.99. Análise de variância dos teores de proteína solúvel total (Fig. 3.30).

Origem da Variação	gl	SQ	MQ	F	Pr>F
Entre tratamentos	7	86,90650	12,415214	1,888	0,0887
Erro	56	368,19548	6,574919		
Total ajustado	63	455,10198			

Tabela 7.100. Tabela de médias para a proteína solúvel total (mg g⁻¹ ps) (Fig. 3.30).

CO ₂ (μL L ⁻¹)	fP	f1	f2	f3
350	12,88	12,00	11,15	9,69
700	11,46	12,90	9,66	11,24