

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Centro de Ciências Agrárias

Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais

**"MULTIPLICAÇÃO DE *Agapanthus umbellatus* var. minor
EM MEIO GELEIFICADO E EM BIORREATOR DE IMERSÃO
TEMPORÁRIA"**

Luciana Alves Fogaça

Florianópolis, SC

2004

**"MULTIPLICAÇÃO DE *Agapanthus umbellatus* var. minor
EM MEIO GELEIFICADO E EM BIORREATOR DE IMERSÃO
TEMPORÁRIA"**

Luciana Alves Fogaça

Engenheira Agrônoma

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Enio Luiz Pedrotti

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Alves

Florianópolis, SC

2004

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Ao amigo, professor e orientador Dr. Enio L. Pedrotti, pela amizade, confiança, orientação e paciência.

Ao professor e co-orientador Dr. Antonio C. Alves, pela preciosa colaboração que muito enriqueceu esse trabalho.

Ao professor Dr. Marcelo Maraschin, pelo auxílio, principalmente na realização do terceiro capítulo dessa dissertação.

Aos amigos Douglas, Denilson e Alan com quem tive o prazer de trabalhar e que em vários momentos me auxiliaram nos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, em especial ao Luis Pacheco, Josiane, Patricia, Liana, Tatiana, Marcelo, Carla, Carol, Magali e Alessandra, por compartilhar comigo as angústias e as alegrias.

À técnica do laboratório de Fisiologia Vegetal, Maria Luisa Peixoto, pelo auxílio na realização das avaliações.

À Dra. e pesquisadora Adriana Dantas pelo auxílio em algumas análises estatísticas.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais: Maurício, Maris, Paulo Silvano, Paulo-Tchê e Lucir, pela amizade.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Aos amigos Andrea, Leocir, Delci, Bia, Léo, Arlei, Prunus, Prof Dr. Aparecido, com os quais passei ótimos momentos, regados com cervejinhas, churrascos, queijos e vinhos.

Aos meus pais e minhas irmãs, pelo incentivo e carinho.

Em especial ao meu namorado Marcos, pelo incentivo, companherismo, carinho e paciência.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | i |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 01 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 08 |
| Capítulo I – Multiplicação de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor em meio geleificado e em biorreator de imersão temporária..... | 12 |
| RESUMO..... | 13 |
| ABSTRACT..... | 14 |
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. MATERIAIS e MÉTODOS..... | 20 |
| 2.1 Material Vegetal..... | 20 |
| 2.2 Fase de Multiplicação em dois sistemas de multiplicação..... | 20 |
| 2.2.1 Avaliação das Características Morfológicas dos explantes..... | 21 |
| 2.2.2 Descrição de Biorreator de Imersão Temporária (BIT)..... | 22 |
| 2.3 Fase de Aclimatização..... | 25 |
| 3. RESULTADOS e DISCUSSÃO..... | 26 |
| 3.1 Comparação da eficiência do sistema convencional em meio geleificado e biorreator de imersão temporária em meio líquido durante a fase de multiplicação de plântulas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor..... | 26 |
| 3.2 Desempenho de plântulas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor obtidas da fase de multiplicação durante a fase de aclimatização | 36 |
| 4. CONCLUSÃO..... | 42 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 43 |
| Capítulo II – Características Morfofisiológicas de plântulas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado e biorreator de imersão temporária..... | 50 |
| RESUMO..... | 51 |
| ABSTRACT..... | 52 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 53 |
| 2. MATERIAIS e MÉTODOS..... | 58 |
| 2.1 Material Vegetal..... | 58 |
| 2.2 Ensaios..... | 58 |

| | |
|---|------------|
| 2.2.1 Ensaio n ^o .1 Efeito da variação de níveis de sacarose e da intensidade luminosa nas características morfo-fisiológicas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor em meio geleificado (MG)..... | 58 |
| 2.2.2 Ensaio n ^o .2 Efeito da variação de níveis de sacarose e da intensidade luminosa nas características morfo-fisiológicas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor em biorreator de imersão temporária (BIT)..... | 59 |
| 2.3 Medidas das Variáveis..... | 60 |
| 2.3.1 Avaliação das características morfológicas dos explantes..... | 60 |
| 2.3.2 Análise do conteúdo de clorofila | 60 |
| 2.3.3 Densidade e características biométricas de estômatos..... | 61 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 63 |
| 3.1 Efeito da variação de níveis de sacarose e da intensidade luminosa nas características morfo-fisiológicas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor em meio geleificado e em biorreator de imersão temporária..... | 63 |
| 3.1.1 Características morfológicas dos explantes..... | 63 |
| 3.1.2 Análise do Conteúdo de Clorofila..... | 75 |
| 3.1.3 Densidade e características biométricas de estômatos..... | 79 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 92 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 93 |
| Capítulo III – Metabolismo de α-D-glucose em plântulas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor cultivadas em biorreator de imersão temporária, via ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H-RMN)..... | 101 |
| RESUMO..... | 102 |
| ABSTRACT..... | 103 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 104 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 107 |
| 2.1 Cultivo <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor em biorreator de imersão temporária..... | 107 |
| 2.2 Análise do metabolismo de α -D-glucose via ¹ H-RMN..... | 107 |
| 2.3 Análise estatística..... | 108 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 109 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 114 |

| | |
|---|------------|
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 115 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS..... | 119 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AIB - Ácido indol-3-butírico

APROESC - Associação de Produtores de Flores e Plantas Ornamentais do Estado de Santa Catarina

BAP - 6 - Benzilaminopurina (6-Benzilaminopurina)

BIT - Biorreator de Imersão Temporária

CCA - Centro de Ciências Agrárias

CEAGESP - Companhia de Entreposto e Armazéns Gerais de São Paulo

CV - Coeficiente de variação

D₂O - Água deuterada

EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A.

IBRAFLORE - Instituto Brasileiro de Floricultura

LMBV - Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal

MAPA - Ministério da Agricultura e Abastecimento

MG - Meio geleificado

MS - Meio Básico de Murashige & Skoog (1962)

¹H-RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RUBISCO - D-ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

UNIVALI - Universidade do Vale do Itajaí

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Flores de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor de plantas matrizes produzidas no viveiro de mudas do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC – Florianópolis – SC..... | 04 |
| Figura 2 Touceiras de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor de plantas matrizes produzidas no viveiro de mudas do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC – Florianópolis – SC..... | 05 |
| Figura 3 Esquema do biorreator de imersão temporária (BIT) utilizado para a fase de multiplicação de plântulas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor construído no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV/CCA/UFSC)..... | 23 |
| Figura 4 Biorreator de imersão temporária construído no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) – UFSC – Florianópolis – SC, 2003, utilizado na fase de multiplicação em meio líquido de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor..... | 24 |
| Figura 5 Efeito de concentrações de BAP na fase de multiplicação de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor em diferentes sistemas de micropropagação: em meio geleificado e em biorreator de imersão temporária..... | 27 |
| Figura 6 Efeito de concentrações de BAP na altura das brotações de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em diferentes sistemas de micropropagação: em meio geleificado e em biorreator de imersão temporária | 32 |
| Figura 7 Plântulas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado no sistema convencional de micropropagação após 60 dias de cultura..... | 34 |

| | |
|--|-----|
| Figura 8 Plântulas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio líquido em biorreator de imersão temporária após 60 dias de cultura..... | 34 |
| Figura 9 Efeito de concentrações de sacarose e de intensidade luminosa sobre o número de brotações/explante de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicados em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias..... | 67 |
| Figura 10 Plântulas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em MG suplementado com diferentes concentrações de sacarose e intensidade luminosa..... | 71 |
| Figura 11 Plântulas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária suplementado com diferentes concentrações de sacarose e intensidade luminosa | 72 |
| Figura 12 Micrografia óptica mostrando detalhes da densidade estomática da face adaxial de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado | 80 |
| Figura 13 Micrografia óptica mostrando detalhes da densidade estomática da face abaxial de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado..... | 80 |
| Figura 14 Micrografia óptica mostrando detalhes da densidade estomática de folhas de <i>Agapanthus umbelattus</i> var. minor multiplicadas em meio líquido em biorreator de imersão temporária..... | 81 |
| Figura 15. Aspecto visual dos estômatos <i>in vitro</i> de folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária..... | 90 |
| Figura 16: Concentração de α -D-glucose em meio de cultura suplementado com 43,82 mM de sacarose, determinada por ^1H -RMN, em sistema de cultivo de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor em biorreator de imersão temporária, sob intensidades luminosas de 70 e 140 ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)..... | 110 |

| | |
|---|-----|
| Figura 17 Concentração de α -D-glucose em meio de cultura suplementado com 87,64 mM de sacarose, determinada por ^1H -RMN, em sistema de cultivo de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor em biorreator de imersão temporária, sob intensidades luminosas de 70 e 140 ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)..... | 111 |
| Figura 18 Concentração de α -D-glucose em meio de cultura suplementado com 131,46 mM de sacarose, determinada por ^1H -RMN, em sistema de cultivo de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor em biorreator de imersão temporária, sob intensidades luminosas de 70 e 140 ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)..... | 111 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Número de brotações/explante de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e a quatro concentrações de BAP após 60 dias de cultura..... | 26 |
| Tabela 2 | Altura de brotações de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e quatro doses de BAP após 60 dias de cultura..... | 29 |
| Tabela 3 | Número de folhas/explante de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e quatro doses de BAP após 60 dias de cultura..... | 29 |
| Tabela 4 | Número de raízes/brotações de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e quatro doses de BAP após 60 dias de cultura..... | 30 |
| Tabela 5 | Massa fresca (g) de brotações de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e quatro doses de BAP após 60 dias de cultura..... | 30 |
| Tabela 6 | Massa seca (g) de brotações de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e quatro doses de BAP após 60 dias de cultura..... | 31 |
| Tabela 7 | Sobrevivência de brotações (%) de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e quatro doses de BAP durante a fase de aclimatização após 30 dias..... | 37 |
| Tabela 8 | Enraizamento(%) de brotações de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e quatro doses de BAP durante a fase de aclimatização após 30 dias..... | 39 |
| Tabela 9 | Número de raízes/explante formadas em plântulas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e quatro doses de BAP durante a fase de aclimatização após 30 dias..... | 40 |

| | |
|---|----|
| Tabela 10 Comprimento de raízes/explante (cm) de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e quatro doses de BAP durante a fase de aclimatização após 30 dias..... | 40 |
| Tabela 11 Número de brotações/explante de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 64 |
| Tabela 12 Altura de brotações/explante de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 65 |
| Tabela 13 Número de folhas/brotação de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 65 |
| Tabela 14 Número de brotações/explante de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 66 |
| Tabela 15 Altura de brotações/explante de plântulas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa | 68 |
| Tabela 16 Número de folhas/explante de plântulas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa | 69 |
| Tabela 17. Massa fresca e seca de brotações de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 73 |

| | |
|--|----|
| Tabela 18. Massa fresca e seca de brotações de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 74 |
| Tabela 19 Concentrações de clorofila <i>a</i> (mg/g massa fresca) em folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa | 76 |
| Tabela 20 Concentrações de clorofila <i>a</i> (mg/g massa fresca) em folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 76 |
| Tabela 21 Concentrações de clorofila <i>b</i> (mg/g massa fresca) em folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa | 77 |
| Tabela 22 Concentrações de clorofila <i>b</i> (mg/g massa fresca) em folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 77 |
| Tabela 23 Concentrações de clorofila total (mg/g massa fresca) em folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa | 78 |
| Tabela 24 Concentrações de clorofila total (mg/g massa fresca) em folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 78 |

| | |
|---|----|
| Tabela 25 Densidade estomática (estômatos/ mm ²) da face adaxial de folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa | 82 |
| Tabela 26 Densidade estomática (estômatos/ mm ²) da face adaxial de folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 83 |
| Tabela 27 Densidade estomática (estômatos/ mm ²) da face abaxial de folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa | 84 |
| Tabela 28 Densidade estomática (estômatos/ mm ²) da face abaxial de folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 84 |
| Tabela 29 Comprimento de células-guarda (µm) de estômatos da face adaxial de folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 85 |
| Tabela 30 Comprimento de células-guarda (µm) de estômatos da face abaxial de folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 86 |
| Tabela 31 Largura de células-guarda (µm) de estômatos da face adaxial de folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa | 87 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 32. Largura de células-guarda (μm) de estômatos da face abaxial de folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa | 87 |
| Tabela 33 Comprimento de células-guarda (μm) de estômatos da face adaxial de folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 88 |
| Tabela 34 Comprimento de células-guarda (μm) de estômatos da face abaxial de folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 88 |
| Tabela 35 Largura de células-guarda (μm) de estômatos da face adaxial de folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 89 |
| Tabela 36. Largura de células-guarda (μm) de estômatos da face abaxial de folhas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa..... | 89 |
| Tabela 37 Concentração de α -D-glucose em meio de cultura líquido suplementado com três concentrações de sacarose, em culturas de <i>Agapanthus umbellatus</i> var. minor, em biorreator de imersão temporária, sob duas intensidades luminosas..... | 109 |

INTRODUÇÃO GERAL

A produção e a comercialização de flores e plantas ornamentais vêm aumentando rapidamente no mundo nos últimos anos. Em parte, a expansão do comércio mundial de flores deve-se principalmente à diminuição das barreiras políticas e tecnológicas, melhoria da infra-estrutura e reconhecimento por muitos países em desenvolvimento de que a floricultura pode ser importante fonte de renda para a população e de divisas para o país (GORSEL, 1994).

Inicialmente, a produção de flores estava concentrada em alguns países europeus como Holanda, Itália e Dinamarca, e na Ásia, o Japão destacava-se como grande produtor. Esses países ainda destacam-se na produção de flores, principalmente pela questão cultural que estimula o consumo interno (MOTOS, 2000). Porém, com a globalização e com novos pólos de produção, visando principalmente baixar os custos através do plantio em regiões que possuam condições climáticas mais adequadas e disponibilidade de mão de obra, novos países surgiram como grandes produtores de flores. Dentre eles, se destacam: Colômbia, Equador, Costa Rica, Estados Unidos, Israel, África do Sul, Quênia, Espanha e Brasil (RISCH, 2003).

No Brasil, a produção e a comercialização de plantas ornamentais começou em escala comercial na década de 50, com imigrantes portugueses sediados no município de Guarulhos, Estado de São Paulo. Até então, a floricultura nacional era pouco expressiva, caracterizando-se como uma atividade paralela a outros setores agrícolas (MOTOS, 1998). Na época, constituía-se principalmente de cultivo de flores nos jardins e quintais de residências, onde desempenhavam função paisagística.

Na década de 60, os imigrantes japoneses iniciaram a atividade com plantas ornamentais em vários municípios da região da grande São Paulo. No início da década de 70, houve a estruturação do comércio de plantas ornamentais, sendo implantado um sistema de distribuição, com a criação do Mercado de Flores na Companhia de Entrepósito e Armazéns Gerais de SP - Ceagesp (MOTOS, 2000). Em 1972, foi implantada a Cooperativa Agropecuária Holambra por imigrantes holandeses. Com isso, o setor intensificou sua organização e desenvolveu a profissionalização do comércio de plantas ornamentais (BUDAG & SILVA, 2000).

Nos últimos cinco anos, a floricultura brasileira apresentou um crescimento na ordem de 20% ao ano, podendo ser considerada como um dos maiores setores da nossa economia agrícola (BONGERS, 2000; RIBEIRO & SALOMÉ, 2001; SEBRAE, 2003). O que até então era restrito ao território paulista, que atualmente é responsável por cerca de 70% da produção de flores e plantas ornamentais (INFORMATIVO IBRAFLO, 2003), passou a se estender a outros Estados brasileiros.

A participação do Brasil no mercado mundial de flores e plantas ornamentais, que movimentava valores superiores a US\$ 7 bilhões em exportação (EPAGRI, 2003), é ainda pouco expressiva, e representa apenas 0,2% do valor mundial. Todavia, o Instituto Brasileiro de Floricultura (IBRAFLO) estima que em curto prazo o Brasil possa ampliar sua cota de participação no mercado internacional para 1,5% (RISCH, 2003). Para que o Brasil amplie sua participação no mercado internacional de flores, o setor recebeu recursos da ordem de R\$ 6 milhões, liberados pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA) que foram destinados à pesquisa em floricultura (RISCH, 2003).

A produção brasileira de flores e plantas ornamentais está distribuída principalmente nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Pernambuco e Ceará (AKI & PEROSA, 2002). Desses pólos de produção, o Estado de Santa Catarina vem se destacando como o 4º produtor nacional de plantas ornamentais (EPAGRI, 2003), contribuindo com 8% da produção nacional, passando a ser, além de consumidor, um grande fornecedor de plantas ornamentais de jardim, para outros Estados do país (JACOBOWSKI et al., 1997). Isso demonstra o potencial de competitividade do Estado que vem se estruturando no que tange à organização dos produtores, à adoção de novas tecnologias, o aumento da área e de espécies cultivadas.

A floricultura catarinense está centrada na produção de plantas para jardim, que representa 65% da área cultivada. A área dedicada a flores de corte representa 4%, as plantas envasadas 5,5% e gramas, sementes em geral e flores secas, 25% (JACOBOWSKI et al., 1997).

Atualmente, a floricultura aparece como uma atividade econômica bastante relevante, em função do número de produtores envolvidos no processo e pelo valor da produção comercializada, que contribui na fixação do homem no campo. Em 1995, haviam 115 produtores de plantas ornamentais em Santa Catarina, com uma

média de 2,97 ha por propriedade (INFORMATIVO IBRAFLOR, 2001). Em 2003 houve um aumento de 370 produtores em 112 municípios, com uma média 3 ha por propriedade, num total de 917 ha, com um valor estimado de produção na ordem de R\$ 27,5 milhões (EPAGRI, 2003). Esses produtos da floricultura tem seu mercado preponderantemente nos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo, Goiás, Bahia e Minas Gerais (BÃNERAS, 2001).

Apesar do grande potencial que o Estado apresenta para a produção de plantas ornamentais, existem alguns obstáculos como a falta de profissionalização do setor, o acesso à tecnologia e os entraves burocráticos que oneram a produção. No entanto, o setor da floricultura no Estado busca melhorar a organização, contando com o apoio da Associação de Produtores de Plantas Ornamentais do Estado de Santa Catarina (APROESC), da Câmara Setorial de Flores e Plantas Ornamentais do Estado de Santa Catarina e do IBRAFLOR, que discutem e fomentam o desenvolvimento da floricultura nas áreas de produção, comercialização interna, exportação, ensino, pesquisa, assistência técnica, serviços e insumos (BUDAG & SILVA, 2000).

Com a crescente competitividade, o setor exige plantas com alto padrão, ciclo homogêneo e isentas de doenças. Neste sentido, os produtores necessitam investir na adoção de novas tecnologias. Até poucos anos, os produtores propagavam plantas e flores basicamente a partir de estacas, bulbos e sementes. Nos últimos anos, a micropropagação vem ganhando um espaço bastante significativo entre os produtores, que inicialmente evitavam adquirir mudas micropropagadas devido ao elevado custo unitário (MOTOS, 1998) e ao desconhecimento do potencial desta tecnologia.

No Estado de Santa Catarina o comércio de mudas micropropagadas é incipiente e necessita de aperfeiçoamentos. No entanto, há uma tendência desse mercado expandir-se devido à boa qualidade do produto, especialmente quanto a padronização e sanidade das plantas.

As pesquisas relacionadas à micropropagação de plantas ornamentais são escassas, com exceção de algumas realizadas empiricamente por iniciativa de produtores e outras desenvolvidas por institutos de pesquisa e universidades (BUDAG & SILVA, 2000). Porém, atualmente, algumas instituições do Estado como a EPAGRI e Universidades (Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC e Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI) estão desenvolvendo trabalhos de

pesquisas, através de convênios com produtores, para o desenvolvimento de tecnologias relacionadas à propagação de plantas ornamentais (EPAGRI, 2003).

Dentre os trabalhos realizados por pesquisadores da EPAGRI, resultados positivos no processo de micropropagação foram obtidos para *Phormium tenax* (FINCO & ZAFFARI, 2003) e *Sungonium podophyllum* (SCHWERTNER & ZAFFARI, 2003).

A Universidade Federal de Santa Catarina é uma das instituições que vêm desenvolvendo importante papel no desenvolvimento de pesquisas relacionadas à micropropagação de plantas ornamentais para espécies nativas tais como bromélias (ALVES, 2000; POMPELLI, 2002), *Heliconia angusta* Vell (MARAGONI, 2001), Hipeastrum (FLORES, 2004) e espécies exóticas como *Agapanthus umbellatus* var. minor (Figura 1). Esta última espécie apresenta grande potencial ornamental, cujas flores são utilizadas para corte devido a sua grande durabilidade. No entanto, o maior interesse econômico desta espécie é para uso como forração, podendo ser cultivada em bordaduras de canteiros, ao longo de muros, muretas ou paredes, em jardineiras, ou como grandes conjuntos em canteiros em pleno sol ou meia sombra (LORENZI & SOUZA, 1995).

Tradicionalmente, o *Agapanthus umbellatus* var. minor é propagado vegetativamente através da divisão de touceira (Figura 2), o que limita a propagação em massa, além de possibilitar a dispersão de pragas e doenças que podem estar presentes no viveiro de produção. Também pode ser propagada por sementes, mas este método de propagação não é eficiente devido à grande desuniformidade das plantas.



Figura 1 - Flores de *Agapanthus umbellatus* var. minor de plantas matrizes produzidas no viveiro de mudas do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias - UFSC – Florianópolis – SC.



Figura 2 - Touceiras de *Agapanthus umbellatus* var. minor de plantas matrizes produzidas no viveiro de mudas do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC – Florianópolis – SC.

Uma ferramenta que pode auxiliar no processo de produção de mudas dessa espécie e de outras que se propagam vegetativamente é a micropropagação. Com o uso desta técnica, torna-se possível aumentar o período de plantio, ampliando também a oferta de mudas livres de patógenos, facilitando a exportação e intercâmbio de material genético além de eliminar a necessidade de quarentena exigida pelos países importadores (PASQUAL et al., 1997).

A metodologia convencional de micropropagação baseia-se em culturas em pequenos frascos, com número reduzido de plântulas por frasco e uso de meio de cultura geleificado (MG), o que acarreta intensa manipulação das culturas e envolve mão-de-obra especializada (GEORGE, 1996; CALDAS et al., 1998). Porém, atualmente, há uma tendência em se usar biorreatores de imersão temporária (BIT) com igual ou até maior eficiência no processo de multiplicação, além de diminuir custos pela eliminação do ágar, mão-de-obra e manipulação do material. Este método é baseado no fato de que, quanto maior for a área de contato da planta com o meio de cultura, maior será a absorção de nutrientes e, conseqüentemente, maior será o crescimento da planta (DEBERGH, 1982; GEORGE, 1996; LORENZO et al., 1998; ETIENNE & BERTHOULY, 2002). Além do contato das plântulas com o meio de cultura com uma freqüência e tempo de imersão pré-estabelecidos, o BIT permite

a aeração dos tecidos e promove a renovação da atmosfera do frasco de cultura (ALVARD et al., 1993).

Estudos com micropropagação, utilizando o BIT, podem auxiliar no desenvolvimento de protocolos adequados da fase de multiplicação de espécies de grande importância econômica, constituindo assim uma ferramenta de grande valor para reproduzir um maior número de plantas, em menor área e menor custo (CASTRO & GONZÁLEZ, 2003). No entanto, para que um sistema de micropropagação apresente resultados economicamente viáveis é preciso estudar a composição do meio de cultura em relação às concentrações de macro e micronutrientes, vitaminas, reguladores de crescimento exógenos, fonte de carbono e agentes geleificantes. Segundo Caldas et al. (1998), estes são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento para a maioria dos sistemas de cultura de tecidos.

Além da composição do meio de cultura, onde os explantes são mantidos, o processo de micropropagação depende dos fatores inerentes ao tecido vegetal (genéticos e fisiológicos), a qualidade e intensidade de luz, o fotoperíodo, a temperatura, a umidade e o estresse mecânico, que determinam a indução, a multiplicação e o crescimento das brotações adventícias (MURASHIGE & SKOOG, 1962; SALISBURY, 1981; SHACKEL et al., 1990; DESJARDINS, 1995; GEORGE, 1996). Estes fatores também promovem mudanças anatômicas, morfológicas e fisiológicas em plantas micropropagadas, pois durante as fases da cultura *in vitro*, as plantas crescem sob baixas taxas de trocas gasosas, alta umidade do ar, baixa intensidade luminosa e uso de carboidratos como fonte de energia. Essas condições também podem causar mudanças em componentes metabólicos ligados ao sistema fotossintético, como nas clorofilas "a e b". Estas podem afetar o crescimento *in vitro* de plantas e na aclimatização, proporcionando perdas elevadas após a transferência para condições *ex vitro* (SCIUTI & MORINI, 1993; DESJARDINS, 1995; POSPÍSILOVÁ et al., 1999; CALVETE et al., 2002).

Atualmente, os sistemas de cultura de plantas *in vitro* estão sendo ajustados na medida em que se ampliam os conhecimentos de fisiologia vegetal nas áreas relacionadas com a fotossíntese, relações hídricas, atividade enzimática e nutrição mineral. Os trabalhos de pesquisas na área do controle do ambiente também têm gerado informações valiosas para os procedimentos adotados nos sistemas de cultura *in vitro*.

Neste sentido, estudos sobre a influência da fonte de carbono, juntamente com a intensidade luminosa e trocas gasosas, no comportamento morfo-fisiológico e bioquímico de plantas de *Agapanthus umbellatus* var. minor, que ocorrem durante a fase de multiplicação, se revelam de extrema importância. A metabolização das concentrações de açúcares no meio de cultura também são importantes, pois constituem informações básicas para a produção de mudas em larga escala.

Tendo em vista a importância econômica e os poucos trabalhos encontrados para *Agapanthus umbellatus* var. minor em relação ao processo de micropropagação, o presente trabalho objetiva avaliar a eficiência da multiplicação em massa dessa espécie. Assim, foi realizada a comparação entre o meio geleificado e biorreator de imersão temporária. Também foram avaliados os efeitos morfo-fisiológicos que os dois sistemas proporcionam à espécie.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKI, A. & PEROSA, J. M. Y. Aspectos da produção e consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 8, n. 1/2, p. 13 - 23, 2002.

ALVES, G. M. **Micropropagação e conservação de *Vriesea reitzii* e *Vriesea friburgensis* var. *paludosa***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000. 97 p.

ALVARD, D, COÔTE, F. & TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for bananas micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 32, p. 55 - 60, 1993.

BÃNERAS, J. C. **IBRAFLOR – Informativo**. Abril. n. 24, 2001.

BONGERS, F. J. G. **IBRAFLOR – Informativo**. Maio. Ano V, n. 22, 2000. 12p.

BOTANY. Disponível em: <<http://www.botany.com>> Acesso em 20 de nov. de 2003

BUDAG, P. R.; SILVA. T. P. da. **Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: flores e plantas ornamentais**. Florianópolis: Epagri, 2000. 51 p. (EPAGRI. Boletim Técnico, 106).

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI. v. 1, p. 87 - 132, 1998.

CALVETE, E. O.; AZEVEDO, M., BORDIGNON, M. I. I.; SUZIN, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 649 - 653, dez., 2002.

CASTRO, D. R.; GONZÁLEZ, J. O. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. **Agricultural Técnica**, Chile, v. 62, n.1, p.68 - 78, ene.-mar., 2003.

DEBERGH, P. C. Physical properties of culture media. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Japan: Tokyo, p. 135 - 136, 1982.

DESJARDINS, Y.; HDIDER, C.; RICK, J de. Carbon nutrition *in vitro* - regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In: CHRISTIE, J. A.; KOZAI.T; SMITH, M. A.L, **Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture**, Netherlands, p. 441 - 471, 1995.

EPAGRI Projetos: Floricultura. Disponível em: <<http://www.epagri.rct-sc.br>> Acesso em 15 de fev. de 2003

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 69, p. 215 - 231, 2002.

FINCO, A. B. & ZAFFARI, G. R. Micropropagação de *Phormium tenax*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS,1., 2003, Lavras, M G. – **Anais...** Lavras: SBFPO, ABCTP, p. 370, 2003.

FLORES, P.S. **Propagação *in vitro* e *in vivo* de *Hippeastrum aulicum* (Ker. Gawler) Herb. Amaryllidaceae.** Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003. 137 p.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture.** Part 2. In Practice. Eversley: Exergetics, 2 ed, v. 2, 1996. 1361p.

GORSEL, R. V. Postharvest technology of imported and trans-shipped tropical floricultural commodities. **Horticulture Science**, Alexandria, v. 29, n. 9, p. 979 - 981, 1994.

IBRAFLO, Boletim Informativo do Instituto Brasileiro de Floricultura, 2001

IBRAFLO, Boletim Informativo do Instituto Brasileiro de Floricultura, 2003

JACOBOWSKI, G. G.; BANERAS, J. C.; MÜLLER, J. J. V.; MELLO, N. M. de. **Cadastro dos produtores de flores e plantas ornamentais de Santa Catarina.** Joinville, SC: Aproesc/Epagri, 1997. 39p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M de; **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras.** Nova Odessa, São Paulo: Editora Plantarum, 1995. 734p.

LORENZO, J. C.; GONZÁLEZ, B. L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in na improved temporary immersion system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 54, p. 197 - 200, 1998.

MARAGONI, A. **Propagação ex vitro e in vitro de *Heliconia angusta* Vell.** Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001. 85 p.

MOTOS, J. R. **IBRAFLOR – Informativo**. Setembro. Ano IV, n. 17, p. 03 - 05, 1998.

MOTOS, J. R. **IBRAFLOR – Informativo**. Maio. Ano V, n. 19, p. 05 - 07, 2000.

MURASHIGE, T.; & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473 - 497, 1962.

PASQUAL, M.; CARVALHO, G. R.; HOFFMAN, A. & RAMOS, J. D. **Aplicações no melhoramento genético de plantas**. Fundação de Apoio e Pesquisa e Extensão – FAEP/ Universidade Federal de Lavras – UFLA. 1997. 117p.

POMPELLI, M. F. **Morfogênese in vitro, métodos de micropropagação e conservação de germoplasma de *Dyckia distachya* Hassler**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002. 93 p.

POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; HADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated to ex vitro conditions. **Biology Plantarum**, Prague, v. 42, n. 4, p. 481 - 497, 1999.

RIBEIRO, C. S.; SALOMÉ, J. R. O potencial do mercado de flores e plantas ornamentais no contexto do comércio internacional. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS,13., 2001, São Paulo. – **Resumos...** São Paulo: SBFPO, p. 24, 2001

RISCH, O. A. **O mercado de plantas ornamentais**. Disponível em: <<http://www.floresta.ufpr.br>> Acesso em 05 de dez. de 2003.

SALISBURY, F. B. Responses to photoperiod. In: PITSON, A. & ZIMMERMANN, M. H. (Ed.). **Encyclopedia of Plant Physiology**. New series 12 A. Springer – Verlag, Berlin, p. 134 - 167, 1981.

SCIUTTI, R. & MORINI, S. Modified stomatal characteristics in actively proliferating *in vitro* plum cultures at varying levels of relative humidity. **Advance Horticulture Science**, v. 7, p. 157 - 159, 1993.

SEBRAE – Agência de Notícias. Disponível em: <<http://www.df.sebrae.com.br>> Acesso em 20 de out. de 2003.

SHACKEL, K. A.; NOVELLO, V. & SUTTER, E.G. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 115, n. 30, p. 468 - 472, 1990.

SCHWERTNER, A. B. S. & ZAFFARI, G. R. Produção de mudas de *Syngonium podophyllum* (Araceae) *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS,14., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS,1., 2003, Lavras, M G. – **Anais...** Lavras: SBFPO, ABCTP, p. 371, 2003.

Capítulo I

**Multiplicação de *Agapanthus
umbellatus* var. minor em meio
geleificado e em biorreator de
imersão temporária**

RESUMO

Agapanthus umbellatus var. *minor* é uma planta ornamental muito utilizada como flor de corte devido à sua durabilidade. No entanto, o maior interesse econômico nesta espécie decorre do seu uso como forração em jardins e praças. Sua propagação é tradicionalmente efetuada através da divisão de touceiras, o que limita sua propagação em massa, além de permitir a difusão de pragas e doenças. Com a utilização da micropropagação é possível ampliar o plantio com mudas de alta qualidade, pela produção de plantas livres de patógenos. Na metodologia convencional de micropropagação utiliza-se meio nutritivo geleificado, o que acarreta intensa manipulação das culturas e envolve um grande contingente de mão-de-obra especializada. Porém, há uma tendência em se utilizar biorreatores em meio líquido com igual ou até melhor eficiência do processo de multiplicação, além de diminuir o custo pela eliminação do ágar. O presente trabalho teve como objetivo comparar a eficiência do uso do meio geleificado (MG) e de biorreator de imersão temporária (BIT), visando a propagação em massa de *Agapanthus umbellatus* var. *minor*. Para tanto, foram determinadas as melhores concentrações de BAP para a fase de multiplicação *in vitro* e o desempenho das plântulas durante a fase de aclimatização. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Foram testados dois sistemas de multiplicação e quatro concentrações (0,0; 8,9; 17,8 e 35,6 μM) de BAP no meio de cultura, em um total de oito tratamentos, formando um fatorial 2 x 4. Os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento, com 16 horas de fotoperíodo com intensidade luminosa de 215 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ provinda de lâmpadas fluorescente branca fria (PHILIPS – TLT 40W) e temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, por um período de 60 dias. As avaliações de crescimento e desenvolvimento aos 60 dias mostraram que ambos os sistemas foram eficientes, tanto na fase de multiplicação quanto na fase de aclimatização das plantas produzidas. Dentre as concentrações utilizadas nos sistemas recomenda-se para o MG a concentração de 17,8 μM de BAP e para o BIT a concentração de 8,9 μM de BAP.

ABSTRACT

Agapanthus umbellatus var. minor is an ornamental plant quite used as cut flower due to your durability. However, the largest economical interest in this species goes of your use as lip in gardens and squares. Your propagation is traditionally made through the burst of roots division, what limits your propagation in large scale, besides allowing the diffusion of curses and diseases. With the use of the micropropagation it is possible to enlarge the planting with seedlings of high quality, for the production of plants free from disease. In the conventional methodology of micropropagation nutrient medium semi-solid is used, what carts intense manipulation of the cultures and it involves a great skilled labor contingent. However, there is a tendency in using systems in liquid medium with equal or even better efficiency of the multiplication process, besides reducing the cost for the elimination of the agar. The present work had as objective compares the efficiency of the use of the semi-solid medium (MG) and of the biorreator of temporary immersion (BIT) in liquid medium seeking the propagation in mass of *Agapanthus umbellatus* var minor during the multiplication phase. For so much, they were certain the best concentrations of growth of regulators growth (BAP) for the phase of multiplication *in vitro* and the acting of the plantlets during the acclimatization phase. The used line experimental was casualty entirely. Two multiplication systems and four concentrations were tested (0,0; 8,9; 17,8 and 35,6 μM) of BAP in the medium of culture, in a total of eight treatments, forming a factorial 2 x 4. The flasks containing the explants was maintained in growth room, with 16 hours of light spring of light bulb fluorescent white cold (PHILIPS–TLT 40W), with luminous intensity of $215 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and medium temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, for a period of 60 days. The growth evaluations and development to the 60 days showed that both systems were so much efficient in the multiplication phase as in the phase of acclimatization of the produced plants. Among the concentrations used in the systems it is recommended for MG the concentration of 17,8 μM of BAP and for BIT the concentration of 8,9 μM of BAP.

1 INTRODUÇÃO

Agapanthus umbellatus var. minor também conhecida como Agapanthus ou Lírio do Nilo, é uma angiosperma da família *Amaryllidaceae*, pertencente à ordem Liliales (BOTANY, 2003). É uma espécie ornamental, herbácea, perene, com folhas laminares. Destaca-se pelas suas inflorescências globulosas, densas, eretas, com flores azuis (Figura 1), apresentando floração na primavera-verão, podendo ocorrer variedades de flores azul-claras e brancas (LORENZI & SOUZA, 1995).

O maior interesse econômico nesta espécie é para uso como forração, podendo ser cultivada em bordaduras de canteiros, ao longo de muros, muretas ou paredes. Além disso, suas flores podem ser utilizadas para corte devido a sua grande durabilidade.

Tradicionalmente, *Agapanthus umbellatus* var. minor é propagado vegetativamente através da divisão de touceira. No entanto, esta técnica apresenta uma série de desvantagens, visto que a taxa de propagação é baixa, cerca de dez mudas por planta ao ano, além de possibilitar a dispersão de pragas e doenças que poderão ocorrer no viveiro de produção.

A micropropagação pode ser uma ferramenta muito promissora para esta e outras espécies onde métodos de propagação tradicionais são pouco eficientes. Esta técnica concentra-se principalmente na limpeza clonal e na multiplicação de espécies (GRATAPAGLIA & MACHADO, 1998), incluindo as de valor ornamental.

Poucos trabalhos foram encontrados referentes à produção de mudas para a espécie em estudo e que se encontra em expansão. Exterckoter & Pedrotti (2001) obtiveram resultados promissores utilizando o sistema de multiplicação em meio geleificado, através de organogênese direta a partir de botões florais. Suzuki et al. (2002) obtiveram mudas de *Agapanthus* a partir de calos embriogênicos, porém com a espécie *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton).

Embora estudos envolvendo o processo de micropropagação de plantas ornamentais sejam ainda incipientes, há uma tendência de expandir-se devido à boa qualidade do produto final através desta técnica, especialmente quanto à padronização e sanidade das plantas. Com a crescente competitividade do mercado, esta técnica vem ganhando um espaço bastante significativo, não só no que diz

respeito à pesquisa, mas também entre os produtores, que inicialmente evitavam adquirir mudas micropropagadas devido ao elevado custo unitário (MOTOS, 1998).

A micropropagação compreende um conjunto de técnicas de propagação vegetativa *in vitro* e utiliza propágulos de pequeno tamanho. Isso constitui-se numa das principais aplicações da cultura de tecidos (HOFFMANN et al., 1997). Com esta técnica obtém-se altas taxas de multiplicação, produzindo plantas saudáveis e uniformes a partir de um único explante, em um curto período de tempo e um espaço físico reduzido.

O processo de micropropagação compreende três etapas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998 e MANTELL et al., 1994). Na Etapa I ocorre a seleção de explantes adequados, sua esterilização e transferência para meios de cultura; Na Etapa II ocorre a proliferação de brotos em meio de multiplicação (fase de multiplicação). Embora o principal objetivo desta fase seja produzir o maior número de plantas possível, no menor espaço de tempo, alguns aspectos qualitativos importantes devem ser considerados. Não basta obter altas taxas de multiplicação para apenas alguns explantes. O importante é obter o maior número de plantas com alta qualidade e com o mínimo de variação entre explantes. Outro aspecto essencial é a homogeneidade do material vegetal produzido, pois isso irá determinar o sucesso das fases posteriores. A Etapa III compreende a transferência de brotos para um meio de enraizamento (ou manutenção), seguindo-se, mais tarde, a fase de aclimatização ou transplante para o solo ou em algum substrato conveniente.

Na fase de multiplicação *in vitro*, ocorre o processo de morfogênese dos explantes que é regulado pela interação entre os fitorreguladores de crescimento presentes no meio de cultura, principalmente pelas auxinas e citocininas (SKOOG & MILLER, 1957). Segundo Taiz & Zeiger (2004), os fitorreguladores agem como sinais químicos para estimular, inibir ou regular o crescimento e o desenvolvimento de plantas. Em cultura de tecidos, as citocininas apresentam um papel importante para promover a divisão celular e agir na indução e no desenvolvimento de meristemas conduzindo a formação de órgãos, principalmente de novas brotações. No entanto, para o desenvolvimento de brotações axilares, o broto principal deve perder a dominância apical e o explante necessita da aplicação de citocininas exógenas (TAMAS, 1995).

Dentre os inúmeros fitorreguladores, a BAP (6 - Benzilaminopurina) tem sido muito eficaz para promover a proliferação de eixos caulinares em diversas espécies,

e parece ser a citocinina mais usada para a indução de meristemas de parte aérea (MANTELL et al., 1994; GEORGE, 1996; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Além do tipo e concentração de citocinina utilizado na fase de multiplicação *in vitro*, concentrações de macro e micronutrientes, vitaminas e carboidratos também influenciam na fase de multiplicação (CALDAS et al., 1998). Vários meios básicos têm sido utilizados na multiplicação de plantas, sendo que a maioria se baseia no meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Modificações deste meio têm apresentado bons resultados para diversas espécies (SILVEIRA et al., 2001).

Durante a fase de multiplicação, o meio de cultura usado tradicionalmente é o geleificado (MG). No entanto, nestas condições são necessárias periódicas transferências dos explantes para frascos contendo meio novo, depois de subcultivá-los durante 4 a 6 semanas. Isto ocorre devido à exaustão dos nutrientes do meio e pelo contínuo crescimento e proliferação de brotações, além do limitado tamanho do frasco de cultura (MAENE & DEBERGH, 1985).

A transferência dos explantes envolve custos com mão-de-obra e aumenta o risco de contaminação e danos nos tecidos (WEATHERS & GILES, 1988). Os altos custos de produção têm limitado o uso comercial da micropropagação, pois o valor unitário é alto, tornando-se inviável para a produção de espécies ornamentais e frutíferas (SLUIS & WALKER, 1985; SIMONTON et al., 1991).

Atualmente, há uma tendência para usar meio líquido em biorreatores de imersão temporária (BIT), em virtude do maior crescimento dos explantes. A taxa de proliferação de plântulas nesse meio é geralmente maior do que aquelas obtidas no MG, sendo que o meio pode ser renovado sem a troca do recipiente (ETIENNE & BERTHOULY, 2002).

O meio líquido em biorreatores de imersão temporária combina a aeração dos tecidos, promovendo a renovação da atmosfera dos frascos de cultura, e o contato das plântulas com o meio de cultura líquido, com uma frequência e tempo de imersão pré-estabelecidos. Estas características não são geralmente combinadas nos trabalhos clássicos realizados *in vitro*, onde o meio líquido permanece estagnado no fundo do frasco (ALVARD et al., 1993).

O BIT foi descrito inicialmente por Teisson & Alvard (1985). Este método baseia-se no princípio de que as plântulas se desenvolvem melhor e mais rapidamente quando cultivadas em meio líquido seguido de drenagem do meio em intervalos pré-estabelecidos. O maior contato das plântulas com o meio de cultura

aumenta consideravelmente a absorção de nutrientes, uma vez que esses podem ser absorvidos pelas folhas, caules e raízes (DEBERGH, 1982; GEORGE, 1996). Em tese, as plântulas absorvem mais nutrientes no BIT do que no sistema tradicional de micropropagação utilizando ágar, conseqüentemente, produzem mais fitomassa.

A simplicidade e o baixo custo dos biorreatores faz com que o BIT em meio líquido torne-se ideal para automação em larga escala da micropropagação de plantas (AITKEN-CHRISTIE, 1991; ALVARD et al., 1993; ETIENNE & BERTOULHY, 2002; CASTRO & GONZÁLEZ, 2003). Tal sistema, através da eliminação do ágar, além de reduzir os custos na multiplicação de cana-de-açúcar em 46% (LORENZO et al., 1998) e de abacaxi em 20% (ESCALONA et al., 1999), comparado com o processo de multiplicação convencional, também permitiu maior uniformidade das plântulas nas condições de cultura (DEBERGH, 1988; AITKEN-CHRISTIE, 1991; GEORGE, 1996 ; TEISSON & ALVARD, 1994; MEIRA, 2002).

No entanto, fatores como o tempo de imersão, que está ligado aos fatores de aeração, os quais variam de acordo com a espécie, influenciam no desempenho do material vegetal no BIT. Um tempo muito longo de imersão para determinada espécie pode proporcionar hiperhidricidade ou vitrificação ou até mesmo asfixia das plantas (ETTIENNE & BERTHOULY, 2002). Outro fator que influencia no desempenho da proliferação de brotações em biorreatores de imersão é o volume do frasco e do meio de cultura. Para explantes de *Saccharum spp*, um aumento na taxa de multiplicação de 8,3 brotos a cada 30 dias para 29,9 brotos a cada 30 dias foi obtido pela multiplicação do volume de meio inicial de cinco para 50,0 mL/explante, sendo portanto, este o volume ótimo indicado para a proliferação de brotações desta espécie (Lorenzo et al., 1998).

Vários trabalhos com diferentes espécies como *Coffea arabica* (ETIENNE et al., 1997), *Citrus deliciosa* (CABASSON et al., 1997), *Saccharum spp*. (LORENZO et al., 1998), *Ananas comosus* (ESCALONA et al., 1999), *Musa sp* (LEMOS, 2001); *Lilium* (LIAN et al.,2003), *Artemisia annua* L. (LIU et al.,2003) e *Hipericum perforatum* L. (ZOBAYED & SAXENA, 2003), utilizando BIT, apresentaram melhores resultados quanto a proliferação de eixos caulinares. Além disso, estes autores também observaram que o material regenerado no BIT apresentou aumento na taxa de sobrevivência e no vigor das plantas na fase de aclimatização, quando comparado com o sistema convencional de multiplicação em meio de cultura geleificado.

O aumento na taxa de sobrevivência e no vigor das plântulas é um aspecto muito importante, pois a aclimatização é uma das fases mais críticas do processo de micropropagação, tendo em vista que um dos problemas na produção de mudas via multiplicação, em escala comercial, é a dificuldade de readaptação das plantas ao ambiente *ex vitro* (DESJARDINS, 1995).

No processo de micropropagação em larga escala, mesmo um percentual aparentemente baixo de morte de plântulas pode significar um prejuízo econômico considerável devido ao alto investimento e emprego de mão-de-obra nessa técnica. Além disso, o tempo para aclimatização e a qualidade das mudas podem ser otimizadas se a fase de multiplicação for bem conduzida.

O presente trabalho teve como objetivo comparar a eficiência do uso do meio geleificado (MG) e biorreator de imersão temporária (BIT), visando a propagação em massa de *Agapanthus umbellatus* var minor durante a fase de multiplicação. Essa comparação foi realizada com base na hipótese de que o meio líquido em BIT proporciona uma maior taxa de proliferação de brotos do que aquelas obtidas no MG. Para tanto, foram determinadas as melhores concentrações de BAP para fase de multiplicação *in vitro* de *Agapanthus umbellatus* var. minor, utilizando os dois sistemas de multiplicação. Também foi comparada a eficiência dos dois sistemas de multiplicação na fase de multiplicação e posteriormente na fase de aclimatização.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Neste trabalho foram utilizadas plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor produzidas *in vitro*, no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis-SC. O material foi originado a partir de organogênese direta em botões florais, segundo metodologia desenvolvida por Exterckoter & Pedrotti (2001).

2.2 Fase de multiplicação em dois sistemas de multiplicação

As melhores concentrações de BAP para a fase de multiplicação *in vitro* de *Agapanthus umbellatus* var. minor foram determinadas e comparadas em relação à eficiência de dois sistemas de multiplicação. Os sistemas de multiplicação avaliados foram meio geleificado (MG) e biorreator de imersão temporária (BIT). Para isso, foram utilizados explantes obtidos da terceira repicagem, mantidos em meio geleificado MS + 17,8 µM de BAP. Os explantes foram individualizados e padronizados, tendo suas folhas cortadas antes de serem inoculados. O tamanho dos explantes variou entre 2,5 e 3,0 cm de comprimento e cada explante possuía três folhas.

O experimento teve um delineamento inteiramente casualizado. Foram testados dois sistemas de multiplicação e quatro concentrações de BAP (0,0; 8,9; 17,8 e 35,6 µM) no meio de cultura, com pH ajustado com NaOH (1N) em 5,9 antes da autoclavagem (durante 15 minutos, sob 121°C), em um total de oito tratamentos, formando um fatorial 2 x 4.

Em MG, os explantes foram transferidos para frascos de cultura contendo 50 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) em condições assépticas, suplementado com agente geleificante, ágar (Vetec) 0,6%. Cada tratamento foi composto por três repetições, contendo dez frascos com cinco explantes cada, totalizando 50 plantas/repetição. Os frascos contendo os explantes foram mantidos

em sala de crescimento, com 16 horas de fotoperíodo provido por lâmpadas fluorescente branca fria (PHILIPS – TLT 40W), com intensidade luminosa de 215 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, por um período de 60 dias.

No BIT, os explantes foram transferidos para frascos contendo 500 mL de meio MS líquido (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Cada tratamento do BIT foi composto por três frascos (repetição) contendo 50 plantas cada. Os frascos e o meio de cultura foram autoclavados separadamente, sendo que o tempo para os frascos de imersão foi de 30 minutos e para o meio líquido foi de 15 minutos.

2.2.1 Avaliação das Características Morfológicas dos explantes

As características morfológicas dos explantes de *Agapanthus umbellatus* var. minor obtidas nos dois sistemas de multiplicação foram avaliadas quanto ao número e altura das brotações (cm), número e comprimento de raízes (cm), número de folhas, massa fresca e seca (mg) da parte aérea e raiz.

A altura de brotações e o comprimento de raízes foram determinados utilizando-se uma régua graduada (mm). A massa fresca e seca da parte aérea foram determinadas utilizando-se amostras de 25 plântulas por repetição esolhidas ao acaso. Após a lavagem das plântulas, as raízes foram separadas da parte aérea e colocadas em papel toalha para secar, sendo em seguida pesadas em uma balança de precisão (KERN, 430-21). Após a pesagem, a parte aérea foi acondicionada em sacos de papel e mantida em estufa a 60°C , por 24 horas. Após esse período, o material foi pesado na mesma balança de precisão para determinar a massa seca.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando detectados efeitos significativos entre os tratamentos, a comparação das médias foi realizada pelo teste de Duncan, a um nível de 5% de probabilidade, conforme recomendações de Stell & Torrie (1980).

Valores obtidos para as variáveis número de brotações, número de raízes e número de folhas foram transformados em $\sqrt{x + 1}$.

2.2.2 Descrição de Biorreator de Imersão Temporária (BIT)

O BIT (Figura 3) construído no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV/CCA/UFSC) é constituído de dois frascos. Um frasco, com capacidade de 1 litro, é utilizado como depósito do meio de cultura. O outro frasco, com capacidade de 3 litros, é utilizado para o cultivo dos explantes. Os frascos são dispostos um sobre o outro, conectados entre si por um tubo de silicone (Figuras 3 e 4). Cada frasco apresenta um orifício, no qual o compartimento inferior serve para a entrada de ar comprimido e o compartimento superior serve para a saída de ar. Esses orifícios são providos de mangueiras de silicone com filtro Millipore (0,2 mm de poro Millex – FG50) a fim de evitar a contaminação interna.

O meio de cultura líquido permanece depositado no frasco inferior. A cada 2 horas, durante o período claro da sala de crescimento, o meio líquido é bombeado para o frasco superior, durante 1 minuto. Para o bombeamento é utilizada uma bomba de ar (Nevoni), regulada por um temporizador digital programado (Gubintec TI-12A). Após a transferência de todo o meio para o compartimento superior, o ar excedente promove a aeração do meio em contato com os explantes. Então, o ar é expelido através de um orifício no frasco do compartimento superior. Após o período de 1 minuto, a pressão do ar no compartimento inferior cessa, o que, por gravidade, promove o retorno do meio ao compartimento inferior, permanecendo aí até que o ciclo se repita.

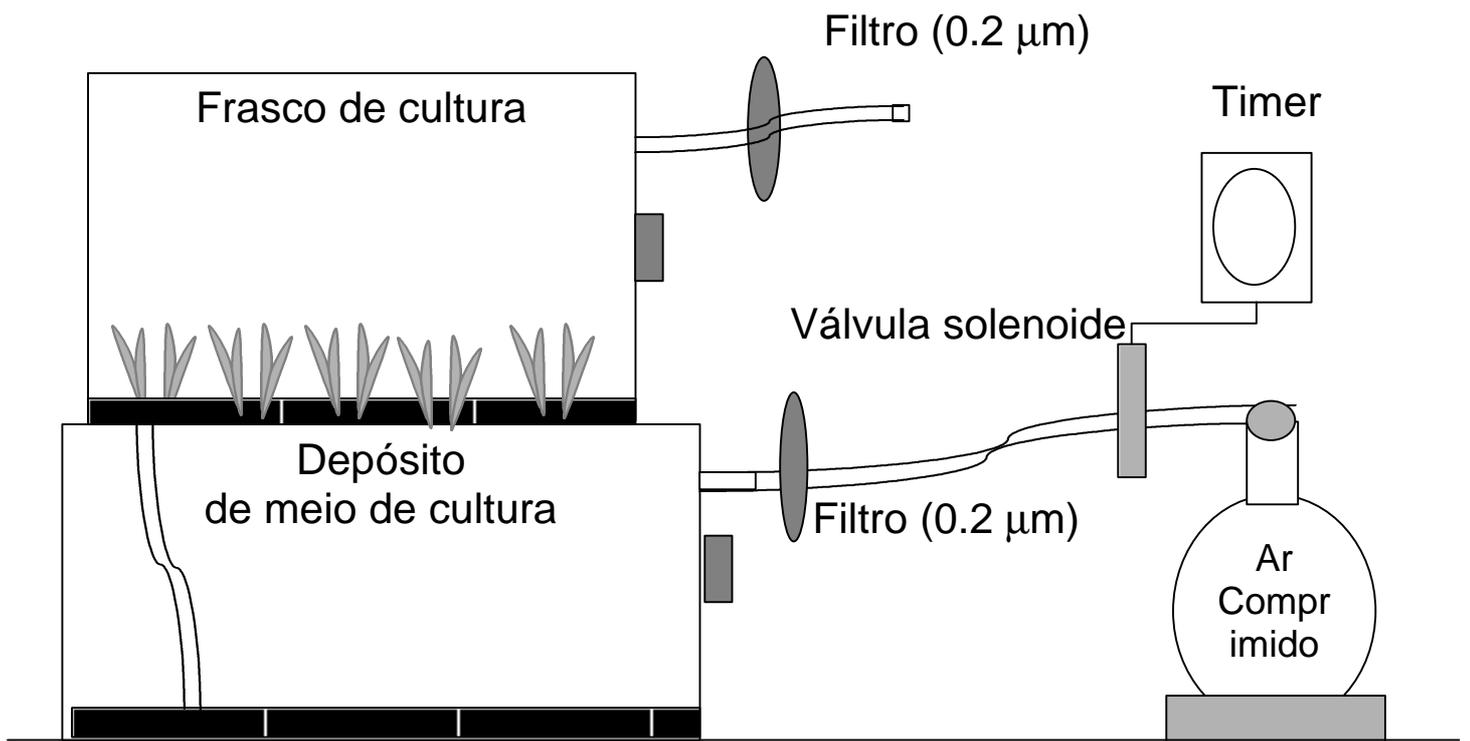


Figura 03 - Esquema do biorreator de imersão temporária (BIT) utilizado para a fase de multiplicação de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor construído no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV/CCA/UFSC).

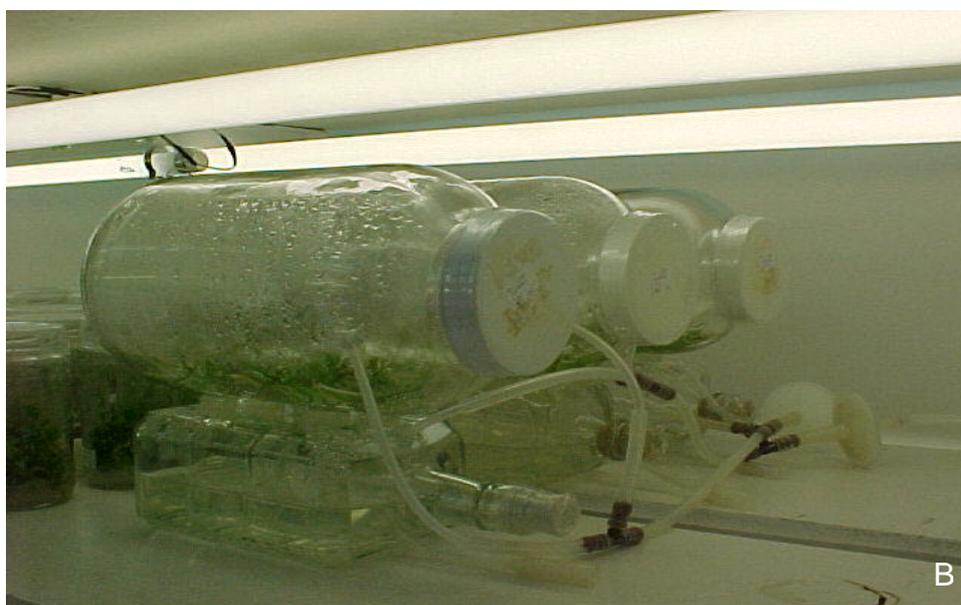


Figura 04 - Biorreator de imersão temporária construído no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) – UFSC – Florianópolis – SC, utilizado na fase de multiplicação em meio líquido de *Agapanthus umbellatus* var. minor (A: Frascos contendo plântulas de *Agapanthus*, B: Conjunto de frascos com tubos e filtros).

2.3 Fase de aclimatização

Com o objetivo de estudar o desempenho de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor durante a fase de aclimatização, plântulas multiplicadas em MG e no BIT, por um período de 60 dias de cultura, foram retiradas dos frascos de cultura. As raízes, quando formadas, foram lavadas para a retirada do meio e seccionadas em segmentos de 0,5cm de comprimento e em seguida foram tratadas com AIB (Ácido indol-3-butírico), na forma de talco, na concentração de 1000 ppm. Após, as mesmas foram transferidas para substrato (casca de arroz carbonizada) em bandejas de isopor de 128 células, com capacidade de 30 mL cada. As bandejas foram mantidas em caixas plásticas, cobertas com tampas de vidro e transferidas para a sala de aclimatização com temperatura de $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$, intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescente branca fria (PHILIPS – TLT 40W), umidade relativa de $70 \pm 10\%$, conforme recomendação de Pedrotti & Voltolini (2001), por um período de 30 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, composto de oito tratamentos descritos para a fase de multiplicação na página 20, com três repetições de 25 plântulas cada.

As variáveis avaliadas foram: porcentagem de sobrevivência e enraizamento, número e comprimento total das raízes produzidas.

Os dados obtidos desse experimento foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan 5%, conforme recomendações de Stell & Torrie (1980).

Valores obtidos para a variável número de raízes foram transformados em $\sqrt{x+1}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Comparação da eficiência entre o sistema convencional em meio geleificado e biorreator de imersão temporária em meio líquido durante a fase de multiplicação de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor

O número de brotações/explante de agapanthus submetidos aos dois sistemas de multiplicação e às quatro concentrações de BAP é apresentado na Tabela 1. Deve-se ressaltar que houve interação entre as concentrações de BAP e os sistemas de multiplicação para essa variável. Assim, verificou-se que o MG e o BIT proporcionaram o maior número de brotações/explante, quando foi utilizada a concentração de 17,8 μM de BAP 35,6 μM de BAP, respectivamente (Tabela 1). No entanto, o número de brotações obtido na concentração de 8,9 μM de BAP no BIT não diferiu significativamente do valor obtido em 35,6 μM de BAP (Tabela 1).

Tabela 1 - Número de brotações/explante de *Agapanthus umbellatus* var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e a quatro concentrações de BAP, após 60 dias de cultura.

| Concentração de BAP (μM) | Sistemas de Multiplicação | |
|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| | Meio geleificado ¹ | Imersão Temporária ¹ |
| 0 | 2,84cA | 3,41 bA |
| 8,9 | 3,80 bA | 4,01 abA |
| 17,8 | 5,24 aA | 3,67 bB |
| 35,6 | 3,97 bA | 4,67 a A |
| CV % | 4,69 | |

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

¹ Observações transformadas em $\sqrt{x+1}$

Aparentemente, é possível obter maior número de brotação/explante no BIT com o aumento da concentração de BAP, tendo em vista que o comportamento dessa variável foi linear nesse sistema (Figura 5). Possivelmente, este resultado

deve-se ao fato de que a absorção dos fitorreguladores de crescimento é diretamente proporcional à concentração no meio de cultura (VOGELMANN et al., 1984). Ou seja, explantes em meio com maiores concentrações de BAP tendem a absorver maiores quantidades deste fitorregulador e emitir maior número de brotações (YUI et al., 1993).

No entanto, a concentração de BAP no meio de cultura para multiplicação de brotações também está relacionada com a quantidade de citocinina endógena do explante, não esquecendo do efeito residual que este fitorregulador apresenta de uma subcultura para outra. Segundo Schuch & Peters (1993) e Moncaleán et al. (2003), a citocinina endógena interage com o BAP do meio de cultura, influenciando a multiplicação de brotações. No entanto, isso depende do meio, da eficiência de transporte do BAP e do metabolismo deste, podendo requerer menores ou maiores concentrações de BAP exógeno.

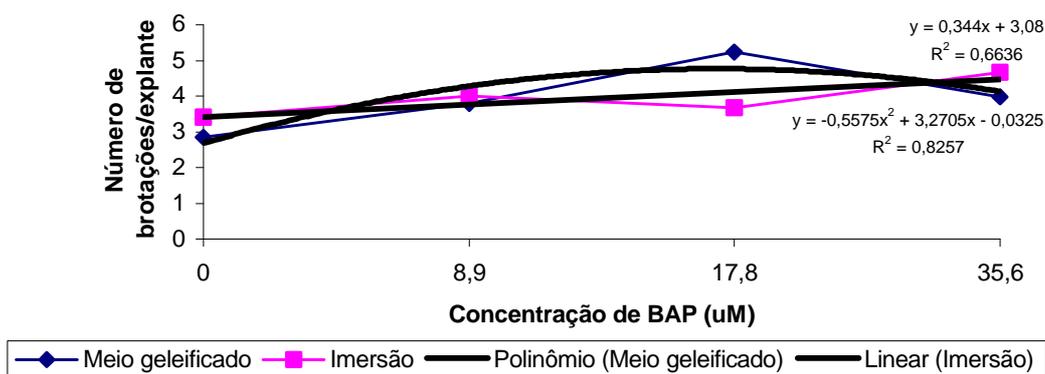


Figura 05 - Efeito de concentrações de BAP na fase de multiplicação de *Agapanthus umbellatus* var. minor em sistemas de multiplicação: em meio geleificado e em biorreator de imersão temporária.

O número de brotações/explante em meio geleificado apresentou um comportamento quadrático, visto que o maior valor foi obtido na concentração de 17,8 µM de BAP. Plântulas multiplicadas nesse sistema em concentrações acima desse valor apresentaram fitotoxicidade, diminuindo severamente o número de brotações produzidas (Figura 5). Provavelmente, estas respostas resultam de

processos bioquímicos tal como a absorção do BAP, sua distribuição e metabolismo, fatores esses que afetam a quantidade de compostos livres no tecido (MONCALEÁN, 1999). O metabolismo que os fitorreguladores de crescimento aplicados exogenamente estão sujeitos, podem variar de acordo com as condições do meio e a concentração aplicada (MONCALEÁN et al., 2003).

A presença de agentes geleificantes no meio de cultura pode ser um fator que influi nas condições do meio de cultura. Segundo George (1996) e Feito et al. (2001), o ágar impede a difusão do fitorregulador no meio geleificado. Assim, reduz a concentração do regulador na área direcionada para o broto e resulta em um menor gradiente meio-explante. Esta pode ser a razão para a lenta absorção de BAP, que pode facilitar a inativação do fitorregulador ou compartimentalização em um caminho mais eficiente.

Embora, o principal objetivo da fase de multiplicação seja produzir o maior número possível de plântulas, a qualidade do desenvolvimento das plântulas *in vitro* também deve ser considerada quando se pretende determinar a melhor concentração de BAP. Isto porque, plântulas pequenas não são desejáveis no processo de multiplicação, pois necessitam de uma fase de alongamento antes da fase de enraizamento, para que não ocorram perdas elevadas na fase de aclimatização.

Ao analisar a altura das brotações (Tabela 2), número de folhas/brotações (Tabela 3), número de raízes/brotações (Tabela 4), massa fresca (Tabela 5) e massa seca das brotações (Tabela 6), observa-se que não houve interação entre os fatores sistemas de multiplicação e concentrações de BAP. Nesse aspecto, ocorreu apenas efeito simples dos fatores. Observa-se ainda que para massa fresca/brotação (Tabela 5) não houve efeito desses dois fatores.

Tabela 2 - Altura das brotações de *Agapanthus umbellatus* var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e quatro concentrações de BAP, após 60 dias de cultura.

| Concentração de BAP (μM) | Sistemas de Multiplicação | | |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------|--------|
| | Meio geleificado | Imersão Temporária | Média |
| 0 | 4,00 | 4,10 | 4,05 a |
| 8,9 | 2,72 | 3,27 | 2,99 b |
| 17,8 | 2,50 | 3,02 | 2,76 b |
| 35,6 | 2,74 | 2,28 | 2,71 b |
| Média | 2,99 a | 3,17 a | |
| CV % | | 12,43 | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 3 - Número de folhas/brotações de *Agapanthus umbellatus* var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e a quatro concentrações de BAP, após 60 dias de cultura.

| Concentração de BAP (μM) | Sistemas de Multiplicação | | |
|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------|
| | Meio geleificado ¹ | Imersão Temporária ¹ | Média |
| 0 | 5,96 | 5,88 | 5,92 a |
| 8,9 | 5,14 | 5,70 | 5,42 ab |
| 17,8 | 4,93 | 5,22 | 5,07 bc |
| 35,6 | 4,68 | 4,49 | 4,59 c |
| Média | 5,17 a | 5,31 a | |
| CV % | | 4,84 | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

¹ Observações transformadas em $\sqrt{x+1}$

Tabela 4 - Número de raízes/brotações de *Agapanthus umbellatus* var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e quatro concentrações de BAP, após 60 dias de cultura.

| Concentração de BAP (μM) | Sistemas de Multiplicação | | Média |
|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------|
| | Meio geleificado ¹ | Imersão Temporária ¹ | |
| 0 | 2,39 | 4,27 | 3,28 a |
| 8,9 | 0,00 | 2,67 | 1,12 b |
| 17,8 | 0,00 | 2,35 | 1,00 b |
| 35,6 | 0,00 | 1,16 | 0,52 b |
| Média | 0,46 b | 2,53 a | |
| CV % | | 15,08 | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

¹ Observações transformadas em $\sqrt{x+1}$

Tabela 5 - Massa fresca (g) das brotações de *Agapanthus umbellatus* var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e a quatro concentrações de BAP, após 60 dias de cultura.

| Concentração de BAP (μM) | Sistemas de Multiplicação | | Média |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------|----------|
| | Meio geleificado | Imersão Temporária | |
| 0 | 0,4514 | 0,4987 | 0,4750 a |
| 8,9 | 0,5165 | 0,5799 | 0,5482 a |
| 17,8 | 0,5224 | 0,5812 | 0,5518 a |
| 35,6 | 0,5611 | 0,4775 | 0,5193 a |
| Média | 0,5128 a | 0,5343 a | |
| CV % | | 24,0 | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 6 - Massa seca (g) das brotações de *Agapanthus umbellatus* var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e a quatro concentrações de BAP, após 60 dias de cultura.

| Concentração de BAP (μM) | Sistemas de Multiplicação | | |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------|---------|
| | Meio geleificado | Imersão Temporária | Média |
| 0 | 0,040 | 0,053 | 0,046 a |
| 8,9 | 0,044 | 0,063 | 0,053 a |
| 17,8 | 0,047 | 0,061 | 0,054 a |
| 35,6 | 0,045 | 0,050 | 0,047 a |
| Média | 0,0441 b | 0,0572 a | |
| CV % | 24,00 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

A altura das brotações e o número de folhas/explante foram afetados apenas pela concentração de BAP no meio de cultura, não havendo efeito dos sistemas de multiplicação (Tabelas 2 e 3). Embora a ausência de BAP tenha proporcionado o menor número de brotações (Tabela 1), a altura e o número de folhas por brotação foram superiores (4,05 cm de altura e 5,92 folhas/brotação), nessa concentração.

A altura das brotações de *Agapanthus* em ambos os sistemas de multiplicação foi inversamente proporcional à concentração de BAP, ou seja, o aumento da concentração deste fitorregulador reduziu o tamanho das brotações (Figura 6). Oliveira et al. (2001) e Silveira et al. (2001), também observaram que o aumento dos níveis de BAP em plântulas de *Musa* sp e porta-enxerto de *Prunus* sp, na fase de multiplicação, resultou na diminuição da altura de brotações. Possivelmente, isto se deve à ação que este fitorregulador possui, pois de acordo com George (1996), Grattapaglia & Machado (1998) e Taiz & Zeiger (2004) o uso de citocinina estimula maior formação de brotações, mas o seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente, pela demasiada formação de um grande número de brotações com falta de alongamento, redução no tamanho das folhas e vitrificação generalizada, o que leva a sérios problemas na fase de aclimatização. Características de uma maior formação de brotações (Tabela 1), com tamanho reduzido (Tabela 2), ou seja, falta de alongamento das plântulas, quando

submetidas a elevadas concentrações de BAP, foram observadas em plântulas de *Agapanthus* nesse trabalho.

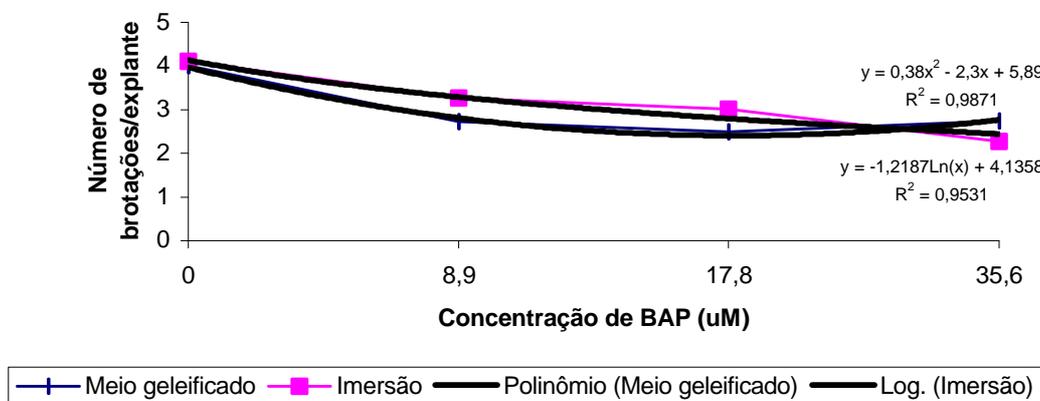


Figura 06 - Efeito de concentrações de BAP na altura das brotações de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em sistemas de multiplicação: em meio geleificado e em biorreator de imersão temporária.

Em relação aos sistemas de multiplicação utilizados, ficou demonstrado que explantes de *Agapanthus* apresentaram igual velocidade de crescimento em ambos os sistemas, visto que não houve diferença entre si para altura e número de folhas. Lemos et al. (2001), multiplicando *Musa* sp, obtiveram resultados similares para a variável número de folhas/explante. Para estes autores o MG não apresentou diferença significativa em relação ao BIT. Porém, em trabalhos com outras espécies, como orquídea (TISSERAT & VANDERCOOK, 1985), cana-de-açúcar (LORENZO et al., 1998) e abacaxi (ESCALONA et al., 1999), em que compararam os dois sistemas de multiplicação, foi demonstrado que o BIT estimulou não só a formação de novas brotações, como também o comprimento das mesmas, e estas novas brotações cresceram com uma maior velocidade quando comparado com o MG. Dessa maneira, percebe-se que o crescimento de plântulas em diferentes sistemas de multiplicação irá variar de acordo com cada espécie.

Com relação ao número de raízes formadas *in vitro* (Tabela 4), pode-se observar a maior eficiência do BIT (2,53 raízes/brotação) em relação ao MG (0,46 raízes/brotação). Enquanto que brotações multiplicadas em MG apresentaram

formação de raízes somente no meio MS sem BAP (2,39 raízes/brotação), o BIT proporcionou a formação de raízes em todas as concentrações utilizadas. Estes resultados corroboram com os obtidos por Lemos et al. (2001). Estes autores demonstraram que a maior eficiência do BIT na fase de multiplicação de *Musa sp* consistiu na maior produção de raízes quando comparado com MG.

Embora as raízes formadas *in vitro* não apresentam funcionalidade (DEBERGH & MAENE, 1981; BORKOWSKA, 2001), é possível que estas possam servir de sustentação e reserva de nutrientes até que novas raízes sejam formadas, durante a fase de aclimatização. Em geral, as citocininas exógenas inibem o enraizamento, mas, em concentrações muito baixas podem apresentar efeito promotor (ASSIS & TEIXEIRA, 1998), o que pode ser observado no presente trabalho, em que plântulas de *Agapanthus* quando multiplicadas no BIT e submetidas a menores concentrações de BAP, apresentaram formação de um maior número de raízes.

A renovação da atmosfera dos frascos de cultura foi outro fator que provavelmente influenciou a formação de raízes no BIT. Além de influenciar a composição atmosférica durante o período de transferência do meio, eliminando compostos prejudiciais, que foram produzidos pelo metabolismo das plantas, esse sistema também apresenta grande influência na indução e crescimento de raízes nas plântulas (LUCCHESINI & SODI, 2003). De acordo com estes autores, plântulas de *Phillyrea latifolia* L. multiplicadas em frascos com a renovação da atmosfera apresentaram um aumento significativo no número, comprimento e massa seca de raízes.

A produção de massa fresca e seca de brotações de *Agapanthus* (Tabelas 5 e 6), não apresentou diferença significativa em relação às concentrações de BAP utilizadas. No entanto, o maior vigor das brotações produzidas no meio de cultura com ausência de BAP foi observado visualmente através das Figuras 7 e 8. Resultados semelhantes foram observados em plântulas de gérbera, que foram multiplicadas na ausência de BAP (BARBOSA, 1993). Estas apresentaram plântulas com superior rusticidade e presença de raízes.

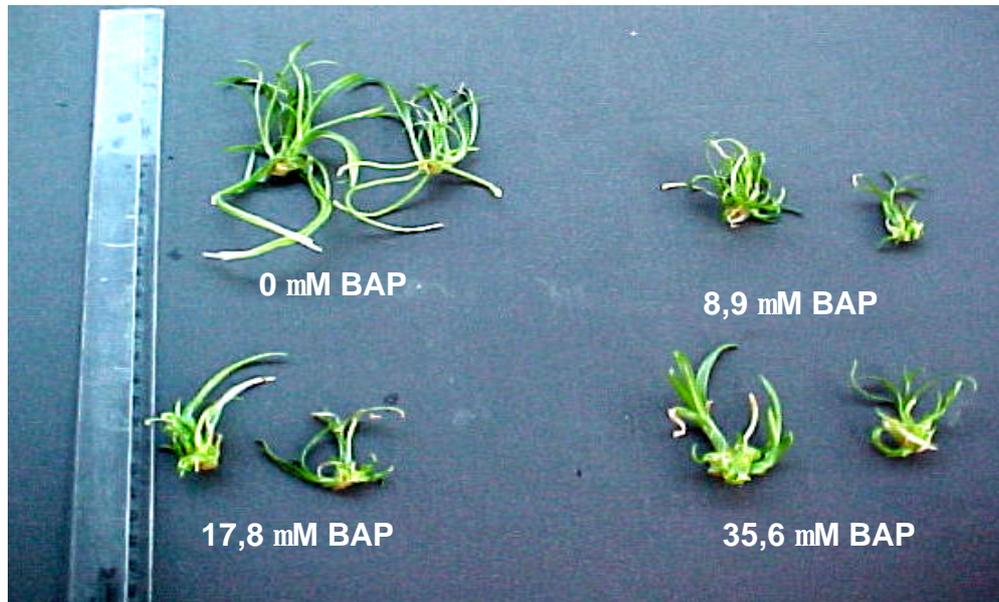


Figura 07 - Plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado no sistema convencional em diferentes concentrações de BAP, após 60 dias de cultura.

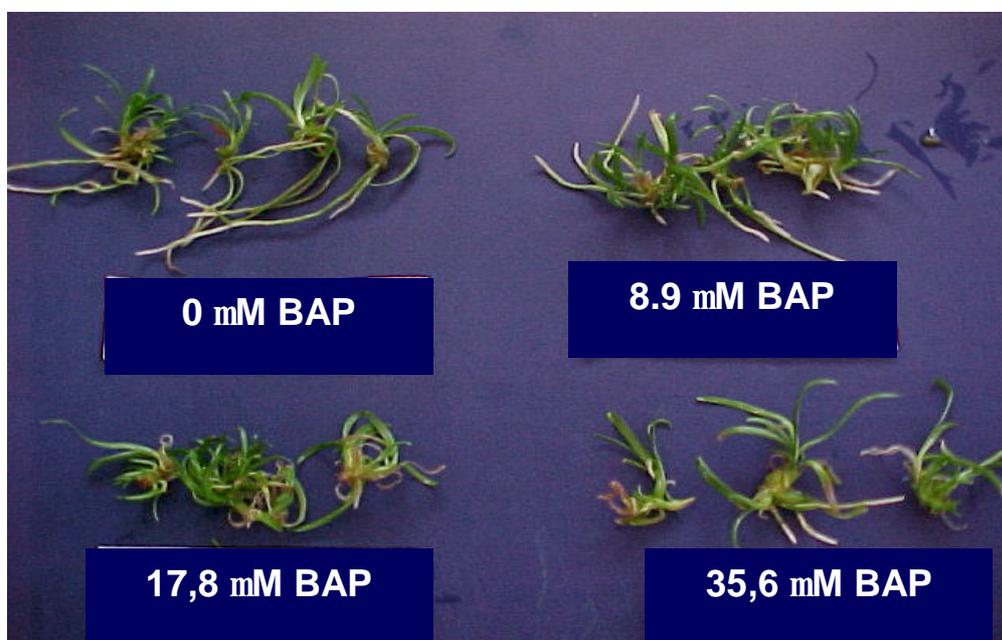


Figura 08 - Plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio líquido em biorreator de imersão temporária em diferentes concentrações de BAP, após 60 dias de cultura.

Embora não tenha ocorrido diferença significativa na produção de massa fresca entre os sistemas de multiplicação utilizados, na fase de multiplicação (Tabela 5), analisando-se visualmente as brotações, através das Figuras 7 e 8, observa-se que o BIT tendeu a produzir um maior incremento no volume das plântulas. Isso é confirmado quando se analisa a produção de massa seca (Tabela 6). Este resultado corrobora com Lemos (1996), que duplicou as taxa de produção de matéria seca de graviola micropropagada, ao substituir o MG com Gelrite® pelo BIT. Outros trabalhos, que utilizaram biorreatores de imersão também demonstraram um significativo aumento da massa fresca (TEISSON & ALVARD, 1994; DAQUINTA et al., 1997). Essa maior produção de massa fresca observada no BIT por esses autores, deve-se provavelmente, a um maior contato do meio líquido com os explantes, o que proporcionou uma maior área de absorção e, conseqüentemente, melhor aproveitamento do meio de cultura. Diferentemente, no MG, a área de contato da planta com o meio estava limitada à sua base (LEMOS et al., 2001).

Em resumo, o MG proporcionou uma maior formação de novas brotações em uma menor concentração de BAP (17,8 μM) quando comparado com o BIT (35,6 μM). No entanto, o número de brotações obtido no BIT na concentração de 8,9 μM de BAP não diferiu significativamente do valor obtido em 35,6 μM de BAP. Isso demonstra que apesar desta concentração sobressair-se em relação às demais concentrações utilizadas, nesse importante parâmetro de crescimento, visando uma alta taxa de multiplicação para produção de mudas em larga escala, o acréscimo na concentração de BAP, não traria aumento significativo no número de brotações nesse sistema.

A determinação da melhor concentração de BAP para a fase de multiplicação de *Agapanthus* em ambos os sistemas de multiplicação utilizados levou em consideração, além do número de plântulas formadas e o desenvolvimento *in vitro* das mesmas. Neste sentido, recomenda-se para o MG a concentração de 17,8 μM de BAP e para o BIT a concentração de 8,9 μM de BAP. Visto que estas concentrações, além de promoverem um número elevado de novas brotações, também apresentaram um maior incremento no desenvolvimento das plântulas, que mais tarde poderão influenciar na fase de aclimatização.

Os dados obtidos no presente trabalho demonstram que os dois sistemas de multiplicação utilizados foram eficientes na fase de multiplicação de *Agapanthus*

umbellatus var. minor. Entretanto, o BIT tendeu a ser superior em relação ao MG, devido à qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas. Além disso, a simplicidade na construção e o baixo custo dos biorreatores, caracteriza-os como mais uma alternativa para a produção em larga escala de *Agapanthus*.

3.2 Desempenho de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor obtidas na fase de multiplicação durante a fase de aclimatização

Durante a fase de aclimatização de plântulas de *Agapanthus*, nenhuma das variáveis estudadas sofreu efeito das interações entre os fatores sistemas de multiplicação e concentração de BAP. Atuaram sobre essas variáveis apenas os efeitos dos fatores isolados.

Assim, a maior taxa de sobrevivência foi obtida com plântulas produzidas em meio de cultura MS sem BAP e no BIT (Tabela 7). De acordo com Malagon et al. (2001), este resultado pode ser explicado pelo fato de que plântulas obtidas neste tratamento apresentaram uma maior capacidade de crescimento da parte aérea e raiz, quando comparadas com as cultivadas em meio suplementado com citocinina (Tabelas 2, 3 e 4), o que refletiu positivamente na fase de aclimatização. Provavelmente, o maior crescimento em altura (Tabela 2), número de folhas (Tabela 3) e raízes (Tabela 4) dos explantes sem BAP na fase de multiplicação proporcionou um maior acúmulo de reservas favorecendo a sobrevivência das plântulas durante a fase de aclimatização (GEORGE, 1996). Confirmando esta observação, Escalona et al. (1999), Costa & Zaffari (2001) e Malagon et al. (2001) observaram que a taxa de sobrevivência de brotações de *Ananas comosus* L. Merr, abacaxizeiro cv. Pérola e *Spathiphyllum floribundum* L. aumentou ligeiramente com o maior tamanho dos brotos, sendo este, portanto, um fator importante para um melhor crescimento de plantas em casa de vegetação.

Tabela 7 - Sobrevivência de brotações (%) de *Agapanthus umbellatus* var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e quatro concentrações de BAP, durante a fase de aclimatização após 30 dias.

| Concentração de BAP (μM) | Sistemas de Multiplicação | | Média |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------|---------|
| | Meio geleificado | Imersão Temporária | |
| 0 | 86,11 | 95,45 | 90,78 a |
| 8,9 | 73,62 | 80,83 | 77,22 c |
| 17,8 | 91,45 | 76,38 | 83,91 b |
| 35,6 | 64,38 | 69,33 | 66,85 d |
| Média | 78,89 b | 80,49 a | |
| CV % | 15,77 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Quanto ao resultado obtido em relação aos sistemas de multiplicação utilizados (Tabela 7), provavelmente se deve ao fato de que o BIT apresentou um maior número de raízes (Tabela 4) e massa seca (Tabela 6) durante a fase de multiplicação. De acordo com George (1996), as plântulas que desenvolvem raízes *in vitro* apresentam maior habilidade em estabilizar a perda de água durante a fase de aclimatização e, dessa forma, as plântulas obtidas no BIT não passaram pela mesma intensidade de estresse ao serem transferidas para condições *ex vitro* que passaram as plântulas obtidas no MG. A troca de ar que ocorre no frasco de imersão é outro fator que pode ter influenciado na fase de aclimatização. Segundo Ross-Karsten et al. (1998), esta troca de ar reduz a umidade relativa, a qual acarreta um melhor funcionamento dos estômatos e menor perda de água pelas plântulas. Resultados semelhantes foram obtidos por Etienne et al. (1997); Cabasson et al. (1997); Lorenzo et al. (1998); Escalona et al. (1999); Lemos (2001); Lian et al. (2003); Liu et al. (2003); Zobayed & Saxena, (2003). Para estes autores, o material regenerado de *Coffea arabica*, *Citrus deliciosa*, *Saccharum* spp., *Ananas comosus*, *Musa* sp., *Lilium*, *Artemisia annua* L., *Hipericum perforatum* L., no BIT apresentou um aumento na taxa de sobrevivência e no vigor das plantas na fase de aclimatização, quando comparado com MG.

A menor taxa de sobrevivência foi obtida com a maior concentração de BAP (35,6 μM) nos dois sistemas de multiplicação (Tabela 7). Este resultado confirmou o efeito negativo de BAP na fase de aclimatização. O aumento da concentração de

BAP promoveu a formação de um grande número de brotações porém, com reduzido desenvolvimento na parte aérea, tornando-as mais frágeis, com menos reservas, não suportando as condições de enraizamento (Tabela 4) e crescimento *ex vitro* (LESHEN et al., 1988), conforme foi observado no presente trabalho. Outra peculiaridade observada nas brotações obtidas da fase de multiplicação em meio de cultura com altas concentrações de BAP, foi a ausência de raízes no MG (Tabela 4). Mesmo no BIT, onde ocorreu a formação de raízes, essas ocorreram em número reduzido, dificultando posteriormente a absorção de água e nutrientes do solo.

O maior enraizamento (Tabela 8) também foi obtido em plântulas multiplicadas em meio MS sem BAP e no BIT. Para Assis & Teixeira (1998) existem alguns obstáculos para isolar e caracterizar os fatores que controlam os fenômenos que estão envolvidos no processo de formação de raízes, em virtude da sua complexidade e da grande interação existente entre eles. No entanto, um fator que pode ser crítico no processo de enraizamento de plântulas depois de removidas do meio de cultura é a altura das brotações obtidas durante a fase de multiplicação (PREECE & SUTTER, 1991). Outro fator que possivelmente influenciou o processo enraizamento foi a formação de raízes *in vitro*, que não apresentam funcionalidade (DEBERGH & MAENE, 1981; BORKOWSKA, 2001), mas é possível que possam servir de sustentação e reserva de nutrientes até que novas raízes sejam formadas durante a fase de aclimatização. Tais afirmativas podem ser confirmadas quando observa-se que durante a fase de multiplicação, as plântulas que atingiram maior altura foram as que não receberam suplementação de BAP, no entanto, para essa característica não houve efeito do sistema de multiplicação (Tabela 2) e a maior porcentagem de enraizamento também foi obtida em meio que não recebeu suplementação de BAP e no BIT (Tabela 8).

Tabela 8 - Enraizamento (%) de brotações de *Agapanthus umbellatus* var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e quatro concentrações de BAP, durante a fase de aclimatização após 30 dias

| Concentração de BAP (μM) | Sistemas de Multiplicação | | |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------|----------|
| | Meio geleificado | Imersão Temporária | Média |
| 0 | 100,00 | 100,00 | 100,00 a |
| 8,9 | 97,20 | 100,00 | 98,60 b |
| 17,8 | 95,83 | 97,22 | 96,52 c |
| 35,6 | 87,50 | 90,23 | 88,86 d |
| Média | 95,13 b | 96,86 a | |
| CV % | 3,76 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

O número e comprimento de raízes (Tabelas 9 e 10), também foram superiores na ausência de BAP. Possivelmente, este resultado deve ter sido influenciado pelo efeito residual do BAP, que modificou o balanço hormonal auxina:citocinina das plântulas (SKOOG & MULLER, 1957) quando transferidas. Dessa forma, à medida que a concentração de BAP aumentava, a formação de raízes diminuía, tanto na fase de multiplicação (Tabela 4) como na fase de aclimatização (Tabela 9). No entanto, o maior número de raízes foi produzido no BIT enquanto, o maior comprimento das raízes foi obtido no MG. Este maior alongamento das raízes, provavelmente se deve ao fato das plântulas multiplicadas neste sistema apresentarem maior dificuldade em absorver os nutrientes. De acordo com Assis & Teixeira (1998), o estado físico do meio de cultura pode interferir principalmente na disponibilidade de água, nutrientes hormônios e oxigênio presentes no meio.

Tabela 9 - Número de raízes/explante formadas em plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e quatro concentrações de BAP, durante a fase de aclimatização após 30 dias.

| Concentração de BAP (μM) | Sistemas de Multiplicação | | Média |
|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------|
| | Meio geleificado ¹ | Imersão Temporária ¹ | |
| 0 | 5,88 | 5,18 | 5,52 a |
| 8,9 | 4,40 | 5,03 | 4,71 b |
| 17,8 | 3,72 | 3,57 | 3,65 c |
| 35,6 | 3,35 | 3,57 | 3,46 d |
| Média | 4,29 b | 4,31 a | |
| CV % | | 11,00 | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

¹ Observações transformadas segundo $(\sqrt{x+1})$

Tabela 10 - Comprimento de raízes/explante (cm) de *Agapanthus umbellatus* var. minor submetidas a dois sistemas de multiplicação e quatro concentrações de BAP, durante a fase de aclimatização após 30 dias.

| Concentração de BAP (μM) | Sistemas de Multiplicação | | Média |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------|--------|
| | Meio geleificado | Imersão Temporária | |
| 0 | 2,98 | 2,88 | 2,93 a |
| 8,9 | 2,80 | 2,73 | 2,77 b |
| 17,8 | 2,82 | 2,42 | 2,62 d |
| 35,6 | 2,88 | 2,56 | 2,72 c |
| Média | 2,87 a | 2,65 b | |
| CV % | | 14,03 | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Em resumo, quando compara-se os dois sistemas de multiplicação no período de aclimatização, verifica-se que para as variáveis analisadas, sobrevivência (Tabela 7), enraizamento (Tabela 8) e número de raízes (Tabela 9), o BIT foi superior. Em relação as concentrações de BAP utilizadas na fase de multiplicação, estas apresentaram um efeito negativo durante a fase de aclimatização. Os melhores resultados foram obtidos em meio de cultura que não receberam suplementação de

BAP. No entanto, os resultados obtidos na fase de multiplicação de *Agapanthus* demonstraram a necessidade de suplementação de BAP no meio de cultura, para que ocorresse a formação de plântulas de qualidade e homogeneidade. Analisando o desempenho das plântulas obtidas nas concentrações recomendadas para a fase de multiplicação, verifica-se que os valores obtidos em 17,8 μM de BAP para o MG e 8,9 μM de BAP para o BIT propiciaram uma melhor formação de brotações e conseqüentemente uma melhor aclimatização.

4 CONCLUSÃO

A utilização do MG e do BIT apresentou-se eficiente na fase de multiplicação. No entanto, na fase de aclimatização, o BIT mostrou melhor desempenho para as variáveis analisadas, com exceção para o comprimento de raízes. Dentre as concentrações de BAP utilizadas nos sistemas de multiplicação recomenda-se para o MG a concentração de 17,8 μM de BAP e para o BIT a concentração de 8,9 μM de BAP, pois estas duas concentrações apresentaram um incremento no comportamento das plântulas na fase de multiplicação.

A fase de aclimatização foi influenciada negativamente pelas concentrações de BAP utilizadas nos dos sistemas de multiplicação. No entanto, foi verificado que para se obter plântulas de *Agapanthus* com qualidade e homogeneidade na fase de multiplicação, houve a necessidade de suplementação de BAP no meio de cultura com BAP. Analisando o desempenho das plântulas obtidas nas concentrações recomendadas para a fase de multiplicação, verifica-se que os valores obtidos em 17,8 μM de BAP para o MG e 8,9 μM de BAP para o BIT propiciaram uma boa formação de brotações e uma melhor aclimatização.

Apesar dos resultados obtidos quanto aos sistemas de multiplicação serem semelhantes na fase de multiplicação de *Agapanthus umbellatus* var. minor, a utilização do BIT pode ser melhor indicada, tendo em vista que este sistema tendeu a ser superior em relação à qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas. Durante a fase de aclimatização o desempenho das plântulas para as variáveis sobrevivência, enraizamento, número de raízes também foram superiores para este sistema. Além disso, este sistema também reduz o custo na produção em massa de mudas. Os agentes geleificantes aumentam o custo do processo de micropropagação, podendo ser um diferencial que determina ou não o uso desta técnica para a produção de plantas micropropagadas. O menor espaço físico ocupado pelos frascos do BIT é outro diferencial em relação ao MG e que podem contribuir para incrementar o uso desta tecnologia para produzir plantas ornamentais *in vitro*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN-CHRISTIE, J. Automation. In: Debergh, P. C. & Zimmerman, R. J. (Eds). **Micropropagation: Technology and Application**, Netherlands, p. 363 - 388, 1991.

ALVARD, D, COÔTE, F. & TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for bananas micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 32, p. 55 - 60, 1993.

ASSIS, T. F. & TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: Torres *et al.* **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA, Brasília – DF, v. 1, p. 261 - 296, 1998.

BARBOSA, M. H. P.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P.; ARELLO, E. F.; BARROS, I. Efeitos da benzilaminopurina e ácido índole-3-acético sobre a propagação *in vitro* de *Gérbera jamesonii* Bolus ex. Hook cv. Appelbloesem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 15 - 19, 1993.

BORKOWSKA, B. Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted *in vitro* or *ex vitro*. **Scientia Horticulture**, Skierniewice, v. 89, p. 195 - 206, 2001.

BOTANY. Disponível em: <<http://www.botany.com>> Acesso em 20 de nov. de 2003

CABASSON, C.; ALVARD, D.; DAMBIER, D.; OLLITRAUT, P.; TEISSON, C. Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 50, p. 33 - 37, 1997.

CALDAS, L. S., HARIDASAN, P & FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. EMBRAPA, Brasília –DF, v. 1, p. 87 - 132, 1998.

CASTRO, D. R.; GONZÁLEZ, J. O. Micropropagación de Eucalipto (*Eucaliptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. **Agricultural Técnica**, Chile, v. 62, n. 1, p. 68 - 78, enero-marzo, 2003.

COSTA, T. & ZAFARI, G. R. Micropropagação de clones de abacaxizeiro cv. Pérola em Santa Catarina. In: **Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**. VIII. 2001. Resumos. Ilhéus. 2001. 294p.

DAQUINTA, M.; LEZCANO, Y.; ESCALONA, M.; SANTOS, R.; DOMINGUEZ, Q.; BORROTO, C. Multiplication del banano FHIA-18 com PBZ y TDZ en diferentes formas de cultivo. In : **II Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal**. Gramado – RS. 1997. 115p.

DEBERGH, P. C. & MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation for ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 335 - 345, 1981.

DEBERGH, P. C. Physical properties of culture media. **Plant Tissue Culture**, Japan: Tokyo, p. 135 - 136, 1982.

DEBERGH, P. Improving mass propagation of *in vitro* plantlets. In: Kozai T (Ed) Horticulture in High Technology Era. **International Symposium on High Technology in Protected Cultivation**, Tokyo, p. 45 - 57, 1988.

DESJARDINS, Y. Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plants and their effect on acclimatization. In: CARRE, F. & CHAGVARDIEFF, P (Eds) **Ecophysiology and photosynthetic *in vitro* cultures**, CEA, p. 145 - 160, 1995.

ESCALONA, M. et al.. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 743 - 748, 1999.

ETIENNE, H.; BERTRAND, B. ANTHONY, F.; BERTHOULY, M. L'embryogenèse somatique: un outil pour l'amélioration génétique du caféier. In: ASIC Publishers (eds) **17 th International Scientific Colloquium on Coffee**, Nairobi, p. 457 - 467, 1997.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 69, p. 215 - 231, 2002.

EXTERCKOKER, R. & PEDROTTI, E. L. Micropropagação de *Agapanthus umbellatus* var. minor. In: **XIII Congresso Brasileiro de Floricultura**, 2001. Resumos. São Paulo. 2001. 250 p.

FEITO, I.; GONZALEZ, A.; CENTENO, M. L.; FERNADEZ, B. RODRIGUEZ, A. Transport and distribution of benzyladenine in *Actinidia deliciosa* explants cultures in liquid and solid media. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 39, p. 909 - 916, 2001.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. In Practice. 2 ed. England: Exergetics, 1996. 1361p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: Torres *et al.* **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA, Brasília – DF, v. 1, p. 183 - 260, 1998.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, G. R.; CHALFUN, N. N. J. & RAMOS, J. D. **Aplicações da cultura de tecidos na propagação de plantas**. Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão – FAEP/ Universidade Federal de Lavras – UFLA. 1997. 130p.

LEMOS, E. E. P. **Experimentos em micropropagação e organogênese na graviola (*A. muricata* L.)** Maceió: EDUFAL, 1996. 43p.

LEMOS, E. E. P. Micropropagação de clones de banana cv. terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 482 - 487, 2001.

LESHEN, B.; WERKER, E.; SHALEV, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, v. 62, p. 271 - 276, 1988.

LIAN, M. L.; CHAKRABARTY, D.; PAEK, K. Y. Growth of *Lilium* Oriental Hybrid “Casablanca” bulblet using bioreactor culture. **Scientia Horticulturee**, v. 97, p. 41 - 48, 2003.

LIU, C. Z.; GUO, C.; WANG, Y. C.; OUYANG, F. Comparison of various bioreactores on growth and artemisinis biosynthesis of *Artemisia annua* L. shoot cultures. **Process Biochemistry**, n. 00, p. 1 - 5, 2003.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de; **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa, São Paulo: Editora Plantarum, 1995. 734p.

LORENZO, J. C. et al. Sugarcane shoot formation in na improved temporary immersion system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 54, p. 197 - 200, 1998.

LUCCHESINI, M & SODI, A. M. Influence of medium composition and vessel ventilation on *in vitro* propagation of *Phillyrea latifolia* L. **Scientia Horticulture**, p. 1 - 9, 2003.

MAENE, L. & DEBERGH, P. Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vivo*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 5, p. 23 - 33, 1985.

MALAGON, R. R.; BORODANENKO, A.; GUERRA, J. L. B.; ALEJO, N. O. Shoot number and shoot size as affected growth regulators *in vitro* cultures of *Spathiphyllum floribundum* L. **Scientia Horticulture**, v. 89, n. 3, Jul., p. 227 - 236, 2001.

MANTELL, S. H.; MATTHEUS, J. A., MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 334p.

MEIRA, Z. Simple bioreactors for mass propagation of plants. In: **1º Int. Symp. Liquid Systemms for *in vitro* Mass Propagation of Plants**, As, Norway, May 29th- June 2nd, p. 13. 2002.

MONCALEÁN, P.; CANAL, M. J.; FEITO, A.; RODRIGUEZ, A.; FERNADEZ, B. Cytokinins and mineral nutrition in *Actinidia deliciosa* shoots cultured *in vitro*. **Journal of Plant Physiology**, v. 155, p. 606 - 612, 1999.

MONCALEÁN, P.; RODRIGUEZ, A.; FERNADEZ, B. Effect of different benzyladenine time pulses on the endogenous levels of cytokinins, indole-3-acetic acid in micropropagated explants of *Actinidia deliciosa*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 149 - 155, 2003.

MOTOS, J. R. **IBRAFLOR – Informativo**. Set., Ano IV, n. 17, p. 03 - 05, 1998.

MURASHIGE, T.; & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473 - 497, 1962.

OLIVEIRA, R. P. de; SILVEIRA, D. G.; OLIVEIRA e SILVA, S. de. Concentração de BAP e eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (grupo AAAB). **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 1, p. 73 - 78, Jan/mar. 2001.

PEDROTTI, E. L.; VOLTOLINI, J. A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização dos porta-enxertos de macieira Marubakaido e M9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 234 - 239, 2001.

PREECE, J. E. & SUTTER, E. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh, p. & Zimmerman, R. (eds). **Micropropagation technology and application**. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, p. 71 - 94, 1991.

ROSS-KARSTENS, G.S.; EBERT, G. & LUDDERS, P. Influence of *in vitro* growth conditions on stomatal, density, index and aperture of grape, coffee and banana plantlets. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v. 4, n. 1. p. 21 - 27, 1998.

SCHUCH, M. W.; PETERS, J. A. Multiplicação *in vitro* de brotações de macieira cultivares Marubakaido (*Malus domestica*, Borkh). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 433 - 437, 1993.

SIMONTON, W. ROBACKER, C. & KRUEGER, S. A programmable micropropagation apparatus using cycled medium. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 27, p. 211 - 218, 1991.

SILVEIRA, C. A. P. et al. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 23, n. 3, p. 488 - 492, dez., 2001.

SKOOG, F. & MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposium of Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118 - 131, 1957.

SLUIS, C. J. & WALKER, K. A. Commercialization of plant tissue culture propagation. **Intl. Assoc. Plant Tissue Culture**, Newsl, v. 47, p. 2 - 12, 1985.

STELL, R. G. D. & TORRIE, J. H. **Principles and precedures of statistics – A biometrical approach**, 2 ed. New York, Macgraw – Hill, 1980. 633p.

SUZUKI, S.; OOTA, M.; NAKANO, M. Embryogenic callus induction from leaf explants of the Liliaceous ornamental plant, *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton histological study and response to selective agents. **Scientia Horticulture**, v. 95, p. 123 - 132, 2002.

TAMAS, I. A. Hormonal regulation of apical dominance. In: Davies, P. J. (Ed.), **Plant Hormone Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**, Dordrecht, p. 572 - 597, 1995.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Tradução de Eliane Romanato Santarém et al. Porto Alegre: Artmed, 3. Ed, 2004. 719 p. Título original: Plant Physiology.

TEISSON, C & ALVARD, D. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary Immersion. In: M. Terzi et al. (eds). **Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology**, Dordrecht, p. 105 - 110, 1985.

TEISSON, C & ALVARD, D. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary Immersion. In: **International Congress of Plant Tissue and Cell Culture**, 7. Florença. Abstract.1994. 54p.

TISSERAT, B. & VANDERCOOK, C. E. Development of an automated plant culture system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 5, p. 107 - 117, 1985.

VOGELMANN, T. C.; BORNMAN, C. H.; NISSEN, P. Uptake of benzyladenine in explants of *Piceaa abies* and *Pinus sylvestris*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 61, p. 513 - 517, 1984.

WEATHERS, P. J. & GILES, K. L. Regeneration of plants using nutrient mist culture. **In Vitro Cell. Des. Biol.**, v. 24, p. 727 - 732, 1988.

YUI, E.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; NAGIG, N.; CHALFUN, J.; ISHIDA, J. S. Influência de reguladores de crescimento na proliferação *in vitro* de brotos do porta-enxerto de macieira M-7. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 597 - 602, 1993.

ZOBAYED, S. M. A. & SAXENA, P. K. In vitro-grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. "New Stem") in a temporary immersion bioreactor. **Plant Science**, n. 00, p. 1 - 8, 2003.

Capítulo II

**Características Morfofisiológicas
de *Agapanthus umbellatus* var.
minor multiplicadas em meio
geleificado e biorreator de
imersão temporária**

RESUMO

O processo de micropropagação induz a um grande número de mudanças anatômicas, morfológicas e fisiológicas que são determinantes na morfogênese, no crescimento e no desenvolvimento das plantas *in vitro*. As modificações do ambiente *in vitro* envolvem a qualidade e intensidade de luz, fotoperíodo, temperatura, umidade, reguladores de crescimento exógenos, fonte de carbono e estresse mecânico. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo estudar alguns aspectos morfológicos e fisiológicos de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado (MG) e biorreator de imersão temporária (BIT) em meio líquido. Para a realização deste trabalho foram realizados dois ensaios, um para o MG e outro para a BIT. O delineamento experimental utilizado para ambos os experimentos foi inteiramente casualizado. Foram testados quatro concentrações de sacarose no meio de cultura e duas intensidades luminosas, em um total de oito tratamentos, formando um fatorial 2 x 4 para cada ensaio. Os resultados obtidos indicaram que as condições ambientais, principalmente luz e concentração de sacarose do meio de cultura, influenciaram o desenvolvimento e o crescimento das plântulas quando multiplicadas em MG e no BIT. Observou-se que a ausência de sacarose, mesmo no nível mais elevado de intensidade luminosa, não estimulou a fotossíntese das plântulas. A combinação de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 70 μM.m⁻².s⁻¹ de luz proporcionou maior produção de brotações, massa fresca e seca, concentração de clorofila *a*, *b* e total. Esse tratamento também proporcionou uma densidade estomática razoável, com estômatos com forma elíptica e pouca variação no tamanho em ambos os sistemas de multiplicação.

ABSTRACT

The micropropagation process induces to a great number of changes anatomical, morphologic and physiologic that they are decisive in the morfogenesis, in the growth and in the development of the plants in vitro. The modifications of the atmosphere in vitro involve the quality and light intensity, fotoperíodo, temperature, humidity, regulators of growth, source of carbon and mechanical stress. Before that, the present work had as objective studies some morphologic and physiologic aspects of shoots of *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplied in semi-solidy medium (MG) and biorreator of temporary immersion (BIT) in liquid medium. For the accomplishment of this work were accomplished two rehearsals, one for MG and other for BIT. The line experimental used for both experiments it was casuality entirely. Four sucrose concentrations were tested in the medium of culture and two luminous intensities, in a total of eight treatments, forming a factorial 2 x 4 for each essay. The obtained results indicated that the environmental conditions, mainly light and sucrose concentration added to the medium of culture, they influenced the development and the growth of the plantlets when multiplied in MG and in BIT. It was observed that the sucrose absence, even in the highest level of luminous intensity, it didn't stimulate the photosynthesis of the plantlets. The combination of 30 g.L⁻¹ of sucrose and 70 μM.m⁻².s⁻¹ of light provided larger shoots production, fresh mass and it evaporates, chlorophyll concentration a, b and total. That treatment also provided a density os stomato reasonable, with stomato with elliptic form and little variation in the size in both multiplication systems.

1 INTRODUÇÃO

O processo de micropropagação induz a um grande número de mudanças anatômicas, morfológicas e fisiológicas que muitas vezes tem limitado o cultivo *in vitro* de algumas espécies (DESJARDINS, 1993; LOURO & SANTIAGO, 2000). A heterogeneidade de respostas às plântulas que ocorrem na cultura de tecidos é promovida não só por fatores inerentes ao tecido vegetal (genéticos e fisiológicos), mas também por modificações do ambiente *in vitro*.

As modificações do ambiente *in vitro* envolvem a qualidade e intensidade de luz, fotoperíodo, temperatura, umidade, reguladores de crescimento exógenos, fonte de carbono e estresse mecânico. Estes são determinantes na morfogênese, no crescimento e no desenvolvimento de plântulas *in vitro* (SALISBURY, 1981; KOZAI et al., 1990; SHACKEL et al., 1990; GEORGE, 1996). Além disso, interferem no número de folhas, teor de clorofila, densidade estomática (PREECE & SUTTER, 1991; LIAN et al., 2002), na fotossíntese e na fase de aclimatização (DESJARDINS, 1995).

De uma forma geral, as plântulas *in vitro*, apresentam uma baixa atividade fotossintética (POSPSÍLOVÁ et al., 1987), devido às condições especiais de redução de trocas gasosas, alta umidade do ar, baixa intensidade luminosa e uso de carboidratos como fonte de carbono no meio de cultura (SHACKEL et al., 1990). Esta baixa taxa de fotossíntese *in vitro* é atribuída à uma menor concentração de clorofila e uma reduzida atividade da D-ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RUBISCO) (GROUT & MILLAM, 1985) ou a má formação e desenvolvimento dos cloroplastos (LEE et al., 1995).

Plântulas com tais deficiências apresentam redução do tecido clorofiliano, principalmente de células do parênquima paliçádico e alteração na morfologia dos cloroplastos. Estes podem afetar o crescimento *in vitro* de plântulas e posteriormente a aclimatização, proporcionando perdas elevadas de plântulas na transferência para condições *ex vitro* (SCIUTI & MORINI, 1993; DESJARDINS, 1995; POSPÍLOVÁ et al., 1999; CALVETE et al., 2002).

Aliado às alterações estruturais, o comportamento de alguns componentes metabólicos ligados ao sistema fotossintético sofrem alterações. Entre estes, encontram-se as clorofilas a e b, pigmentos localizados nos tilacóides e cujo papel é

fundamental na absorção, transferência e conversão de luz durante a fotossíntese (POSPÍSILOVÁ et al., 1988).

Um dos principais fatores que causam grande influência na fotossíntese de plântulas cultivadas *in vitro* é a intensidade luminosa (GALZY & COMPAN, 1992). A quantidade e a qualidade da luz, bem como o fotoperíodo, podem afetar o crescimento e o desenvolvimento de plântulas *in vivo* (SMITH, 1982) e plântulas *in vitro* (ECONOMOU & READ, 1987; VLAHOS et al., 1992; GEORGE, 1996). Esta influência se deve ao grande impacto sobre a acumulação de pigmentos, formação de clorofila, diferenciação de cloroplastos e anatomia da folha (DONELLY & VIDAVER, 1984; DESJARDINS et al., 1995).

Plântulas micropropagadas são mantidas em condições em que a intensidade luminosa é freqüentemente igual ou menor do que 1/10 da intensidade luminosa à qual a fotossíntese de plantas crescidas ao ar livre é saturada pela luz ($\pm 800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (GEORGE, 1996). Com isso, esta baixa intensidade luminosa é um dos fatores apontados como responsável pelas baixas taxas de fotossíntese encontradas em algumas espécies (TICHÁ et al., 1998). Embora adaptadas à baixa intensidade luminosa, elevadas intensidades normalmente aumentam as taxas de fotossíntese e o crescimento vegetal de plântulas *in vitro*, o que possibilita uma aclimatização mais eficiente (DESJARDINS et al., 1995; DURING & HARST, 1996).

O efeito benéfico ou prejudicial que a energia luminosa irá conferir ao desenvolvimento de plântulas *in vitro* dependerá das características da espécie, da fase de micropropagação e do tipo de explante (ECONOMOU & READ, 1987). Plântulas de *Liquidambar styraciflua* L cultivadas *in vitro* apresentaram uma menor saturação fotossintética sob presença de alta intensidade luminosa ($314 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) devido ao dano específico da luz nos pigmentos afetando o crescimento e o desenvolvimento de plântulas *in vitro* (LEE et al., 1995). Isso não ocorre com outras espécies como *Aster*, *Crysanthemum* e *Morus latifolia* que requerem um aumento da intensidade luminosa para a proliferação de brotos *in vitro* (GEORGE, 1996; LU, 2002).

Outro fator que vem sendo estudado e que pode determinar um papel importante no controle da atividade fotossintética de plântulas *in vitro* é a utilização de carboidratos exógenos, pois o crescimento da maioria das culturas *in vitro* é sustentado pela sacarose ou outros açúcares adicionados ao meio de cultura

(PREECE & SUTTER, 1991). Estes podem ser utilizados pelas plântulas quando a taxa de fotossíntese não permite assegurar um balanço positivo em carbono, definindo assim uma nutrição mixotrófica (GALZY & COMPAN, 1992).

Dentre os carboidratos, a sacarose é a fonte de energia e de carbono mais utilizada nos meios de cultura, pois possibilita altas taxas de crescimento para a maioria das espécies vegetais (FIGUEIRA & JANICK, 1994; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). As concentrações de 2 a 4% de sacarose são as mais utilizadas. Abaixo dessa faixa de concentração de sacarose pode ocorrer clorose das culturas e acima desta, pode incorrer em problemas de excessivo potencial osmótico do meio, possibilitando a deterioração das culturas (GEORGE, 1996; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

O efeito do carboidrato adicionado ao meio de cultura foi mostrado em plântulas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun. A acumulação de clorofila e a capacidade fotossintética foi afetada positivamente pela presença de açúcar no meio de cultura, ou seja, o conteúdo de clorofila aumentou em plântulas *in vitro* quando cultivadas em meio suplementado com 3% de sacarose, e diminuiu em plântulas cultivadas com ausência de sacarose (TICHÁ et al., 1998).

A presença de carboidratos no meio de cultura apresenta papel ambíguo, assim como pode determinar um papel importante no controle da atividade fotossintética e também uma ação positiva na produção de fitomassa e acumulação de clorofila (TICHÁ et al., 1998). A presença de carboidratos também pode influenciar no decréscimo das taxas de clorofila de outras espécies e reduzir ou inibir a taxa fotossintética (YAMADA & SATO, 1978; LA ROSA et al., 1984; LEES et al., 1991; FIGUEIRA & JANICK, 1994), também pode reduzir a atividade da Rubisco (GROUT & DONKIN, 1987).

Apesar da adição de açúcar durante a cultura *in vitro* algumas vezes prejudicar o desenvolvimento do aparato fotossintético, a total remoção deste freqüentemente torna-se prejudicial para o crescimento da plântula, o que pode prejudicar o processo de micropropagação e aclimatização (CAPPELLADES et al., 1991; DESJARDINS, 1995). No entanto, o efeito prejudicial da remoção total de açúcares irá depender da espécie que está sendo micropropagada. Fila et al. (1998) e Seko & Nishimura (1996) estudando videira (Porta-enxerto 41B) e arroz respectivamente, observaram que a fotossíntese *in vitro* não foi afetada pela concentração de sacarose no meio de cultura. Para esses autores, a ausência de

açúcar beneficiou a promoção do fotoautotrofismo. Um aumento na concentração de açúcar no meio de cultura também resultou na redução da fixação do carbono, como tem sido relatado para Clematis (LEES et al., 1991), rosa (CAPELLADES et al., 1991), morango (HDIDER & DESJARDINS, 1994), Gardenia (SERRET et al., 1995), Spathiphyllum (VAN HUYLENBROCK & DEBERGH, 1996) e abacate (VINÃ et al., 1999).

Atualmente, os sistemas de cultivo de plantas *in vitro* estão se ajustando na medida em que se ampliam os conhecimentos na área de fisiologia vegetal, principalmente naqueles conhecimentos relacionados com a fotossíntese, as relações hídricas, a atividade enzimática e a nutrição mineral. As recentes pesquisas na área do controle do ambiente têm gerado informações valiosas para o manejo do cultivo *in vitro*, principalmente para a produção de mudas em larga escala (LOURO & SANTIAGO, 2000). Nesse sentido, pesquisas conduzidas por Serret et al. (1995) mostraram que durante a fase de multiplicação de brotos e a indução de enraizamento de Gardenia *in vitro*, sob baixa concentração de sacarose e alta intensidade luminosa, houve um estímulo da atividade fotossintética. Estas plântulas demonstraram um maior fotoautotrofismo, tornado-se mais adaptadas à alta intensidade luminosa quando em relação às plântulas que se desenvolviam sob altos níveis de sacarose (SERRET et al., 1995). Resultados semelhantes foram obtidos para plântulas de *Rehmannia glutinosa* e *Coffea arabusta* cultivadas *in vitro* sob condições de baixa concentração de açúcar e alta intensidade luminosa e concentração de CO₂ apresentaram um aumento na produção fotossintética (CUI et al., 2000; NGUGEN et al., 1999).

Além da atividade fotossintética, as modificações do ambiente *in vitro* também tem grande influência sobre a densidade estomática. Esta característica, juntamente com as dimensões estomáticas, são altamente hereditárias (SCIENZA & BOSELLI, 1981) e podem revelar informações importantes sobre a fisiologia *in vitro*, aclimatização e possíveis testes precoces para a caracterização e seleção de genótipos superiores (LEITE et al., 2000).

No caso específico do Agapanthus, não existe nenhum relato do efeito da sacarose e da luz sobre a taxa de multiplicação, bem como nas características morfofisiológicas. Baseado na hipótese de que a composição do meio de cultura e a intensidade luminosa influenciam a morfologia e a fisiologia de plântulas micropropagadas, o presente trabalho teve como objetivo estudar aspectos

morfológicos e fisiológicos de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado (MG) e em biorreator de imersão temporária (BIT). Para tanto, foi avaliado o desenvolvimento de *Agapanthus umbellatus* var. minor durante a fase de multiplicação, em função da variação de níveis de sacarose e intensidade luminosa, utilizando os dois sistemas de multiplicação. Também foi determinado o conteúdo de clorofila *a*, *b* e total, e densidade e características biométricas de estômatos de folhas de plantas obtidas durante a fase de multiplicação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor produzidas *in vitro*, no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis-SC foram utilizadas para a realização desse trabalho. O material foi originado a partir de organogênese direta em botões florais, conforme metodologia descrita por Exterckoter & Pedrotti (2001).

2.2 Ensaios

Através de estudos morfológicos e fisiológicos de plântulas de *Agapanthus* foram determinadas as melhores concentrações de sacarose e intensidades luminosas para a fase de multiplicação em dois sistemas de multiplicação. Cada sistema de multiplicação consistiu de um ensaio, onde foram utilizados explantes obtidos da terceira repicagem mantidos em meio geleificado MS + 17,8 µM de BAP.

O delineamento experimental utilizado nos ensaios foi o inteiramente casualizado. Foram testados quatro concentrações de sacarose no meio de cultura e duas intensidades luminosas, em um total de oito tratamentos, formando um fatorial 2 x 4.

2.2.1 Ensaio N.º 1. Efeito da variação de níveis de sacarose e da intensidade luminosa nas características morfo-fisiológicas de *Agapanthus umbellatus* var. minor em meio geleificado (MG)

Plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor após serem individualizadas e padronizadas, tendo o seu tamanho variando entre 2,5 e 3,0 cm de comprimento, foram transferidas para frascos de cultura contendo 50 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) em condições assépticas, suplementado com

concentração de 17,8 μM de BAP, agente geleificante ágar (Vetec) 0,6%, e quatro níveis de sacarose (0, 1,5; 3,0 e 4,5%). O pH foi ajustado com NaOH (1N) em 5,9, antes da autoclavagem (durante 15 minutos, sob 121°C). Cada tratamento foi composto por três repetições, contendo dez frascos com cinco explantes cada, totalizando 50 plantas/repetição.

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob dois níveis de intensidade luminosa: 70 e 140 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, provida por lâmpadas brancas fluorescentes (PHILIPS – TLT 40W), com fotoperíodo de 16 horas e temperatura média de 22°C com variação de $\pm 2^\circ\text{C}$, por um período de 60 dias.

2.2.2 Ensaio N.º 2 Efeito da variação de níveis de sacarose e da intensidade luminosa nas características morfo-fisiológicas de *Agapanthus umbellatus* var. minor em biorreator de imersão temporária (BIT)

Plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor após serem individualizadas e padronizadas, tendo o seu tamanho variando entre 2,5 e 3,0 cm de comprimento, foram transferidas para o BIT (ETIENNE & BERTHOULY, 2002) contendo 500 mL de meio líquido e sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com concentração de 8,9 μM de BAP e quatro níveis de sacarose (0, 1,5; 3,0 e 4,5%). O pH foi ajustado com NaOH (1N) em 5,9 antes da autoclavagem (durante 15 minutos sob 121°C). Cada tratamento do BIT foi composto por três frascos (repetição) contendo 50 plantas cada.

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob dois níveis de intensidade luminosa: 70 e 140 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, provida por lâmpadas brancas fluorescentes (PHILIPS – TLT 40W), com fotoperíodo de 16 horas e temperatura média de 22°C com variação de $\pm 2^\circ\text{C}$, por um período de 60 dias.

Os frascos e o meio de cultura foram autoclavados separadamente, sendo que o tempo para os frascos de imersão foi de 30 minutos e para o meio líquido foi de 15 minutos.

2.3 Medidas das Variáveis

As variáveis foram analisadas de forma semelhante para os dois ensaios empregados, como estratégia para se conhecer aspectos da morfologia e fisiologia de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em MG e BIT e sob diferentes concentrações de sacarose e intensidade luminosa.

2.3.1 Avaliação das Características Morfológicas dos Explantes

As características morfológicas de explantes de *Agapanthus umbellatus* var. minor foram avaliadas quanto aos dados referentes ao número e altura das brotações (cm), número de folhas, massa fresca e seca (mg) da parte aérea.

A altura de brotações foi determinada com um paquímetro. Para a determinação da massa fresca e seca da parte aérea, foram utilizadas amostras de 25 plântulas por repetição, escolhidas ao acaso. Após a lavagem das plântulas, essas foram colocadas em papel toalha para secar, sendo em seguida pesadas separadamente com uma balança de precisão (KERN, 430-21). Após a pesagem, a parte aérea foi acondicionada em sacos de papel e mantidas em estufa a 60°C por 24 horas. Após esse período, o material foi mantido em dessecador e, em seguida, pesado em balança de precisão para determinar a massa seca.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) dos dados seguindo o modelo para experimento bifatorial inteiramente casualizado. As médias dos tratamentos foram separadas pelo teste de comparação de médias Duncan a 5% de probabilidade, conforme recomendações de Stell & Torrie (1980).

2.3.2 Análise do Conteúdo de Clorofila

A determinação do conteúdo de clorofila “a, b e total” de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor, foi realizada através de coletas de amostras de 100 mg de massa fresca, conforme metodologia utilizada por HISCOX & ISRAELSTAM (1979). As amostras foram incubadas com 7,0 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) sem maceração, por 30 minutos a 65°C, para extração da clorofila.

Em seguida, foram submetidas ao processo de filtragem simples, em papel filtro, tendo seu volume completado para 10 mL com DMSO. Desses extratos, 2 mL foram analisados em espectrofotômetro (UV - visível, SHIMADZU), para os valores de absorvância entre 645 e 663nm. Os valores obtidos foram submetidos a fórmula de ARNON (1949), conforme descrito por HISCOX & ISRAELSTAM (1979):

- mg/cm^3 clorofila a = $(0,0127 \times D663) - (0,00269 \times D645)$
- mg/cm^3 clorofila b = $(0,0229 \times D645) - (0,00468 \times D663)$

Foram utilizadas três repetições com 25 amostras para a avaliação da influência dos sistemas de multiplicação MG e BIT. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguindo o modelo para experimento bifatorial inteiramente casualizado e teste de separação de médias (Duncan 5%), conforme recomendações de Stell & Torrie (1980).

2.3.3 Densidade e características biométricas de estômatos

A avaliação da densidade estomática (número de estômatos por mm^2 de superfície foliar) e das características biométricas dos estômatos foi realizada em folhas de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor das quais extraiu-se a clorofila pela metodologia descrita para a análise do conteúdo de clorofila no item 2.3.2 desse trabalho.

Após a extração da clorofila, as folhas foram cortadas e somente a parte mediana da folha foi usada para análise. Após os cortes, a parte mediana das folhas passou por um processo de coloração, onde permaneceram mergulhadas em corante de azul de toluidina a 2,5%, por um período de 15 minutos. Em seguida, foram lavadas três vezes em água destilada. Após, foram fixadas sobre lâminas histológicas com a ajuda de uma lamínula e de algumas gotas de água esterilizada. A observação da epiderme foi realizada na face adaxial e abaxial da folha, com o auxílio de um microscópio ótico (OLYMPUS CH30, ocular WH10 X 22), com um aumento de 400 vezes e com uma área conhecida de $0,24\text{mm}^2$, o que permitiu calcular a densidade estomática. Para cada lâmina foram feitas leituras em cinco campos.

A determinação das dimensões das células-guarda foi feita considerando o comprimento (eixo longitudinal, entre os dois pólos da célula) e largura (eixo transversal, na porção média da célula). A avaliação foi realizada através de observações feitas com o auxílio de um microscópio ótico (OLYMPUS BX4, ocular WH10 X 22), com um aumento de 400 vezes e com uma área conhecida de $0,24\text{mm}^2$. Para cada lâmina foram feitas leituras em cinco campos e em cada campo foram medidos cinco estômatos, totalizando 25 estômatos medidos por lâmina.

Foram utilizadas três repetições com 25 amostras (folhas) para estas avaliações. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguindo o modelo para experimento bifatorial inteiramente casualizado e teste de separação de médias (Duncan 5%), conforme recomendações de Stell & Torrie (1980).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da variação de níveis de sacarose e da intensidade luminosa nas características morfo-fisiológicas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado e em biorreator de imersão temporária

3.1.1 Características morfológicas dos explantes

Através dos resultados obtidos em MG, as variáveis número (Tabela 11) e altura de brotações (Tabela 12) e número de folhas/brotações (Tabela 13), durante a fase de multiplicação de plântulas de *Agapanthus*, verificou-se que não houve interação entre os fatores sacarose e intensidade luminosa, havendo portanto o efeito isolado dos fatores. Enquanto que no BIT, a concentração de sacarose no meio de cultura apresentou uma ação positiva e interativa com a intensidade luminosa na proliferação de brotações (Tabela 14). As variáveis altura das brotações (Tabela 15) e número de folhas/brotações (Tabela 16) no BIT, apresentaram comportamento semelhante ao MG, ou seja, foram afetadas apenas pelo efeito simples dos fatores, não havendo interação entre sacarose e luz.

A ausência de sacarose no meio de cultura, nos dois sistemas de multiplicação utilizados, resultou em insucesso no crescimento das plântulas de *Agapanthus*, principalmente nos primeiros dias. Após o desenvolvimento inicial (aproximadamente 10 dias) foi constatada uma estagnação no crescimento das plântulas submetidas à ausência de sacarose, e posteriormente, ocorreu uma atrofia das brotações e das folhas. Em seguida, as folhas necrosaram e após 20 dias de cultivo em MG e 30 dias no BIT ocorreu a morte das plântulas. Isso mostrou que folhas de plântulas de *Agapanthus* não fixaram carbono suficiente para sustentar seu crescimento na ausência de sacarose. Portanto, foi necessária a adição de uma fonte de carbono no meio de cultura para o desenvolvimento *in vitro* das plântulas. Os resultados obtidos estão de acordo com Capellades et al (1991) e Desjardins (1995). Segundo estes autores, a total remoção de fonte de carbono no meio de cultura para algumas espécies, freqüentemente, torna-se prejudicial para o crescimento das plântulas, o que pode prejudicar o processo de micropropagação e aclimatização, pois, durante o cultivo *in vitro*, as plântulas perdem parcialmente o autotrofismo e, conseqüentemente, necessitam de uma fonte de carbono.

A redução ou eliminação de açúcar no meio de cultura para a espécie *Actinidia deliciosa* também aumentou a taxa de mortalidade de plântulas em 60%, sendo necessária a adição de sacarose no meio de cultura como fonte de carbono para o desenvolvimento desta espécie *in vitro* (ARIGITA et al.,2002).

O maior número de brotações/explante em MG foi obtido com a concentração de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 70 μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa (Tabela 11). Por outro lado, a maior altura das brotações ocorreu quando foi aplicado 15 g.L⁻¹ de sacarose e 70 μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa (Tabela 12). No entanto, esta concentração de sacarose no meio de cultura proporcionou a formação de um menor número de brotações (Tabela 11) e também a formação de plântulas frágeis (Figura 10).

A adição de 45 g.L⁻¹ de sacarose e 70 μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa apresentou maior incremento para o número de folhas/brotação (Tabela 13). Com estes resultados, verificou-se que houve resposta diferente para as variáveis analisadas de acordo com a variação da concentração de sacarose. Durante a fase de multiplicação de *Nephrolepis exaltada* também foram obtidos resultados diferentes, de acordo com a concentração de sacarose (Pasqual et al., 1994). O número de brotações/explante foi superior na concentração de 30 g.L⁻¹ de sacarose, enquanto que para a altura das brotações os melhores resultados foram evidenciados entre 15 e 30 g.L⁻¹ de sacarose.

Tabela 11 - Número de brotações/explante de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | | Média |
|--|---|------------------|--------|
| | 70 ¹ | 140 ¹ | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 3,52 | 2,69 | 3,10 c |
| 30 | 5,36 | 4,75 | 5,05 a |
| 45 | 6,25 | 3,42 | 4,75 b |
| Média | 3,35 a | 2,44 b | |
| CV % | 10,41 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

^{1/} Observações transformadas segundo ($\sqrt{x+1}$)

Tabela 12 - Altura de brotações/explante de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | | Média |
|--|---|--------|--------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 3,88 | 2,93 | 3,41 a |
| 30 | 3,12 | 2,02 | 2,57 c |
| 45 | 3,09 | 2,37 | 2,73 b |
| Média | 2,52 a | 1,83 b | |
| CV % | 18,46 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 13 - Número de folhas/brotação de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | | Média |
|--|---|--------|--------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 5,87 | 4,78 | 5,32 b |
| 30 | 5,86 | 4,62 | 5,22 c |
| 45 | 5,53 | 5,79 | 5,66 a |
| Média | 3,83 a | 3,39 b | |
| CV % | 6,14 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Plântulas de *Agapanthus* multiplicadas em MG, quando submetidas a maior intensidade luminosa apresentaram uma redução no número (Tabela 11) e altura de brotações (Tabela 12) e número de folhas/brotação (Tabela 13 e Figura 10). Estes resultados indicaram que plântulas de *Agapanthus* apresentaram uma fotoinibição, ou seja as folhas foram expostas a uma quantidade de luz maior do que podia

utilizar, fazendo com que o centro de reação do fotossistema II fosse inativado e danificado (TAIZ & ZEIGER, 2004). Resultados semelhantes foram obtidos em plântulas de *Liquidambar styraciflua* L cultivadas *in vitro* sob presença de alta intensidade luminosa ($314 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (LEE et al., 1995). Essas apresentaram uma menor saturação fotossintética devido ao dano específico da luz nos pigmentos afetando o crescimento e o desenvolvimento de plantas *in vitro*. Diferente do que aconteceu em plântulas de *Agapanthus*, em *Morus latifoliata* Poilet multiplicadas *in vitro* apresentaram melhores resultados (LU, 2002). Cerca de 6 brotações a mais por mês foram obtidas com o aumento da intensidade de luz entre 80 e $140 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Em biorreator de imersão temporária (BIT), o maior número de brotações foi obtido com a intensidade luminosa de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e a concentração de $45 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose (Tabela 14). Enquanto que com a intensidade luminosa de $140 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ o maior número de brotações foi obtido com a concentração de $30 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose. Isso demonstrou um alto grau de mixotrofia dessa espécie.

Tabela 14 - Número de brotações/explante de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) | |
|--|--|------------------|
| | 70 ¹ | 140 ¹ |
| 0 | 0,00 Da | 0,0 dA |
| 15 | 3,70 cB | 5,44 cA |
| 30 | 5,53 bB | 6,51 aA |
| 45 | 7,45 aA | 5,85 bB |
| CV % | 6,7 | |

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

^{1/} Observações transformadas segundo $(\sqrt{x+1})$

A interação entre sacarose e luz em relação ao número de brotações revelou que para intensidade luminosa de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, doses crescentes de sacarose promoveram maior formação de brotações, apresentando um comportamento

quadrático (Figura 9). Para a intensidade luminosa de $140 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ houve um incremento do número de brotações até a dose de 30 g.L^{-1} de sacarose (6,51 brotações), diminuindo com doses superiores e evidenciando um comportamento quadrático. Este resultado demonstrou que o aumento da intensidade luminosa possibilitou a diminuição da concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura na fase de multiplicação de *Agapanthus*. Ou, de forma contrária, permitiu reduzir a intensidade luminosa e aumentar a concentração de sacarose, que sob o ponto de vista custo/benefício, poderia trazer aumento significativo para a produção de mudas em larga escala. Plântulas de *Alstroemeria* apresentaram igual comportamento quando multiplicadas sob diferentes níveis de sacarose e luz, demonstrando um pequeno decréscimo na taxa de multiplicação em plântulas multiplicadas sob alta intensidade luminosa e alta concentração de sacarose (KRISTIANSEN et al., 1999).

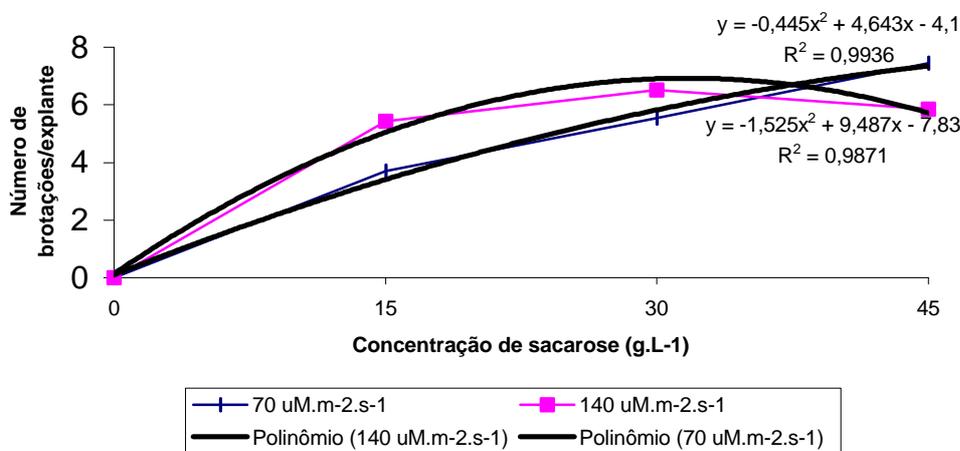


Figura 9 - Efeito de concentrações de sacarose e de intensidade luminosa sobre o número de brotações/explante de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicados em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias.

A maior altura das brotações no BIT foi alcançada quando os explantes foram submetidos a 15 g.L^{-1} de sacarose e $140 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa (Tabela 15). Verificou-se também que o aumento da concentração desse carboidrato

no meio de cultura não favoreceu o alongamento das brotações. Provavelmente, o aumento da intensidade luminosa favoreceu a taxa de fotossíntese das plântulas, permitindo um balanço positivo de carbono, afetando o crescimento e o desenvolvimento de plântulas *in vitro* (LEE et al., 1995).

Tabela 15 - Altura de brotações/explante de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | | Média |
|--|---|--------|--------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 2,75 | 3,96 | 3,35 a |
| 30 | 2,95 | 2,95 | 2,95 b |
| 45 | 2,45 | 2,20 | 2,33 c |
| Média | 2,04 b | 2,28 a | |
| CV % | 25,95 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Por outro lado, o maior número de folhas de *Agapanthus* foi obtido na concentração de 30 g.L⁻¹ de sacarose (Tabela 16). A intensidade luminosa não teve influência sobre essa variável. Contrastando com os dados obtidos no presente trabalho, Konow & Wang (2001) determinaram que a intensidade luminosa de 40 μmol.m⁻².s⁻¹ promoveu um aumento no número de folhas de *Phalaenopsis*, enquanto plântulas que se desenvolveram em ambiente com intensidade de 10 e 80 μmol.m⁻².s⁻¹ apresentaram um menor número de folhas. Segundo os autores, o aumento no número de folhas pode indicar que houve estímulo da fotossíntese *in vitro*. As folhas que são consideradas órgãos estoques de nutrientes são de extrema importância no momento de determinar a melhor combinação para a fase de multiplicação, visto que o seu número poderá afetar a fase de aclimatização.

Tabela 16 - Número de folhas/explante de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | | Média |
|--|---|------------------|--------|
| | 70 ¹ | 140 ¹ | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 4,07 | 4,08 | 4,08 b |
| 30 | 4,14 | 4,04 | 4,09 a |
| 45 | 4,00 | 4,08 | 4,04 c |
| Média | 2,76 a | 2,75 a | |
| CV % | 4,67 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

¹ Observações transformadas segundo ($\sqrt{x+1}$)

Outro efeito observado em plântulas de *Agapanthus* multiplicadas no BIT, foi a presença de folhas mais claras e vitrificadas (folhas com aspecto vítreo, pouco desenvolvidas, aparência suculenta e translúcida), na grande maioria das plântulas multiplicadas em meio suplementado com 15 g.L⁻¹ de sacarose e intensidade luminosa de 70 μmol.m⁻².s⁻¹ (Figura 11). Estes resultados podem estar indicando que o aparato fotossintético não tenha se desenvolvido adequadamente (CAPPELADES et al., 1991; DESJARDINS, 1995), afetando a acumulação de massa fresca. Segundo Reuther (1990), este fenômeno pode afetar a sobrevivência e adaptação das plantas cultivadas *in vitro* após sua transferência para condições *ex vitro*, aumentando sua suscetibilidade à contaminação por fungos e a produtos químicos.

Possivelmente, a presença de folhas vitrificadas foi influenciada pelo uso de meio líquido, pois de acordo com George (1996) e Etienne & Berthouly (2002) o meio líquido favorece a produção de folhas vitrificadas quando comparado com meio geleificado. No entanto, observou-se que para os demais tratamentos em concentrações maiores de sacarose (30 e 45 g.L⁻¹) a presença de brotações vitrificadas foi rara ou nenhuma (Figura 11). Neste sentido, o desenvolvimento de brotações com esta característica pode estar relacionado à concentração de sacarose no meio, e à diferença osmótica entre as brotações e o meio de cultura (DEBERGH, et al., 1981). Este resultado também foi obtido na multiplicação de

rosas, onde a redução na concentração de sacarose para 10 g.L^{-1} , na fase de multiplicação, promoveu um aumento significativo na presença de plantas vitrificadas, e quando submetidas a concentrações de 30 e 40 g.L^{-1} a presença de plântulas vitrificadas foi rara (LANGFORD & WAINWRIGHT, 1987).

Outro fator que possivelmente pode ter influenciado a presença de plântulas vitrificadas *in vitro* foi a baixa intensidade luminosa (GEORGE, 1996), pois plântulas de *Agapanthus* multiplicadas sob intensidade de $140 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 15 g.L^{-1} de sacarose não apresentaram característica de vitrificação, conforme pode ser observado na Figura 11. Estes dados indicaram que o aumento da intensidade luminosa evitou a presença de plantas vitrificadas, além de proporcionar um incremento e estímulo na atividade fotossintética (GEORGE, 1996).

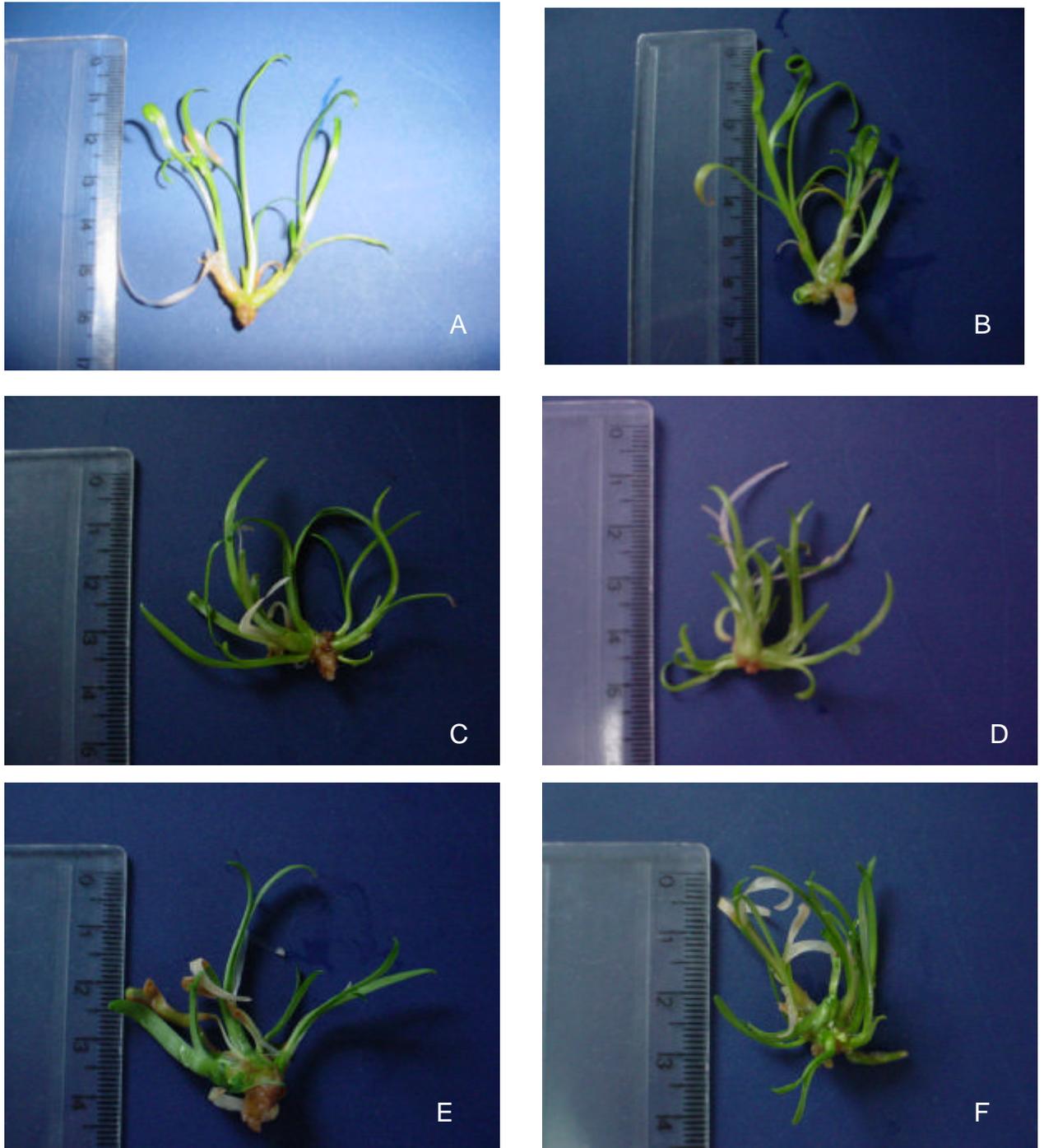


Figura 10 - Plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em MG suplementado com diferentes concentrações de sacarose e intensidade luminosa. (A: 15 g.L⁻¹ de sacarose e 70 μmol.m⁻².s⁻¹; B: 15 g.L⁻¹ de sacarose e 140 μmol.m⁻².s⁻¹; C: 30 g.L⁻¹ de sacarose e 70 μmol.m⁻².s⁻¹; D: 30 g.L⁻¹ de sacarose e 140 μmol.m⁻².s⁻¹; E: 45 g.L⁻¹ de sacarose e 70 μmol.m⁻².s⁻¹; F: 45 g.L⁻¹ de sacarose e 140 μmol.m⁻².s⁻¹).

OBS: na ausência de sacarose não houve formação de brotação.

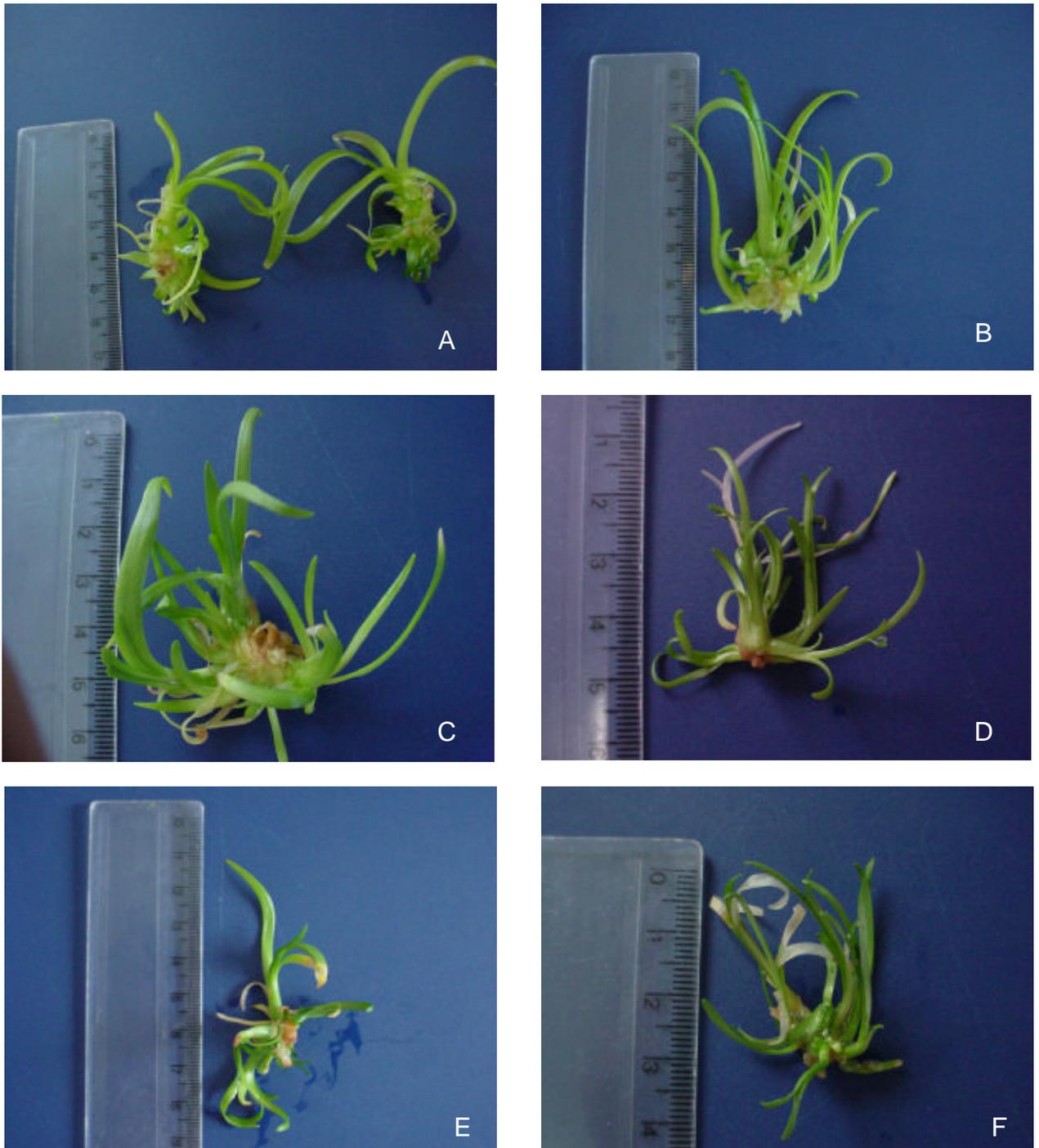


Figura 11 - Plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. *minor* multiplicadas em biorreator de imersão temporária em diferentes concentrações de sacarose e intensidade luminosa (A: 15g.L⁻¹ de sacarose e 70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; B: 15g.L⁻¹ de sacarose e 140 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; C: 30g.L⁻¹ de sacarose e 70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; D: 30g.L⁻¹ de sacarose e 140 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; E: 45g.L⁻¹ de sacarose e 70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; F: 45g.L⁻¹ de sacarose e 140 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$;

Obs: na ausência de sacarose não houve formação de brotação.

Na produção de massa fresca e seca de plântulas multiplicadas em MG e no BIT, observou-se que houve interação significativa entre os fatores sacarose e luz (Tabela 17 e 18). A melhor produção de massa fresca e seca em MG, foi obtida na concentração 15 g.L⁻¹ de sacarose e 70 μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa. Para as demais concentrações ocorreu uma redução acentuada na produção de massa fresca e seca. Contrastando com os resultados obtidos no presente trabalho, Fila et al. (1998) estudando videira cv. 41 B, Ticha et al. (1998) fumo e Desjardins (1995) morango, observaram que a produção de massa fresca *in vitro* destas espécies foi aumentada com a adição de sacarose. Para a espécie estudada, no presente trabalho verificou-se que para as intensidades luminosas utilizadas, o aumento da concentração de sacarose foi prejudicial à produção de massa fresca e seca.

Em resumo, a combinação 15 g.L⁻¹ de sacarose e 70 μmol.m⁻².s⁻¹ de luz proporcionou maior produção de massa fresca e seca de brotações de *Agapanthus*. No entanto, Grout & Millan (1985) observaram que a redução da sacarose durante a fase de multiplicação não pode ser um método adequado, visto que esta redução pode afetar o número de folhas formadas, estas que são consideradas como órgãos estoque de nutrientes que posteriormente afetarão a fase de aclimatização. Portanto, sugere-se a concentração de 30 g.L⁻¹ de sacarose no meio de cultura e 70 μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa.

Tabela 17 - Massa fresca e seca de brotações de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Massa fresca | | Massa seca | |
|--|---|---------|------------|----------|
| | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | | | |
| | 70 | 140 | 70 | 140 |
| 0 | 0,00 dA | 0,00 dA | 0,00 dA | 0,00 dA |
| 15 | 0,69 aA | 0,41 aB | 0,070 aA | 0,040 aB |
| 30 | 0,48 cA | 0,39 bB | 0,049 cA | 0,038 bB |
| 45 | 0,57 bA | 0,37 cB | 0,054 bA | 0,036 cB |
| CV % | 18,97 | | 16,62 | |

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Plântulas de *Agapanthus* multiplicadas no BIT sob intensidade de $70 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ apresentaram a maior produção de massa fresca e seca dentro das concentrações de 30g.L^{-1} (Tabela 18). Entre as concentrações de 15 e 45g.L^{-1} os resultados obtidos foram inferiores (Tabela 18). Por outro lado, quando se aumentou a intensidade para $140 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a melhor produção de massa fresca e seca ocorreu dentro da concentração de 15g.L^{-1} de sacarose (Tabela 18). Verificou-se assim que o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura proporcionou efeitos negativos na produção de massa fresca e seca, quando as plântulas foram submetidas à intensidade luminosa mais elevada. Tais resultados corroboram com as afirmações feitas referentes à variável número de brotações, onde demonstrou-se que foi possível reduzir a concentração de sacarose em maiores intensidade luminosas, confirmando o grau de mixotrofia. Em resumo, as combinações de 30g.L^{-1} de sacarose e $70 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luz e/ou 15g.L^{-1} de sacarose e $140 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luz favoreceram a maior produção de massa fresca e seca.

Tabela 18 - Massa fresca e seca de brotações de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L^{-1}) | Massa fresca | | Massa seca | |
|---|--|---------|------------|----------|
| | Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) | | | |
| | 70 | 140 | 70 | 140 |
| 0 | 0,00 dA | 0,0 Da | 0,00 dA | 0,00 dA |
| 15 | 0,67 cB | 1,06 aA | 0,069 cB | 0,109 aA |
| 30 | 0,82 aA | 0,76 bB | 0,085 aA | 0,081 bB |
| 45 | 0,75 bA | 0,49 cB | 0,078 bA | 0,051 cB |
| CV % | 28,73 | | 26,55 | |

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Assim, tendo como base as variáveis analisadas em relação as características morfológicas das plântulas, pode-se verificar que houve uma variação nos resultados obtidos em relação as combinações de sacarose e intensidade luminosa utilizadas

no MG e no BIT. No entanto, para se determinar as melhores combinações para essas características durante a fase de multiplicação, é necessário analisar as variáveis em conjunto e também verificar a relação custo/benefício. Portanto, sugere-se a combinação de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 70 μmol.m⁻².s⁻¹ de luz para a fase de multiplicação de *Agapanthus* em ambos os sistemas utilizados, tendo em vista que esse tratamento apresentou resultados superiores para massa fresca e seca e número de folhas, estas que são consideradas órgãos estoques de nutrientes que poderão afetar a fase de aclimatização.

3.1.2 Análise do Conteúdo de Clorofila

A concentração de clorofila *a*, *b* e total em folhas de *Agapanthus* multiplicadas em meio geleificado e em biorreator de imersão temporária, não foi afetada pela interação entre sacarose e luz, havendo somente efeito simples dos fatores (Tabelas 19, 20, 21, 22, 23, 24).

O acúmulo de clorofila *a*, *b* e total em folhas da espécie em estudo foi beneficiada pela adição de 30 g.L⁻¹ de sacarose no meio de cultura. Concentrações acima ou abaixo de 30 g.L⁻¹ promoveram diminuição significativa na concentração de clorofila nos dois sistemas de multiplicação utilizados. De acordo com Tichá et al. (1998) a adição de açúcares ao meio de cultura parece ter um papel ambíguo. Apresenta uma ação positiva no acúmulo de clorofila para algumas espécies. Ao mesmo tempo pode influenciar no decréscimo das taxas de clorofila de outras espécies (POSPÍSILOVÄ et al., 1988; FIGUEIRA & JANICK, 1994). Pospíšilová et al. (1988) demonstrou que a síntese de clorofila em plântulas de tabaco e batata foi beneficiada em até 2% de sacarose no meio de cultura. Entretanto, há evidências de que o aumento desta fonte de carbono no meio de cultura pode influenciar no decréscimo das taxas de clorofila de algumas espécies e reduzir ou inibir a taxa fotossintética, o que foi observado no presente trabalho. Serret et al. (1995) mostraram que o aumento da concentração de açúcares (30 g.L⁻¹) no meio de cultura promoveu maior produção de clorofila, impedindo a fotoinibição, realização de fotossíntese e aumento do ganho de massa em plantas de *Gardênia* cultivadas *in vitro*. Outros trabalhos realizados em videira (MOREIRA, 2000) e macieira (NUNES,

2001) demonstraram que a adição em até 40 g.L⁻¹ de sacarose no meio de cultura afetou positivamente a acumulação de clorofila.

Tabela 19 - Concentrações de clorofila *a* (mg/g massa fresca) em folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | | Média |
|--|---|--------|--------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 3,83 | 3,61 | 3,72 c |
| 30 | 4,83 | 4,65 | 4,74 a |
| 45 | 4,34 | 3,65 | 4,00 d |
| Média | 3,25 a | 2,97 b | |
| CV % | 8,90 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 20 - Concentrações de clorofila *a* (mg/g massa fresca) em folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | | Média |
|--|---|--------|--------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 2,11 | 2,48 | 2,95 c |
| 30 | 5,02 | 5,09 | 5,05 a |
| 45 | 4,86 | 4,20 | 4,53 b |
| Média | 2,99 a | 2,94 a | |
| CV % | 7,40 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 21 - Concentrações de clorofila *b* (mg/g massa fresca) em folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | | Média |
|--|---|--------|--------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 1,38 | 1,43 | 1,40 c |
| 30 | 1,87 | 1,80 | 1,84 a |
| 45 | 1,60 | 1,63 | 1,62 b |
| Média | 1,21 a | 1,21 a | |
| CV % | 11,68 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 22 - Concentrações de clorofila *b* (mg/g massa fresca) em folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | | Média |
|--|---|--------|--------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 0,89 | 0,76 | 0,83 c |
| 30 | 2,00 | 2,11 | 2,05 a |
| 45 | 1,95 | 1,79 | 1,87 b |
| Média | 1,21 a | 1,16 a | |
| CV % | 8,20 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 23 - Concentrações de clorofila total (mg/g massa fresca) em folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | | Média |
|--|---|--------|--------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 5,21 | 5,12 | 5,16 c |
| 30 | 6,71 | 6,46 | 6,59 a |
| 45 | 5,95 | 5,29 | 5,62 b |
| Média | 4,47 a | 4,22 a | |
| CV % | 8,68 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 24 - Concentrações de clorofila total (mg/g massa fresca) em folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | | Média |
|--|---|--------|--------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 3,01 | 3,25 | 3,13 c |
| 30 | 7,03 | 7,21 | 7,10 a |
| 45 | 6,82 | 6,33 | 6,58 b |
| Média | 4,21 a | 4,20 a | |
| CV % | 8,50 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Em relação à intensidade luminosa, somente a concentração de clorofila *a* de folhas de *Agapanthus* multiplicadas em meio geleificado apresentou diferença

significativa (Tabela 19). A intensidade luminosa de $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ promoveu maior incremento na concentração de clorofila a. Para a intensidade $140 \mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ verificou-se uma fotoinibição. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Moreira (2000); Nunes (2001) e Viña et al. (2001) que demonstram que o aumento da intensidade luminosa diminuiu a concentração de pigmentos nas folhas de plântulas de videira, *Malus pumila* Mill e *Malus prunifolia* Borkh e abacateiro.

Provavelmente estes resultados estão relacionados à velocidade de decomposição da clorofila, pois segundo Kramer & Kozlowski (1979) a clorofila é constantemente sintetizada e destruída (foto-oxidação) em presença de luz, mas sob intensidades luminosas muito elevadas a velocidade de decomposição é maior, sendo o equilíbrio estabelecido em uma concentração mais baixa.

Dessa forma, a concentração de clorofila em folhas de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor, multiplicadas em MG e BIT foi dependente apenas da presença de açúcar no meio de cultura, sendo a melhor concentração de 30g.L^{-1} de sacarose. Embora a intensidade luminosa não tenha apresentado efeito significativo, sugere-se a menor intensidade $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com o objetivo de que não ocorra um aumento na velocidade de decomposição da clorofila com intensidade mais elevada.

3.1.3 Densidade e características biométricas de estômatos

O estudo dos estômatos das plantas *in vitro* é muito importante, principalmente quando o objetivo é otimizar protocolos de multiplicação e aclimatização das plantas micropropagadas, uma vez que estes exercem importante papel na regulação das trocas gasosas e perdas de água pela transpiração das folhas.

Folhas de brotações de *Agapanthus umbellatus* var. minor (Figuras 12, 13, 14), apresentaram característica anfiestomática, que é caracterizada pela presença de estômatos em ambas as faces (abaxial e adaxial), ocorrendo variações na distribuição estomática sobre as duas faces (CAPPELADES et al, 1991; SCIUTI & MORINI, 1993). Esta característica pode ser comprovada no presente trabalho, pois verificou-se que folhas de *Agapanthus in vitro* apresentaram maior densidade

estomática na face abaxial que na face adaxial (Tabelas 25, 26, 27 e 28). Provavelmente esta diferença esteja relacionada a umidade relativa do ar encontrada neste ambiente de cultivo (NICOLOSO et al, 2001). Esta característica tem sido considerada como um mecanismo adaptativo para maximizar a condutância de CO₂, quando luz e água são fatores limitantes (KRAMER, 1969).

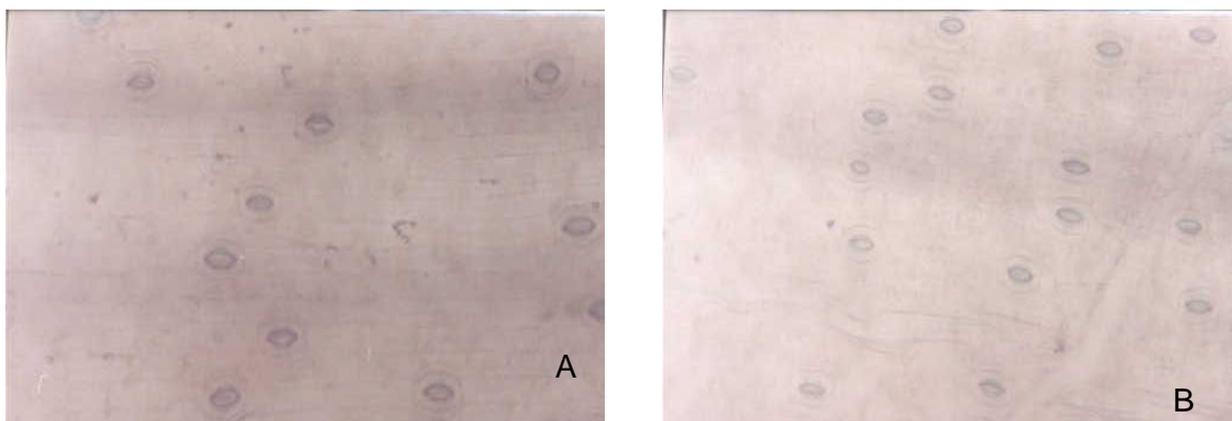


Figura 12 - Micrografia óptica mostrando detalhes da densidade estomática da face foliar adaxial de *Aganthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado (A: 30 g.L⁻¹ de sacarose e 70 μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa; B: 30 g.L⁻¹ de sacarose e 140 μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa).

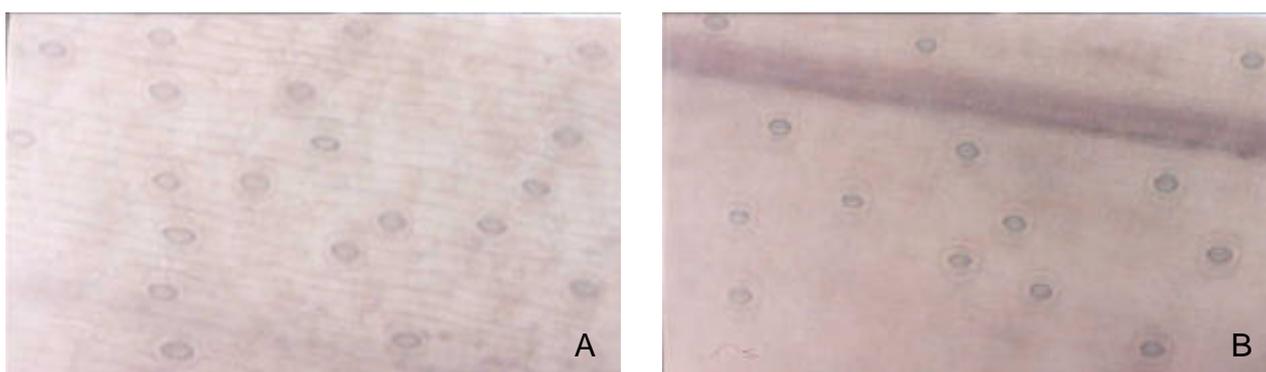


Figura 13 - Micrografia óptica mostrando a densidade estomática da face foliar abaxial de *Aganthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado (A: 30 g.L⁻¹ de sacarose e 70 μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa; B: 30 g.L⁻¹ de sacarose e 140 μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa).

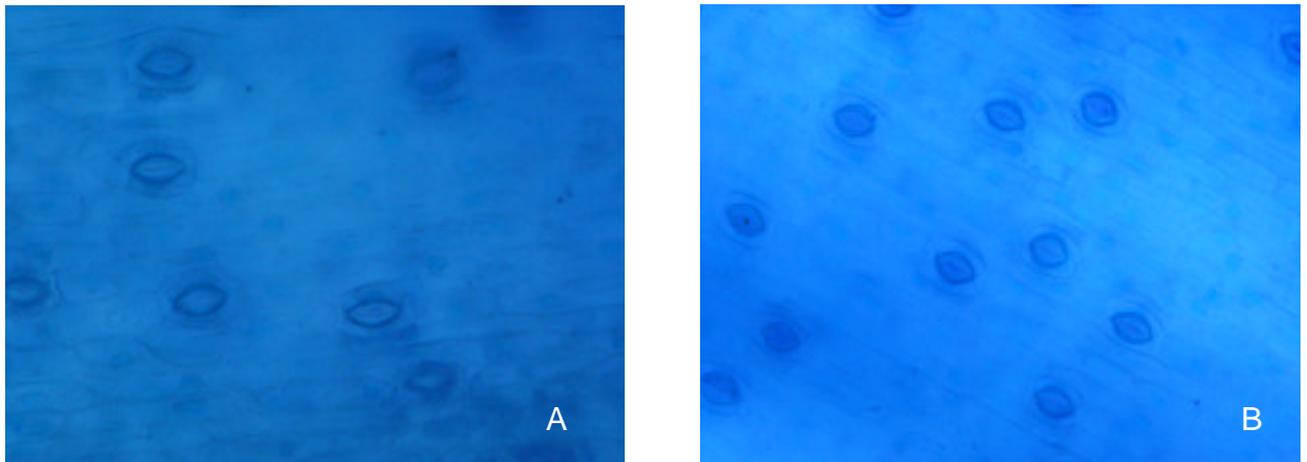


Figura 14 - Micrografia óptica mostrando detalhes da densidade estomática de folhas de *Aganthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio líquido em biorreator de imersão temporária (A: face adaxial; B: Face abaxial).

Da mesma forma que ocorreu para clorofila, a densidade estomática de folhas de *Agapanthus* obtidas nos dois sistemas de multiplicação foi influenciada pela adição de sacarose no meio de cultura e intensidade luminosa.

Em plântulas de *Agapanthus* multiplicadas em MG, a intensidade luminosa apresentou uma ação positiva e interativa com a concentração de sacarose na densidade estomática na face adaxial de folhas (Tabela 25). Plântulas de *Limonium* apresentaram comportamento semelhante, visto que, níveis de sacarose no meio, juntamente com o enriquecimento de CO₂ e intensidade luminosa afetaram o número de estômatos por unidade de área foliar (LIAN et al., 2002). Enquanto que para densidade estomática da face abaxial (Tabela 27), e densidade estomática das faces adaxial e abaxial de folhas de plântulas multiplicadas no BIT (Tabelas 26 e 28), verificou-se que não houve interação entre os fatores sacarose e intensidade luminosa, havendo portanto efeito isolado dos fatores.

A maior densidade estomática na face adaxial em plântulas multiplicadas em MG foi obtida na intensidade de 140 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 30 g.L^{-1} de sacarose (Tabela 25). Para o tratamento intensidade luminosa de 70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a maior densidade estomática da face adaxial foi obtida com 30 g.L^{-1} de sacarose. No entanto, essa densidade foi inferior à obtida com 140 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para as concentrações de 15 e

45 g.L⁻¹ foi observado um decréscimo significativo na densidade estomática em ambas as intensidades utilizadas.

Tabela 25 - Densidade estômática (estômatos/mm²) da face adaxial de folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | |
|--|---|------------------|
| | 70 ¹ | 140 ¹ |
| 0 | 0,00 dA | 0,0 Da |
| 15 | 52,66 cB | 56,93 cA |
| 30 | 79,82 aB | 112,19 aA |
| 45 | 64,64 bB | 83,34 bA |
| CV % | 7,98 | |

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

¹ Observações transformadas segundo ($\sqrt{x+1}$)

Para o BIT, a maior densidade estomática na face adaxial foi obtida na concentração de 45 g.L⁻¹ de sacarose e 140 μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa (Tabela 26), verificando a influência positiva da intensidade luminosa para essa variável. Respostas semelhantes foram obtidas com plantas de gérberas, em que o aumento da intensidade luminosa de 25 para 500 μmol.m⁻².s⁻¹ promoveu um aumento de 12,6 para 23,3 estômatos por mm² na epiderme adaxial e 132,4 para 165,2 estômatos por mm² na epiderme abaxial (ARANDA et al., 1994). Ishimara et al. (2001) demonstraram igual resposta em *Oryza sativa* em que o aumento da intensidade luminosa durante a fase de multiplicação aumentou a densidade estomática.

Tabela 26 - Densidade estômática (estômatos/mm²) da face adaxial de folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | | Média |
|--|---|------------------|---------|
| | 70 ¹ | 140 ¹ | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 25,87 | 30,26 | 28,02 c |
| 30 | 65,24 | 56,28 | 60,64 b |
| 45 | 54,12 | 70,16 | 61,88 a |
| Média | 28,56 b | 30,89 a | |
| CV % | 14,74 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

¹ Observações transformadas segundo ($\sqrt{x+1}$)

Na face abaxial da folha, não houve interação entre luz e sacarose (Tabela 27). A maior densidade estomática ocorreu com a concentração de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 140 μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa (Tabela 27). Portanto, para ambas as faces foliares de *Agapanthus* multiplicadas em MG, verifica-se que o aumento da intensidade luminosa promoveu um aumento da densidade estomática. Segundo Dale (1988), evidências sugerem que o mecanismo de diferenciação estomática é influenciado por complexos biofísicos e bioquímicos, eventos que regulam a divisão e a expansão celular em desenvolvimento de folhas.

No BIT, a maior densidade estomática da face abaxial foi obtida na concentração de 45 g.L⁻¹ (Tabela 28). Não houve efeito da intensidade luminosa para essa variável. Provavelmente, estes resultados se devem ao fato de que na maioria das folhas a face abaxial é responsável pelas trocas gasosas (absorção de CO₂), e a luz é absorvida preferencialmente na face adaxial (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Tabela 27 - Densidade estômática (estômatos/mm²) da face abaxial de folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | | Média |
|--|---|------------------|----------|
| | 70 ¹ | 140 ¹ | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 48,43 | 60,13 | 54,12 c |
| 30 | 91,69 | 116,95 | 103,94 a |
| 45 | 83,15 | 101,03 | 91,88 b |
| Média | 43,99 b | 54,43 a | |
| CV % | | 12,03 | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

¹Observações transformadas segundo ($\sqrt{x+1}$)

Tabela 28 - Densidade estômática (estômatos/mm²) da face abaxial de folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L ⁻¹) | Intensidade Luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | | Média |
|--|---|------------------|---------|
| | 70 ¹ | 140 ¹ | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 34,08 | 47,52 | 40,53 c |
| 30 | 99,77 | 85,84 | 92,68 b |
| 45 | 88,09 | 108,07 | 97,83 a |
| Média | 42,56 a | 47,05 a | |
| CV % | | 12,06 | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

¹ Observações transformadas segundo ($\sqrt{x+1}$)

Além da diferença na densidade estomática verificada nas superfícies foliares de *Agapanthus in vitro*, pode-se notar através de observações microscópicas, que os estômatos presentes nas folhas mostraram alta heterogeneidade no tamanho. Os valores obtidos para o comprimento das células-guarda variou de 30,24 a 43,86 μm,

e para largura variou de 4,85 a 10,54 μm . Segundo Peres (2003) os valores de comprimento obtidos nesse trabalho estão dentro dos limites, que variam de 3 a 12 μm de largura por 7 a 40 μm de comprimento.

O comprimento das células-guarda de ambas as faces foliares e ambos os sistemas de multiplicação utilizados (Tabelas 29, 30, 33 e 34) apresentaram diferenças significativas somente para a concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura. Para intensidade luminosa não houve diferença significativa. Na face adaxial em folhas multiplicadas em MG, o maior comprimento das células-guarda foi obtido na concentração de 45 g.L^{-1} (Tabela 29) e na face abaxial, 30 g.L^{-1} de sacarose (Tabela 30).

Tabela 29 - Comprimento de células-guarda (μm) de estômatos da face adaxial de folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L^{-1}) | Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) | | Média |
|---|---|---------|---------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 33,75 | 31,66 | 32,70 c |
| 30 | 36,24 | 29,30 | 32,77 b |
| 45 | 31,66 | 34,30 | 32,98 a |
| Média | 25,41 a | 23,81 a | |
| CV % | 15,20 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 30 - Comprimento de células-guarda (μm) de estômatos da face abaxial de folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L^{-1}) | Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) | | Média |
|---|---|---------|---------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 36,66 | 32,5 | 34,58 b |
| 30 | 34,85 | 35,41 | 35,13 a |
| 45 | 29,02 | 31,45 | 30,24 c |
| Média | 25,13 a | 24,84 a | |
| CV % | | 9,6 | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

A largura das células-guarda de folhas de *Agapanthus*, apresentaram um comportamento diferenciado. Na face adaxial observou-se interação entre luz e sacarose.(Tabela 31). A maior largura das células-guarda da face adaxial foi obtida com $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e 15g.L^{-1} de sacarose. Dentro da intensidade luminosa de $140 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a maior largura também ocorreu com 15g.L^{-1} de sacarose. Porém, essa largura foi inferior a obtida com intensidade de $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Por outro lado, a face foliar abaxial não apresentou interação entre os fatores sacarose e intensidade luminosa, havendo somente efeito da concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura. Células-guarda mais alongadas foram obtidas na concentração 15g.L^{-1} de sacarose ($7,01 \mu\text{m}$) (Tabela 32). O aumento de sacarose no meio de cultura em ambas as faces foliares promoveu a formação de estômatos com um formato menos alongado e em maior número (Tabela 25), sendo esta a resposta desejada, tendo em vista que com a redução do tamanho das células-guarda pode-se minimizar a perda excessiva de água pelas folhas (ABRANS et al., 1992), podendo influenciar positivamente o comportamento das plântulas durante a fase de aclimatização.

Tabela 31 - Largura de células-guarda (μm) de estômatos da face adaxial de folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L^{-1}) | Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) | |
|---|---|---------|
| | 70 | 140 |
| 0 | 0,00 dA | 0,0 dA |
| 15 | 9,71 aA | 6,52 aB |
| 30 | 5,41 cA | 4,85 cB |
| 45 | 5,83 bB | 5,83 bA |
| CV % | 19,77 | |

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 32 - Largura de células-guarda (μm) de estômatos da face abaxial de folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em meio geleificado por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L^{-1}) | Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) | | Média |
|---|---|--------|--------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 7,50 | 6,52 | 7,01 a |
| 30 | 6,11 | 5,69 | 5,90 b |
| 45 | 5,13 | 5,76 | 5,44 c |
| Média | 4,68 a | 4,49 a | |
| CV % | 17,24 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Para as características comprimento e largura de células-guarda, das faces adaxial e abaxial de folhas de plântulas obtidas do BIT, a concentração de 15 g.L^{-1} de sacarose apresentou os maiores valores independente da intensidade luminosa (Tabelas 33, 34, 35 e 36). As folhas de plântulas multiplicadas nesta concentração

apresentaram menor densidade estomática em ambas as faces (Tabelas 26 e 28), com formato anormal, largos e salientes (Figura 15), características estas não desejáveis, pois segundo Preece & Sutter (1991), uma alteração a nível estrutural e/ou morfológico podem impedir o funcionamento do aparelho estomático e grande parte dos estômatos assim formados são incapazes de se fechar.

Tabela 33 - Comprimento (μm) de células-guarda de estômatos da face adaxial de folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L^{-1}) | Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) | | Média |
|---|---|---------|---------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 43,83 | 43,89 | 43,86 a |
| 30 | 38,23 | 40,82 | 39,53 b |
| 45 | 39,95 | 38,58 | 39,27 c |
| Média | 30,50 a | 30,82 a | |
| CV % | 11,05 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 34 - Comprimento (μm) de células-guarda de estômatos da face abaxial de folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L^{-1}) | Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) | | Média |
|---|---|---------|---------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 42,49 | 44,60 | 43,55 a |
| 30 | 38,43 | 38,98 | 38,71 c |
| 45 | 42,49 | 38,30 | 40,40 b |
| Média | 30,85 a | 30,47 a | |
| CV % | 11,23 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 35 - Largura (μm) de células-guarda de estômatos da face adaxial de folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L^{-1}) | Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) | | Média |
|---|---|--------|---------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 10,45 | 10,63 | 10,54 a |
| 30 | 8,16 | 11,32 | 9,74 b |
| 45 | 8,76 | 8,66 | 8,71 c |
| Média | 6,84 a | 7,65 a | |
| CV % | 23,06 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Tabela 36 - Largura (μm) de células-guarda de estômatos da face abaxial de folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária por um período de 60 dias, submetidas a quatro concentrações de sacarose e dois níveis de intensidade luminosa.

| Concentração Sacarose (g.L^{-1}) | Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) | | Média |
|---|---|--------|--------|
| | 70 | 140 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 d |
| 15 | 9,27 | 10,28 | 9,77 a |
| 30 | 7,74 | 9,86 | 8,80 b |
| 45 | 8,17 | 8,37 | 8,27 c |
| Média | 6,29 a | 7,12 a | |
| CV % | 23,74 | | |

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas e colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

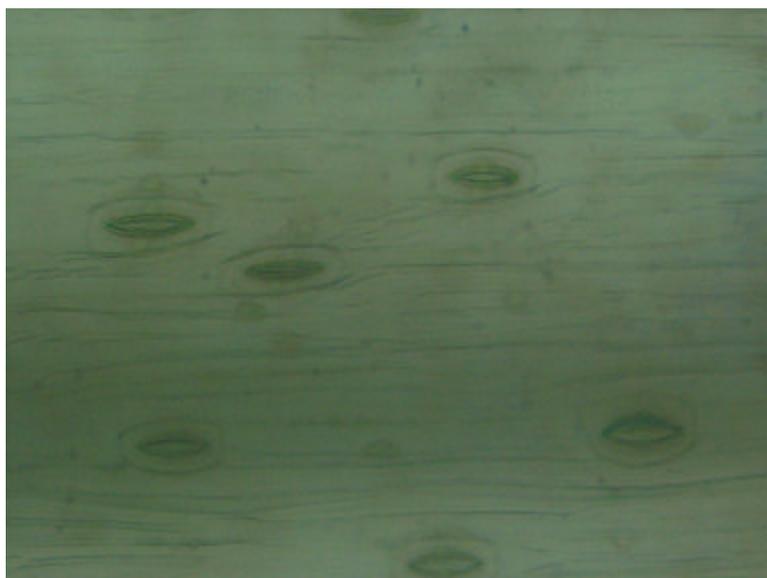


Figura 15 - Aspecto visual dos estômatos *in vitro* de folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária, na concentração de 15 g.L⁻¹ de sacarose e 70 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa.

Possivelmente, este resultado se deve às características de vitrificação que as folhas do tratamento 15 g.L⁻¹ de sacarose e 70 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa apresentaram (BLANKE & BELCHER, 1989) e a falta de energia armazenada no explante com a falta de carbono, que é proveniente da sacarose adicionada ao meio de cultura (DESJARDINS, 1995). Estes resultados corroboram com os obtidos por Viña et al. (2001) que demonstraram que folhas vitrificadas de abacateiro apresentaram estômatos grandes, com saliência, células subsidiárias assimétricas e deformadas e seu ostíolo completamente aberto. Tal anomalia pode ser atribuída à perda da elasticidade das paredes das células-guarda, o que impediria o seu movimento de abertura e fechamento, que conseqüentemente afeta o desenvolvimento das plântulas ao serem transferidas para condições *ex vitro*, através da excessiva perda de água.

Para as demais concentrações 30 e 45 g.L⁻¹ de sacarose utilizadas, as reservas de energia armazenadas foram suficientes para o desenvolvimento de

estômatos com forma elíptica e pouca variação no tamanho (Tabelas 33, 34, 35 e 36).

Concluindo, os resultados obtidos revelam que as condições ambientais, principalmente intensidade luminosa e sacarose influenciaram na densidade estomática em folhas de *Agapanthus umbellatus* var. minor. As características biométricas dos estômatos foram influenciadas somente pela concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura. Tendo em vista que não só a densidade mas também as características biométricas dos estômatos apresentam grande importância, pois estão diretamente relacionados à perda de água pelas plântulas quando transferidas para condições *ex vitro*, os resultados obtidos demonstram que o tratamento 30 g.L⁻¹ de sacarose e 70 μmol.m⁻².s⁻¹ de luz apresentou características desejáveis, ou seja, o maior número de estômatos com formato elíptico e pouca variação no tamanho, que possivelmente apresentarão um bom funcionamento durante a fase de aclimatização. É bom ressaltar que este resultado está relacionado a face abaxial, visto que esta é responsável pelas trocas gasosas.

Resumindo, os resultados obtidos no MG e no BIT revelaram que houve variação nas características morfológicas avaliadas para a variação de concentração de sacarose. Portanto, faz-se necessário uma avaliação em conjunto das variáveis, para se determinar a combinação luz x sacarose mais adequada. Assim, sugere-se a combinação de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 70 μmol.m⁻².s⁻¹ de luz para a fase de multiplicação de *Agapanthus*, tendo em vista que esse tratamento apresentou melhores resultados para número de brotações (no MG), massa fresca e seca e número de folhas (no BIT), estas que são consideradas órgãos estoques de nutrientes que poderá afetar a fase de aclimatização. E similarmente, apresentou melhores resultados para concentração de clorofila *a*, *b* e total, densidade e características estomáticas nos dois sistemas de multiplicação utilizados. Cabe destacar, por último, a necessidade da realização de mais pesquisas a fim de se estabelecer qual seria a melhor combinação entre sacarose e luz para a fase de aclimatização.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos para as características morfo-fisiológicas de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor indicaram claramente que as condições ambientais, principalmente intensidade luminosa e concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura influenciaram no desenvolvimento e crescimento das plântulas quando multiplicadas em MG ou em meio líquido no BIT.

Pode-se observar que plântulas de *agapanthus* foram incapazes de se desenvolver em meio sem sacarose, sendo portanto necessária a adição de uma fonte de carbono, visto que a espécie em estudo apresentou uma taxa de fotossíntese incapaz de assegurar um balanço positivo em carbono.

Houve uma grande variação nas respostas obtidas para as variáveis analisadas, em relação as concentrações de sacarose adicionada no meio de cultura e a intensidade luminosa nos dois sistemas de multiplicação utilizados no presente trabalho. Portanto, faz-se necessário uma avaliação em conjunto das variáveis. Tanto para MG quanto para BIT recomenda-se 30 g.L⁻¹ de sacarose e intensidade luminosa de 70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, pois esta combinação promoveu as melhores respostas para número de brotações, número de folhas, massa fresca, concentração de clorofila *a*, *b* e total, densidade e características biométricas dos estômatos, fatores estes que têm grande influência na fase de aclimatização. No entanto, deve-se ressaltar que estudos mais aprofundados devem ser conduzidos, para verificar o efeito destas combinações sobre o desempenho de plântulas durante a fase de aclimatização.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANS, M. C.; KLOEPEL, B. D., KUBISKE, M. E. Ecophysiological and morphological responses to shade and drought in two contrasting ecotypes of *Prunus serotina*. **Tree Physiology**, v. 10, p. 343 - 355, 1992.

ARANDA, R. R.; GARAY, R. C.; MARTINEZ, P. F. Distribution and density of stomata in two cultivars of *Gerbera jamesonii* and its relation to leaf conductance. **Scientia Horticulture**, v. 58, p. 167 - 173, 1994.

ARIGITA, L.; CONZÁLEZ, A. TAMÉS, R. S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explantes cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 115, p. 166 - 173, 2002.

BLANKE, M. M. & BELCHER, A. R. Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 19, p. 85 - 89, 1989.

CALVETE, E.O.; AZEVEDO, M., BORDIGNON, M. I. I.; SUZIN, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 649 - 653, 2002.

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

CUI, Y. Y.; HAHN, E. J.; KOZAI, T.; PAEK, K. Y. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 62, p. 219 - 226, 2000.

DALE, J. E. The control of leaf expansion. **Annual Review Plant Physiology**, v. 39, p. 267 - 295, 1988.

DEBERGH, P.; HARBAOUI, Y.; LEMEUR, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara Scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potencial. **Physiology Plantarum**, v. 53, p. 181 - 187, 1981.

DESJARDINS, Y. Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plants and their effect on acclimatization. In: CARRE, F. & CHAGVARDIEFF, P (Eds) **Ecophysiology and Photosynthetic *in vitro* Cultures**, CEA, France. 1-3 december, p. 145 - 160, 1993.

DESJARDINS, Y.; HDIDER, C.; RICK, J de. Carbon nutrition *in vitro* - regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In: CHRISTIE, J. A.; KOZAI, T; SMITH, M. A. L, **Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture**, p. 441 - 471, 1995.

DONNELLY, D. J. & VIDAVER, W. E. PIGMENT CONTENT AND GAS EXCHANGE OF RED RASPBERRY *IN VITRO* AND *EX VITRO*. **JOURNAL AMERICAN SOCIETY HORTICULTURAL SCIENCE**, V. 109, N. 2, P. 117 - 181, 1984.

DURING, H. & HARST, M. Stomatal behavior, photosynthesis and photorespiration of *in vitro* grown grapevines: Effects of light and CO₂. **Vitis**, v. 35, n. 4, p. 163 - 167, 1996.

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

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 69, p. 215 - 231, 2002.

EXTERCKOKER, R. & PEDROTTI, E. L. MICROPROPAGAÇÃO DE *AGAPANTHUS UMBELLATUS* VAR. MINOR. In: **XIII Congresso Brasileiro de Floricultura**, 2001. Resumos. São Paulo. 2001. 250 P.

FIGUEIRA, A. & JANICK, J. OPTIMIZING CARBON DIOXIDE AND LIGHT LEVELS DURING *IN VITRO* CULTURE OF *TREOBROMA CACAO*. **JOURNAL AMERICAN SOCIETY HORTICULTURAL SCIENCE**, V. 119, P. 865 - 871, 1994.

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

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

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Eversley: Exergetics, 2 ed, v. 2, 1996. 1361p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: Torres *et al.* **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA, Brasília – DF, v. 1, p. 183 - 260, 1998.

GROUT, B. W. W. & MILLAN, S. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. **Annals Botany**, v. 55, p. 121 - 131, 1985.

GROUT, B. W. W. & DONKIN, M. E. Photosynthetic activity of cauliflower meristem cultures *in vitro* and at transplanting into soil. **Acta Horticulture**, v. 212, p. 323 - 327, 1987.

HDIDER, C. & DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 36, p. 27 - 33, 1994.

HISCOX, J. D. & ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal Botanic**, v. 57, p. 1332 - 1334, 1979.

ISHIMARA, K.; SHIROTA, K.; HIGA, M; KAWAMITSU, Y. Identification of quantitative trait loci for adaxial and abaxial stomatal frequencies in *Oryza sativa*. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 39, p. 173 - 177, 2001.

KONOW, E. A. & WANG, Y. T. Irradiance levels affect *in vitro* and greenhouse growth, flowering, and photosynthetic behavior of a hybrid *Phalaenopsis* Orquid. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 126, n. 5, p. 531 - 536, 2001.

KOZAI, T.; OK, H. & FUJIWARA, K. Photosynthetic characteristic of *Cymbidium* plantlets *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 22, p. 205 - 211, 1990.

KRAMER, P.J. **Plant and soil water relationship: modern synthesis**, New York, Mc Graw Hill, 1969. 538p.

KRAMER, T & KOZLOWSKI, T. **Physiology of woody plants**. New York, Academic Press, p. 1 - 18, 1979.

KRISTIANSEN, K.; ORNSTRUP, H. & BRANDT, K. *IN vitro* PPFD and media composition affect both *in* and *ex vitro* performance of *Alstroemeria* Butterfly-hybrids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 56, p. 145 - 153, 1999.

LANGFORD, P. J. & WAINWRIGHT, H. effect of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. **Annals Botany**, v. 60, p. 633 - 640, 1987.

LA ROSA, P.C.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R. A. Photoautotrophic potato cells: transition from heterotrophic to autotrophic growth. **Physiology Plantarum**, v. 61, p. 279 - 286, 1984.

LEE, N.; WETZSTEIN, Y. & SOMMER, H. E. Effect 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 Physiology**, v. 78, p. 637 - 641, 1995.

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

LEITE, G. B.; FINARDI, N. FORTES, G. R. L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de pereira OHX97. **Ciência Agrotécnica**, v. 24, n. 2, p. 353 - 357, abr/jun, 2000.

LIAN, M. L.; MURTHY, H. N. & PAEK, K. Y. Culture method and photosynthetic photon flux affect photosynthesis, growth and survival of Limonium "Misty Blue" *in vitro*. **Scientia Horticulture**, v. 95, p. 239 - 249, 2002.

LOURO, R. P. & SANTIAGO, L. J. M. Ultraestrutura de plantas cultivadas *in vitro*. **Caderno de Pesquisa Série. Botânica**, Santa Cruz do Sul. v. 12, n. 1, p. 99 - 107, 2000.

LU, M. C. Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees. **Scientia Horticulture**, v. 1835, p. 1 - 13, 2002.

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

MURASHIGE, T.; & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473 - 497, 1962.

NGUYEN, Q. T.; KOZAI, T.; NGUYEN, U. V. Effects of sucrose concentration, supporting material and number of air exchanges of the vessel on the growth of *in vitro* coffee plantlets. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, n. 58, p. 51 - 57, 1999.

NICOLOSO, F. T.; SARTORI, J. S.; ARAUJO, W. L. D.; LUCIO, A. D. C. Citocininas no crescimento e desenvolvimento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). Disponível em: www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-062.pdf. Acesso em 18 de setembro de 2003.

NUNES, J. C. de O. Caracterização morfofisiológica de porta-enxertos de macieira (*Malus* spp) nos sistemas de cultura *in vitro* e *ex vitro*. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001. 92p.

PASQUAL, M.; HOSHIKA, E.; ISHIDA, J. S. Influência de diferentes concentrações de sacarose e sais minerais sobre a multiplicação *in vitro* de *Nepholopsis exaltata* uma samabaia ornamental. In: **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 11, p. 1681 - 1684, nov., 1994.

PERES, L. E. P. **Relações Hídricas II – Fisiologia dos estômatos**. Disponível em: <http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/RelacoesHidricasII.html> Acesso em 15 de agosto de 2003.

POSPÍSILOVÁ, J.; CATSKÝ, J.; SOLÁROVÁ, J.; TICHÁ, I. Photosynthesis of plant regenerants, Specificity of *in vitro* conditions and plantlet response. **Biology Plantarum**, v. 29, p. 415 - 421, 1987.

POSPÍSILOVÁ, J.; SOLÁROVÁ, J.; CATSKÝ, J.; ONDREJ, M.; OPATMY, Z. The photosynthetic characteristics during the micropropagation of tobacco and potato plants. **Photosynthetica**, v. 22, p. 205 - 213, 1988.

POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; HADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 42, n. 4, p. 481 - 497, 1999.

PREECE, J. E. & SUTTER, E. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh P. & Zimmerman R. (eds). **Micropropagation: Technology and Application**, Dordrecht, p. 71 - 94, 1991.

REUTHER, G. Stimulation of the photoautotrophy of *in vitro* plants. In: International Horticultural Congress, Firenze, 1990, Abstracts...Firenze: 1990.

SALISBURY, F. B. Responses to photoperiod. In: PITSON, A. & ZIMMERMANN, M. H. (Edd). **Encyclopedia of plant physiology**, New series 12 A. Springer – Verlag, Berlin, p. 134 - 167, 1981.

SCIENZA, A. & BOSELLI, M. Fréquence et caractéristiques biométriques des stomates de certain port-greffes de vigne. **Vitis**, v. 20, p. 281 - 282, 1981.

SCIUTTI, R. & MORINI, S. Modified stomatal characteristics in actively proliferating *in vitro* plum cultures at varying levels of relative humidity. **Advance Horticulture Science**, v. 7, p. 1557 - 159, 1993.

SEKO, Y.; NISHIMURA, M. Effect of CO₂ and light on survival and growth of rice regenerants grown *in vitro* on sugar-free medium. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 46, p. 257 - 264, 1996.

SERRET, M. D.; TRILLAS, M. I.; ARAUS, J. L. The effect of sucrose and light levels on stable carbon isotope composition and photosynthetic pigments of gardenia leaflets *in vitro*. In: Carre, F. & Chagvardieff P(Eds) **Ecophysiology and Photosynthetic in Vitro Cultures**, Cadarache, CEA, p. 169 - 172, 1995.

SHACKEL, K. A.; NOVELLO, V. & SUTTER, E. G. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. **Journal American Society Horticultural Science**, v. 115, n. 30, p. 468 - 472, 1990.

SMITH, H. Light quality, photoperception, and plant strategy. **Annu. Ver. Plant Physiology**, v. 33, p. 481 - 518, 1982.

STELL, R. G. D. & TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics – A biometrical approach**, 2 ed. New York, Macgraw – Hill, 1980. 633p.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Tradução de Eliane Romanato Santarém *et al.* Porto Alegre: Artmed, 3. Ed, 2004. 719 p. Título original: Plant Physiology.

TICHÁ, I.; CÁP, F.; PASCOVSKÁ, D.; HOFMAN, P.; HAISEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SHAFER, C. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 102, p. 155 - 162, 1998.

VAN HUYLENBROECK, J. M. & DEBERGH, P. C. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. **Physiologia Plantarum**, v. 96, p. 298 - 304, 1996.

VLHAHOS, J. C.; MARTAKIS, G. F. P.; HEUVELINK, E. Daylength, light quality, and temperature influence growth and development of *Achumenes*. *HortScience*, v. 27, p. 1269 - 1271, 1992.

VINÃ, G de la ; ALFARO, F. P.; DRESCOLL, S. P.; MITCHELLE, V. J.; PARRY, M. A.; LAWTAR, D. W. Effects of CO₂ and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown in vitro. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 37, n. 7/8, p. 587 - 595, 1999.

VINÃ, G de la; MUÑOZ, B. ALFARO, F. P. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 65, p. 229 - 237, 2001.

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

Capítulo III

Metabolismo de α -D-glucose em plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor cultivadas em biorreator de imersão temporária, via ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN)

RESUMO

Culturas de células e tecidos vegetais *in vitro* metabolizam carboidratos presentes no meio de cultura para suprir a energia necessária para os processos metabólicos que induzem ao crescimento e a diferenciação. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o metabolismo de α -D-glucose em plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor, cultivadas em biorreator de imersão temporária, submetidas a tratamentos de concentrações de sacarose e intensidades luminosas, via ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN). Para tal, plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor foram mantidas em frascos de biorreatores de imersão temporária contendo 500 mL de meio líquido e sais de MS, suplementado com 8,6 μM de BAP e sacarose (43,82; 87,64; 131,46 mM). Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob intensidade luminosa de 70 e 140 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Lâmpadas PHILIPS – TLT 40W), fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, por um período de 60 dias. Para efeitos de determinação dos valores de concentração, a cada 7 dias, amostras de 10 mL de meio de cultura foram coletados, concentrados em ambiente de estufa (50°C até peso constante) e ressuspensos em 750 μL de D_2O . As amostras foram centrifugadas (14 Krpm/5min) e 650 μL do sobrenadante foi coletado e transferido para tubo de 5 mm para análise do teor do carboidrato de interesse por espectroscopia de ^1H -RMN. Os espectros foram processados em equipamentos Bruker AC 200, operando em frequência de ressonância de hidrogênio de 200 MHz. Os espectros de ^1H -RMN revelaram a presença de α -D -Glucose em todos os períodos amostrais, sugerindo a existência de um sistema enzimático extracelular (invertase) no cultivo de *Agapanthus*. Adicionalmente, foi observado que plântulas de *Agapanthus* apresentaram três etapas distintas na assimilação de fonte de carbono exógena para atender as fases de crescimento *in vitro*. A maior demanda da fonte de carbono do meio de cultura ocorreu na segunda etapa devido ao intenso metabolismo decorrente do processo de morfogênese para a formação de novas brotações.

ABSTRACT

Cultures of cells and tissue of plants *in vitro* they metabolize present carbohydrates in the medium of culture to supply the necessary energy for the metabolic processes that induce to the growth and the differentiation. In this context, the present work had as objective studies the metabolism of α -D-glucose in shoots of *Agapanthus umbellatus* var. minor, cultivated in system of biorreator of temporary immersion, submitted to treatments of sucrose concentrations and luminous intensities, through nuclear magnetic resonance of hydrogen (^1H -RMN). For such, shoos of *Agapanthus umbellatus* var. minor were maintained in flasks in system of temporary immersion containing 500 mL of liquid medium and salt MS, supplementary with 8,6 μM of BAP and sucrose (43,82; 87,64; 131,46 mM). The flasks were maintained in growth room under luminous intensity of 70 and 140 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (light bulb PHILIPS–TLT 40W), light spring of 16 hours and temperature of $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, for a period of 60 days. For effects of determination of the concentration values, every 7 days, samples of 10 mL of medium of culture were collected, concentrated in stove (50 $^\circ\text{C}$ even constant weight) and resuspense in 750 μL of D_2O . The samples were centrifuged (14 Krpm/5min) and 650 μL of the suspension was collected and transferred for tube of 5 mm for analysis of the content of the carbohydrate of interest for espectroscopia of ^1H -RMN. The spectra were processed in equipments Bruker AC 200, operating in frequency of resonance of hydrogen of 200 MHz. The spectra of ^1H -RMN revealed the presence of α -D -Glucose in all the periods of the collection, suggesting the existence of a system enzymatic extracelular (invertase) in the *Agapanthus* cultivation. In addition, it was observed that shoots of the *Agapanthus* presented three different stages in the assimilation of source of carbon to assist the phases of *growth in vitro*, where the largest demand of the source of carbon of the medium of culture happened in the second stage due to the intense metabolism due to the morphogenetic process for the formation of new shoots.

1 INTRODUÇÃO

As vias de assimilação de carbono (Via C₃, Via C₄, Metabolismo Ácido das Crassuláceas ou CAM) constituem um ponto essencial do metabolismo característico de plantas *in vitro*. Devido às condições de cultura, a planta normalmente dispõe do CO₂ atmosférico, mas pode assimilar simultaneamente o(s) carboidrato(s) presente(s) no meio de cultura (GALZY & COMPAN, 1992), resultando em um estado mixotrófico geralmente marcado por uma fotossíntese líquida limitada (LANGFORD & WAINWRIGHT, 1987; CAPELLADES et al., 1991).

Dentre os carboidratos adicionados ao meio de cultura durante o processo de micropropagação, a sacarose é a principal fonte de carbono utilizada (FIGUEIRA & JANICK, 1994; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). De acordo com estes autores, esta fonte de carbono possibilita altas taxas de crescimento para a maioria das espécies vegetais. Ao mesmo tempo, reconhece-se que a presença desse carboidrato inibe intensamente a biossíntese da clorofila e, conseqüentemente, a capacidade fotossintética das plantas (GEORGE & SHERRINGTON, 1984; DENG & DONNELLY, 1993; FIGUEIRA & JANICK, 1994). No entanto, foi demonstrado que em alguns casos a presença de carboidratos no meio de cultura aumenta o nível de componentes fotossintéticos, tais como as clorofilas *a* e *b* e a atividade fotossintética (GALZY & COMPAN, 1992; TICHÁ et al., 1998). Apesar, de que evidências tenham sido acumuladas sobre os efeitos negativos da adição de açúcares ao meio de cultura sobre o desenvolvimento do aparato fotossintético, a total remoção destes, freqüentemente, torna-se detrimental para o crescimento de plantas micropropagadas (CAPELLADES et al., 1991; DESJARDINS, 1995).

Além de afetar o crescimento de plântulas e de culturas celulares *in vitro*, o tipo e a concentração de carboidrato também afeta a biossíntese de compostos bioativos de interesse. Diversas fontes de carbono têm sido testadas quanto à habilidade em manter o crescimento de culturas celulares vegetais e em estudos de otimização da síntese de metabólitos secundários *in vitro*. Culturas celulares de *Mandevilla velutina* mantidas em meio de cultura suplementado com 3% de glicose como única fonte de carbono apresentaram os maiores valores de síntese e acumulação de velutinol A em relação a outros carboidratos utilizados (frutose, lactose e amido) (MARASCHIN, 1998).

Em adição à utilização de açúcares exógenos, a concentração destes também é um ponto importante. Valores de 2 a 4% são mais comumente utilizados em meio de cultura. Abaixo desta faixa de concentração, pode ocorrer clorose tissular, enquanto valores superiores podem gerar problemas de diminuição do potencial osmótico do meio, possibilitando a deterioração das culturas (GEORGE, 1996; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Há relatos de que cultivos de diversas espécies apresentaram melhor crescimento em meios contendo sacarose autoclavada, sugerindo que a morfogênese *in vitro* pode ser favorecida pela ocorrência dos produtos de hidrólise deste dissacarídeo, i.e., glucose e frutose no meio de cultura (GALZY & COMPAN, 1992; BÜTTER et al., 1993; GEORGE, 1996). Paiva Neto & Otoni (2003) demonstraram que a autoclavagem do meio de cultura contendo sacarose como única fonte de carbono resultou em 10-15% de carboidrato hidrolizado. Este valor pode variar de acordo com o pH do meio de cultura. Além disto, estes autores observaram que a extensão da hidrólise deste dissacarídeo também dependeu do modo de esterilização, juntamente com os demais componentes em solução aquosa (GEORGE & SHERRINGTON, 1984; BÜTTER et al., 1993). De forma similar, MOREIRA (2000) observou que a hidrólise da sacarose estava fortemente relacionada às atividades metabólicas das plantas *in vitro*, uma vez que em meio de cultura sem explantes, a sacarose não foi hidrolisada, de modo que os teores iniciais e finais daquele dissacarídeo não variaram. A hidrólise do açúcar no meio de cultura ocorre gradualmente, realizada pela ação de invertase(s) adsorvida(s) a componente(s) de parede celular vegetal (BURSTROM, 1957; YOSHIDA et al., 1973; PEIXOTO & PASQUAL, 1995; GEORGE, 1996), ou ainda de ocorrência livre em ambiente extracelular, como foi observado em tecidos radiculares, por exemplo (KING & STREET, 1977, PEIXOTO & PASQUAL, 1995; GEORGE, 1996). Dados recentes demonstram a ocorrência de metabolização extracelular de lactose por via enzimática, em culturas celulares de *Mandevilla velutina*, com o uso da ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$ – ARAÚJO, 2001, ARAUJO et al., 2002).

Os efeitos fisiológicos e bioquímicos que a adição de açúcares exógenos promovem durante o cultivo *in vitro* permanecem pouco conhecidos. Assim, estudos sobre o metabolismo do carbono e a fixação de CO_2 assumem importância na análise da produção de fitomassa vegetal *in vitro* e na sobrevivência das plantas na fase de aclimatização (DESJARDINS, 1995).

A capacidade de metabolização de fontes de carbono pelas plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro* pode ser investigada através de diversas técnicas, sendo a espectrometria de ressonância magnética nuclear ($^1\text{H-RMN}$) (ROBERTS & JARDETZKY, 1981; ROBERTS, 1984; SCHRIPSEMA, 1991; ARAÚJO, 2001; OLTRAMARI, 2002) uma das possibilidades. O uso deste método de alta resolução tem crescido em diversas áreas de pesquisa, devido ao rápido desenvolvimento de instrumentos e *softwares* durante os últimos anos. Esta técnica tem sido utilizada em estudos de amostras biológicas que incluem: urina, plasma sanguíneo, bile e extratos de tecidos, para a obtenção de informações sobre os processos metabólicos e na análise da ocorrência de compostos de interesse farmacológicos encontrados em vinhos e derivados de uva (MARASCHIN et al., 2004; MARASCHIN et al., 2004), por exemplo, além de mostrar um grande potencial no que diz respeito à caracterização fitoquímica de culturas celulares (SCHRIPSEMA, 1991). Neste contexto, a RMN tem sido utilizada na quantificação de carboidratos intra e extracelulares em culturas de células vegetais de *Tabernamona divaricata* (SCHRIPSEMA et al., 1991); *Mandevilla velutina* (ARAÚJO, 2001) e *Ocotea odorifera* (OLTRAMARI et al., 2001; ARSEGO et al., 2003), bem como na identificação e elucidação de metabólitos produzidos pelas plantas em estudos biossintéticos (SCHEIDER, 1997).

O presente trabalho teve como objetivo estudar o metabolismo de $\alpha\text{-D-glucose}$ em plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor, cultivadas em biorreator de imersão temporária, submetidas a tratamentos de concentrações de sacarose e intensidades luminosas, via ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultivo *in vitro* de plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor em biorreator de imersão temporária

Plântulas de *Agapanthus umbellatus* var. minor com 120 dias, oriundas de culturas estoques em meio de Murashige & Skoog (1962 – MS) semi-sólido (0,6% ágar-ágar), suplementado com 17,8 μM de BAP, foram coletadas e padronizadas, (altura de aproximadamente 2,5 cm e número de folhas igual a três). As plântulas foram transferidas para biorreatores de imersão temporária, segundo recomendações de Etienne & Berthouly (2002), contendo 500 mL de meio líquido e sais de MS, suplementado com 8,9 μM de BAP e três concentrações de sacarose (43,82; 87,64; 131,46 mM). Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob intensidade luminosa de 70 ou 140 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Lâmpadas PHILIPS – TLT 40W), fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por um período de 60 dias.

2.2 Análise do metabolismo de α -D-glucose via $^1\text{H-NMR}$

A determinação da metabolização de α -D-glucose, presente no meio de cultura, pelas plântulas de *Agapanthus* foi realizada durante um período de 60 dias de cultivo. Para a determinação da concentração de α -D-glucose, amostras de meio de cultura foram coletadas em intervalos regulares, i.e., imediatamente após a autoclavagem (tempo zero), 7, 15, 30 e 60 dias após o início do cultivo de *Agapanthus umbellatus* var. minor em ambiente de biorreator de imersão temporária.

A cada período amostral, 10 mL do meio de cultura foram coletados, concentrados em ambiente de estufa (50°C até peso constante) e ressuspensos em 750 μL de D_2O . As amostras foram centrifugadas (14 Krpm/5min) e 650 μL do sobrenadante foi coletado e transferido para tubo de 5 mm para análise do teor do carboidrato de interesse por espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$. Os espectros foram processados em equipamentos Bruker AC 200, operando em frequência de ressonância de hidrogênio de 200 MHz. O ácido 3-trimetil silil propiônico (15 mg/100mL) foi utilizado como padrão interno, conforme metodologia proposta por SCHRIPSEMA (1991). Para efeitos da quantificação de α -D-glucose, utilizou-se uma

curva- padrão de α -D-glucose (1% a 5% p/v), construída a partir do cálculo da relação entre a altura dos picos de α -D-Glucose [$\delta = 5,20$ ppm] e do padrão interno [TSP, $\delta = 0,00$ ppm] (MARASCHIN & CARO, dados não publicados).

2.3 Análise dos dados

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, formando um fatorial 3x2, em um total de seis tratamentos. Cada tratamento foi composto por um frasco de imersão temporária contendo 50 plantas.

Os dados de concentração de α -D-glucose obtidos por $^1\text{H-NMR}$ foram submetidos à análise de regressão, a um nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Culturas de células e tecidos vegetais *in vitro* metabolizam carboidratos presentes no meio de cultura para suprir a energia necessária para os processos metabólicos que induzem ao crescimento e a diferenciação. Segundo VU et al. (1995), existem duas vias de hidrólise da sacarose. A primeira é chamada de “via clássica”, mediada pela ação da invertase e que produz glucose e frutose como produtos finais, sendo que estes produtos podem ser fosforilados pela hexoquinase e fosfofrutoquinase, respectivamente, para subsequente metabolização (HUBER & AKAZAWA, 1986). A segunda via denomina-se de “via alternativa”, onde a sacarose sintase inverte a sacarose em frutose e UDP glucose.

Os espectros de ¹H-RMN das amostras em estudo revelaram a presença de sinais típicos de α-D-glucose [δ = 5,20 ppm] ao longo de todo o período experimental (Tabela 37), indicando a existência de sistema enzimático (invertase) determinando o processo de hidrólise da sacarose. O monitoramento do metabolismo de sacarose em sistemas de cultivo *in vitro* de plântulas de videira (GALZY & COMPAN, 1992; MOREIRA 2000) e de células de *Mandevilla velutina* (ARAÚJO, 2001) e de *Ocotea odorifera* (OLTRAMARI et al., 2001) apresentaram resultados similares, demonstrando a metabolização inicial daquele dissacarídeo na forma de hexoses, i.e. glucose e frutose.

Tabela 37 Concentração de α-D-glucose (mM) em meio de cultura líquido, suplementado com três concentrações de sacarose, em culturas de *Agapanthus umbellatus* var. minor, em biorreator de imersão temporária, sob duas intensidades luminosas.

| Sacarose (mM) – Intensidade luminosa (μmol.m ⁻² .s ⁻¹) | a-D-glucose (mM) | | | | |
|---|--------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | Período de coleta (dias) | | | | |
| | 0 | 7 | 15 | 30 | 60 |
| 43,82 - 70 | - | - | 0,079 | 0,071 | 0,342 |
| 43,82 - 140 | - | 0,083 | 0,079 | - | - |
| 87,64 - 70 | - | 0,095 | 0,079 | 0,067 | 0,184 |
| 87,64 - 140 | - | 0,071 | 0,026 | 0,062 | 0,099 |
| 131,46 - 70 | - | 0,115 | 0,051 | 0,074 | 0,099 |
| 131,46 - 40 | - | - | 0,046 | 0,148 | - |

A análise de regressão dos dados de concentração de α -D-glucose obtidos por $^1\text{H-RMN}$ revelou ser possível separar em três etapas a metabolização do carboidrato de interesse, sugerindo a ocorrência de cinéticas distintas ao longo do período de cultivo, seguindo um modelo cúbico em todos os tratamentos (Figuras 16, 17 e 18).

A primeira etapa compreende os sete primeiros dias de cultivo e corresponde ao momento da introdução dos explantes no meio de cultura até o início da formação de novas brotações axilares. Neste período, observou-se uma tendência em aumentar a concentração de α -D-glucose no meio de cultura, sugerindo a existência de um sistema enzimático (invertase) ativo nas condições de cultivo utilizadas. Esta observação está de acordo com as observações prévias feitas por George (1996). No entanto, a sobreposição dos sinais nos espectros de $^1\text{H-RMN}$ dos meios de cultura na coleta amostral do tempo zero, dificultou determinar a concentração de α -D-Glucose e conseqüentemente a determinação de quanto foi o aumento (Tabela 1).

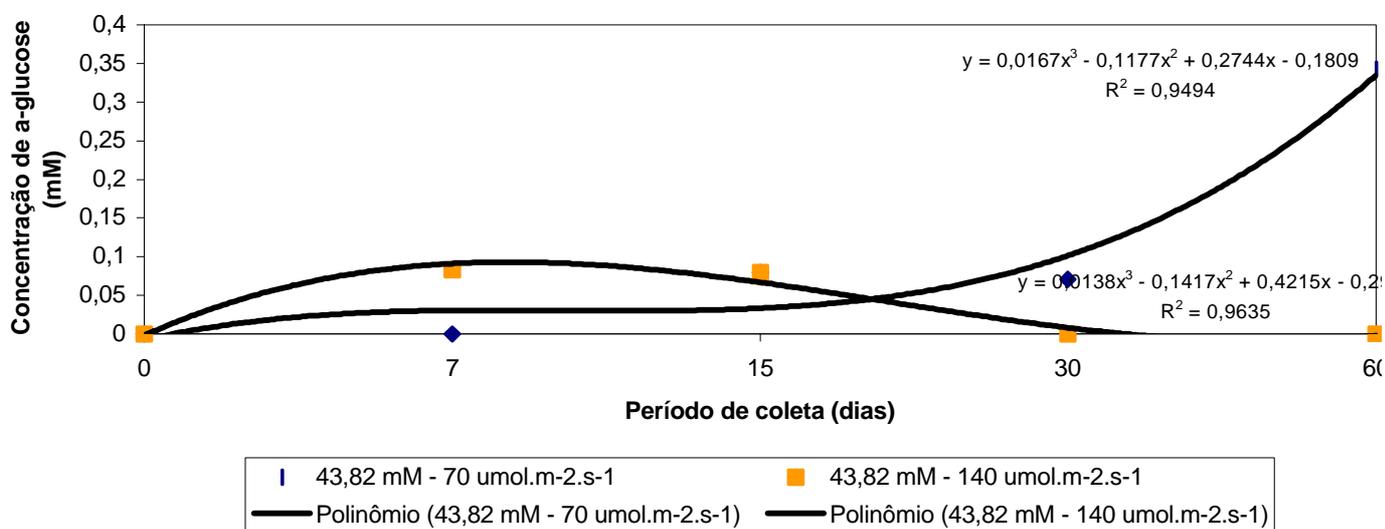


Figura 16 Concentração de α - D-glucose em meio de cultura suplementado com 43,82 mM de sacarose, determinada por $^1\text{H-RMN}$, em sistema de cultivo de *Agapanthus umbellatus* var. minor, em biorreator de imersão temporária, sob intensidades luminosas de 70 e 140 ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

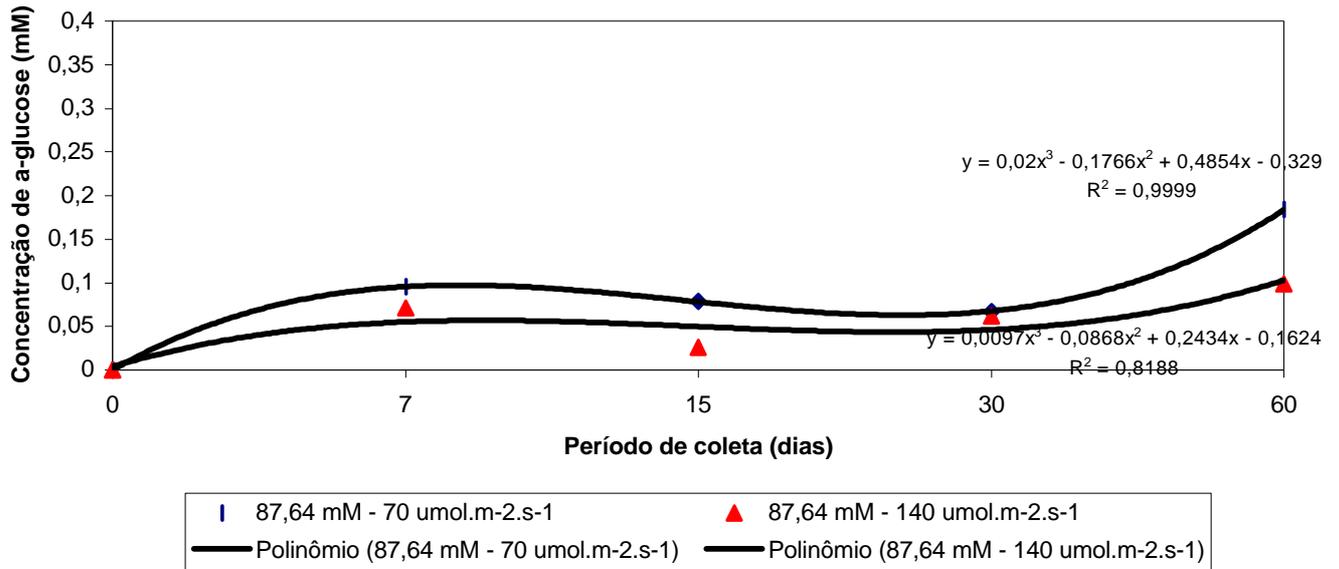


Figura 17 Concentração de α -D-glucose em meio de cultura suplementado com 87,64 mM de sacarose, determinada por ^1H -RMN, em sistema de cultivo de *Agapanthus umbellatus* var. minor, em biorreator de imersão temporária, sob intensidades luminosas de 70 e 140 ($\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

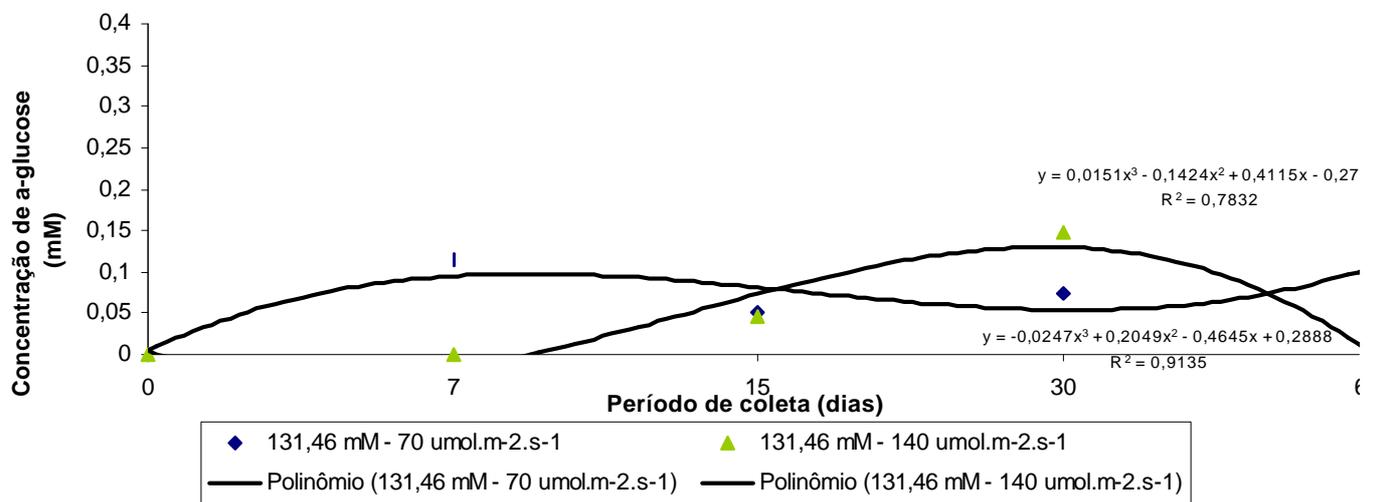


Figura 18 Concentração de α -D-glucose em meio de cultura suplementado com 131,46 mM de sacarose, determinada por ^1H -RMN, em sistema de cultivo de *Agapanthus umbellatus* var. minor, em biorreator de imersão temporária, sob intensidades luminosas de 70 e 140 ($\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

A segunda etapa de metabolização compreende o período de cultivo entre 7 a 30 dias, onde foi observada uma hidrólise mais intensa de sacarose em relação à primeira etapa. Neste período, percebeu-se uma grande demanda da fonte de carbono do meio de cultura, possivelmente relacionada à insuficiente quantidade de reservas nutritivas dos explantes necessárias à manutenção do intenso metabolismo decorrente do processo de rediferenciação para a formação de novas brotações. Resultados semelhantes foram observados em cultivos *in vitro* de plântulas de videira, sendo atribuídos à não existência de um aparato fotossintético estabelecido (MOREIRA, 2000). Neste período, pode-se verificar que o aumento da intensidade luminosa de 70 para 140 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ influenciou o metabolismo do açúcar nos meios de cultura suplementados com 43,82 e 131,46 mM de sacarose (Figuras 16 e 18). Indiferente da concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura, observou-se que a concentração de α -D-glucose diminuiu ao longo do período de estudo e, possivelmente, todo o açúcar foi depletado antes do término do período experimental. Este resultado demonstra que a despeito do fato de as plântulas encontrarem-se submetidas a uma maior intensidade luminosa, estas não foram capazes de assegurar um balanço positivo em carbono através do processo fotossintético, sugerindo que a suplementação do meio de cultura com sacarose é condição *sine qua non* para garantir a viabilidade do metabolismo basal celular.

Por fim, durante a terceira etapa, que estende-se dos 30 aos 60 dias de cultivo, quando observou-se um crescimento intenso das plântulas, a hidrólise da sacarose foi inferior aos períodos anteriores. Isso, provavelmente, ocorreu devido à intensificação da atividade fotossintética dos explantes, uma vez que neste estágio as plântulas já apresentavam folhas completamente formadas (DESJARDINS, 1995) e, portanto, apresentaram quantidade de reservas nutritivas suficientes para o metabolismo.

Neste período, o aumento da intensidade luminosa também influenciou a hidrólise da sacarose dos meios de cultura suplementados com 43,82 e 131,46 mM de sacarose. Os dados obtidos em ambos os tratamentos demonstraram uma tendência de que toda α -D-glucose tenha sido consumida antes do término deste período (Figuras 16 e 18). Em função disto, infere-se que as plântulas de *Agapanthus* utilizam a sacarose do meio de cultura na forma de hexoses para

assegurar o desenvolvimento *in vitro*, ou seja, esta fonte de carbono é assimilada e metabolizada para a produção de massa vegetal, ou estocada.

4 CONCLUSÃO

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$) das soluções de meio de cultura líquido do sistema de imersão temporária, onde foram multiplicadas plântulas de *Agapanthus*, revelaram a presença de um dos seus produtos de hidrólise ($\alpha\text{-D -Glucose}$) em todos os períodos amostrais, sugerindo a existência de um sistema enzimático extracelular (invertase).

Plântulas de *Agapanthus* apresentaram três etapas distintas na assimilação de fonte de carbono exógena para atender as fases de crescimento *in vitro*, onde a maior demanda da fonte de carbono do meio de cultura ocorreu na segunda etapa devido ao intenso metabolismo decorrente do processo de morfogênese para a formação de novas brotações.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, P. S. **Engenharia do Metabolismo em Cultura de Células de *Mandevilla velutina* (Mart) WOODSON (*Apocynaceae*)**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001. 83p.

ARAUJO, P. S.; MARASCHIN, M.; MARASCHIN, R. P.; VERPOORTE, R.; CARO M.S.B. Kinetic of the carbohydrate metabolism in *Mandevilla velutina* cell cultures by ¹H-NMR. **Ann. Magn. Reson.**, n. 2 - 3, p. 102 - 109, 2002.

ARSEGO, J. L.; et al.; Detecção de carboidratos em extrato aquoso de células de Canela Sassafrás (*Ocotea odorifera*) por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H-RMN). In: IX Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2003, São Paulo: Atibaia – **Resumo...** Brazilian Society of Plant Physiology, p. 38, 2003.

BURSTROM, H. Root surface development, sucrose inversion and free space. **Physiology Plantarum**, v. 10, p. 741 - 751, 1957.

BÜTTER, B.; PESCIPELLI, S. M.; BERGER, K.; SCHIMID, J. E. & SKAMP, P. Autoclaved and filter sterilized liquid media in maize anther culture: significance of activated charcoal. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 79 - 82, 1993.

CAPELLADES, M.; LEMEUR, R & DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in Rosa cultured in vitro. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, v. 25, p. 21 - 26, 1991.

DENG, R. & DONNELLY, D. J. In vitro hardening of red raspbeberry by CO₂ enrichment and reduced medium sucrose concentration. **Hortiscience**, v. 28, p. 1048 - 1051, 1993.

DESJARDINS, Y. Factors affecting CO₂ fixation in striving to optimize photoautotrophy in micropropagated plantlets. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v. 1, n. 1, p. 13 - 25, 1995.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, v. 69, p. 215 - 231, 2002.

FIGUEIRA, A. & JANICK, J. Optimizing carbon dioxide and light levels during *in vitro* culture of *Treobroma cacao*. **Journal American Society Horticulturae Science**, v. 119, p. 865 - 871, 1994.

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

GEORGE, E. F. & SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture, handbook and directory of comercial laboratories**. Eversley, Exergetics, 1984. 704p.

GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. In Praticce.2 ed. England: Exergetics, 1996. 1361p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: Torres *et al.* **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA, Brasília – DF, v. 1, p. 183 - 260, 1998.

HUBER, S. C.; AKAZAWA, T. A novel sucrose synthase pathway for sucrose degradation in cultured sycamore cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 81, p. 1008 - 1013, 1986.

KING, P. J. & STREET, H. E. Growth patterns in cell cultures. In: STREET, H. E. (ed.) (q.v), 1977.

LANGFORD, P. F. & WAINWRIGHT, H. Effect of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. **Annals of Botany**, v. 60, p. 633 - 640, 1987.

MARASCHIN, M. **Variação somaclonal, metabolismo do carbono e caracterização bioquímica e imunológica nos cultivos celulares de *Mandevilla velutina* (Mart) Woodson (*Apocynacea*)**. Tese (Doutorado em Ciências), UFPR, Curitiba, 1998. 193p.

MARASCHIN, M.; et al., Isolation and *trans*-resveratrol analysis in brazilian red wine by ¹H-Nuclear Magnetic Resonance, **Magnetic Resonance in Food Science**, Cambridge, n. 262, p. 136 - 139, 2004.

MARASCHIN, R. P.; et al., Solid-phase extration and ¹H-NMR analysis of brazilian cabernet sauvignon wines – a chemical composition correlation study, **Magnetic Resonance in Food Science**, Cambridge, n. 286, p. 255 - 260, 2004.

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

MURASHIGE, T.; & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473 - 497, 1962.

OLTRAMARI, A. C. **Engenharia do Metabolismo de Células de Canela Sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer): Análise da Produção de Biomassa Celular e da Síntese de Safrol**, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002. 110p.

PAIVA NETO, V. B. & OTONI, W. C. carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Scientia Horticulturae**, Elsevier Science B. V., v. 97, p. 193 - 202, 2003.

PEIXOTO, P. H. P. & PASQUAL, M. Influência da autoclavagem e filtração da sacarose na multiplicação *in vitro* de videira. **Revista Ceres**, v. 42, n. 244, p. 599 - 604, 1995.

ROBERTS, J. K. M. & JARDETZKY, O. Monitoring of cellular metabolism by NMR. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 639, p. 53 - 76, 1981.

ROBERTS, J. K. M.. Study of plant metabolism in vivo using NMR spectroscopy. **Annual Reviews Plant Physiology**, v. 35, p. 375 - 386, 1984.

SCHEIDER, B. In vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy of low-molecular-weight compounds in plant cells. **Planta**. Springer- Verlag, v. 203, p. 1 - 8, 1997.

SCHRIPSEMA, J. **Factor involved in the alkaloid production of *Tabernaemontana divaricata* plant cell suspension cultures**. Ph.D. Thesis, Leiden University. 1991. 160p.

SCHRIPSEMA, J.; LOOMAN, A. P.; ERKELENS, C.; VERPOORTE, R. Nitrogen metabolism in cultures of *Tabernaemontana divaricata*. **Phytochemistry**, Great Britain, v. 30, n. 12, p. 3951 - 3954, 1991.

TICHÁ, I.; CÁP, F.; PASCOVSKÁ, D.; HOFMAN, P.; HAISEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SHAFER, C. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown in vitro. **Physiologia Plantarum**, v. 102, p. 155 - 162, 1998.

VU, J. C. V.; NIEDZ, R. P.; YELENOSKY, G. Activities of sucrose metabolism enzymes in glycerol-grown suspension cultures of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Environmental and Experimental Botany**. Oxford, v. 35, n. 4, p. 455 - 463, 1995.

YOSHIDA, F.; KOBAYASHIT, T.; YOISHIDA, T. The mineral nutrition of cultured chlorophyllous cells of tobacco. Effectesof π salts, π sucrose, Ca, Cl and B in the medium on the yield, friability, chorophyll contents and mineral absorption of cells. **Plant Cell Physiology**, v. 14, p. 329 - 339, 1973.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

No Brasil a floricultura é ainda pouco expressiva. Porém, nos últimos anos este setor vem se expandido e apresentando um grande potencial. As perspectivas são de que aumente o apoio financeiro do poder público para a produção de flores e plantas ornamentais. Neste sentido, aumentará também o apoio para pesquisas que objetivem ampliar os conhecimentos e aplicar novas técnicas de propagação para uma melhor qualidade e competitividade do produto. Uma técnica que vem ganhando um espaço bastante significativo entre os produtores de flores e plantas ornamentais é a cultura *in vitro*, apesar de ainda ser onerosa. No entanto, vários pesquisadores vêm estudando novos sistemas de micropropagação, como biorreatores de imersão temporária, com o objetivo de diminuir os custos de produção e colocar no mercado um produto competitivo.

Poucos trabalhos referentes à produção de mudas para a espécie *Agapanthus umbellatus* var. minor foram encontrados na literatura consultada. As informações sobre o cultivo dessa espécie limitaram-se ao contato com produtores, os quais passaram seu conhecimento verbalmente. Neste sentido, os resultados obtidos no presente trabalho são importantes contribuições para esta espécie, pois além de fornecer suporte científico ao conhecimento informal existente entre os produtores, abrem novas perspectivas para a utilização da cultura *in vitro* para essa e outras espécies de valor ornamental.

Os resultados obtidos no presente estudo sobre a utilização dos sistemas de multiplicação em meio geleificado e em biorreator de imersão temporária foram positivos. Ambos os sistemas aumentaram o número de brotações desta espécie superando os valores obtidos pelos viveiristas no processo de divisão de touceiras. Estes sistemas também demonstraram ser eficientes durante a fase de aclimatização das plântulas, uma das fases mais críticas do processo de micropropagação. No entanto, novos estudos deverão ser conduzidos no sentido de avaliar o volume ótimo de meio líquido para a proliferação de brotações desta espécie. Além disto, o tempo que o explante deve permanecer em contato com o meio de cultura é outro fator que influencia no desempenho do material vegetal em biorreator de imersão temporária e por isto deve ser estudado. Estudos

complementares para estabelecer estes parâmetros poderiam ser conduzidos com base nos resultados obtidos neste trabalho.

Os resultados dos estudos morfo-fisiológicos de plântulas de *Agapanthus* multiplicadas nos dois sistemas de micropropagação revelaram que as plântulas responderam de acordo com as modificações do ambiente. Para o sistema em meio geleificado, estudos complementares poderiam ser realizados a fim de avaliar o comportamento de plântulas de *Agapanthus* quando submetidas a uma concentração mais elevada de sacarose no meio de cultura. Além disto, novos trabalhos devem ser conduzidos no sentido de conhecer a composição gasosa que o biorreator de imersão temporária possibilita às plântulas, pois com a circulação do ar, ela é modificada várias vezes durante um dia. Os resultados sugerem também que sejam conduzidos estudos no sentido de estabelecer qual a melhor concentração de sacarose no meio de cultura para preparar fisiologicamente as plântulas para a fase de aclimatização.

Os resultados do estudo de consumo de sacarose pelas plântulas durante a fase de multiplicação revelaram que plântulas de *Agapanthus* apresentaram três etapas distintas na assimilação de fonte de carbono exógena para atender diferentes fases de crescimento *in vitro*. As diferentes concentrações de sacarose e intensidades luminosas afetaram na assimilação de açúcar. No entanto, novos estudos poderiam ser conduzidos para avaliar se ocorre alteração do pH do meio de cultura e se esta alteração poderá influenciar na assimilação desta fonte de carbono.