

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – *CAMPUS* RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA
FOTOSINTÉTICA *IN VITRO* DE PLANTAS DO
CERRADO**

Autor: Márcio Rosa
Orientador: Prof. Dr. Alan Carlos Costa

Rio Verde - GO
agosto – 2011

METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSINTÉTICA *IN VITRO* DE PLANTAS DO CERRADO

Autor: Márcio Rosa

Orientador: Prof. Dr. Alan Carlos Costa

Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – *Campus* Rio Verde – Área de concentração Ciências Agrárias.

Rio Verde – GO
agosto – 2011

R71m

Rosa, Márcio.

Metodologia para avaliação da eficiência fotossintética *in vitro* de plantas do cerrado/ Márcio Rosa – Rio Verde-GO – 2011.

101 f.: il.;

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – IFGoiano, *Campus* Rio Verde – 2011.

1. Fotossíntese *in vitro* 2. *Hyptis marrubioides* Epling
3. *Hancornia speciosa* Gomes

Dr. Alan Carlos Costa (Orient.)

Gilmar José Terra. CRB1 2524

CDU 581.132

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – *CAMPUS* RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA
FOTOSSINTÉTICA *IN VITRO* DE PLANTAS DO
CERRADO**

Autor: Márcio Rosa

Orientador: Prof. Dr. Alan Carlos Costa

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias – Área de concentração
Ciências Agrárias – Ciências Agrárias

APROVADA em 10 de agosto de 2011.

Prof. Dr. Ricardo Motta Miranda
Avaliador externo
UFRRJ

Prof. Dr. Francisco de Almeida Lobo
Avaliador externo
UFMT

Dr^a. Flávia Dionísio Pereira
Avaliadora interna
IFGoiano/RV

Prof. Dr. Alan Carlos Costa
Presidente da banca
IFGoiano/RV

A Deus, detentor de todo saber,
ao grande casal Francisco e Sebastiana (*in memoriam*),
aos tios, José Domingos e Isabel, Pais de coração.

DEDICO

Aos meus irmãos Marco Antônio (Marquim), Marilza, Leidimara, Rafayane,
e aos meus pais Maria e Geraldo,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Aos familiares, especialmente meus pais Geraldo e Maria, aos tios José Domingos e Isabel, meus irmãos, cunhados e aos meus sobrinhos Karen e Henrique, pelo apoio e carinho em mais esta etapa da minha trajetória.

Ao meu orientador Professor Alan Carlos Costa, pela oportunidade, paciência e pelo exemplo de dinamismo e dedicação.

À minha coorientadora Professora Clarice Aparecida Megguer, pela serenidade e pela forma decisiva com a qual atuou para a realização deste trabalho.

Ao Professor Fabiano Guimarães Silva, pela coorientação e pela disponibilização da estrutura do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais.

À Professora Flávia Dionísio Pereira, pelos ensinamentos da técnica de cultivo *in vitro*, pelas sugestões e contribuições para a instalação dos experimentos e para a finalização deste trabalho.

Ao Instituto Federal Goiano, *Campus* Rio Verde e ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, por proporcionarem ensino gratuito e de qualidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À Dr^a Marialva Alvarenga Moreira, que sempre esteve disposta a me ajudar, meu muito obrigado.

À Professora Michellia Pereira Soares, pela atenção e amizade.

Aos demais professores e servidores do programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias.

Ao Clenilso Sehnen Mota, doutorando do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, pelo auxílio nos dados de fluorescência da clorofila *a*.

Ao Prof. Francisco de Almeida Lobo, pelas valiosas contribuições, principalmente aquelas relacionadas ao entendimento do intercâmbio gasoso.

Ao Prof. Ricardo Motta Miranda, pelas críticas e sugestões que em muito contribuíram para a melhoria deste trabalho.

A equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos, Paula, Paulo Dorneles, Juliana Cabral, Layara, Jackellyne, Yasmin, Aurélio, Ísis, Cíntia, Laiany e Lorena, pela amizade e colaboração.

Aos amigos e colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, pelas experiências, esperanças e apoio compartilhados, especialmente a Sueisla, Fátima, Karen, Luciana Vitorino, Mariluz e Gilberto.

Aos amigos do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal, Adinan, Deucimar, Fábila, Gabriela, Jônatas, Leidyane, Luciana Minervina, Marta, Priscila e Rodolfo, pela convivência sempre agradável.

Aos amigos Carmen Bonini, Elaine, Marcondes, Renata, Alex, Maíra, Eliene, Claudemir, Lucimar, Rafael, Vanda, Karla, Vinícius, Ana Carolina, Tiago, Rodrigo, Aildo e Helemi, pelo apoio dado para que eu ingressasse neste curso.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“O SENHOR É O MEU PASTOR, NADA ME FALTARÁ...”

Salmo 23

BIOGRAFIA DO AUTOR

MÁRCIO ROSA, filho de Geraldo Francisco Rosa e Maria do Socorro dos Santos, nasceu no dia 15 de junho de 1980, na cidade de Rio Verde, Goiás.

Em dezembro de 1998, concluiu o curso Técnico em Agropecuária pela antiga Escola Agrotécnica Federal de Rio Verde - GO.

Em julho de 2000, ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade de Rio Verde (Fesurv), graduando-se em agosto de 2004.

Em julho de 2009, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, no Instituto Federal Goiano – *Campus* de Rio Verde, sob a orientação do Professor Alan Carlos Costa.

ÍNDICE

| | PÁGINA |
|---|--------|
| ÍNDICE DE TABELAS..... | xii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xiii |
| LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS | xv |
| RESUMO..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 3 |
| INTRODUÇÃO..... | 5 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 8 |
| | |
| CAPÍTULO I - EFEITO DA IRRADIÂNCIA, DA TAXA DE FLUXO E DA UMIDADE DO AR NA DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA <i>IN VITRO</i> EM PLÂNTULAS DO CERRADO..... | 11 |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| | |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 2.1. <i>Material vegetal</i> | 15 |
| a) <i>Condições de crescimento</i> | 16 |
| 2.2. <i>Descrição e ajuste do aparelho para a avaliação das trocas gasosas</i> | 16 |
| 2.3. <i>Curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz (curva A/I)</i> | 20 |
| 2.5. <i>Ajuste das condições de umidade relativa do ar de referência</i> | 23 |
| 2.6. <i>Ajuste das equações para cálculo das características das trocas gasosas nas plântulas in vitro.</i> | 24 |
| a) <i>Taxa de assimilação de CO₂ (A):</i> | 24 |
| b) <i>Taxa transpiratória (E):</i> | 25 |
| 2.7. <i>Avaliação da fluorescência da clorofila a</i> | 26 |
| 2.8. <i>Protocolo para extração de pigmentos cloroplastídicos</i> | 28 |
| | |
| 3. RESULTADOS | 29 |
| 3.1. <i>Curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz (curva A/I)</i> | 29 |
| 3.2. <i>Curvas de resposta das trocas gasosas à taxa de fluxo do ar através do tubo de ensaio</i> | 31 |
| 3.3. <i>Ajuste das condições da umidade relativa do ar de referência</i> | 36 |
| 3.4. <i>Avaliações de fluorescência</i> | 41 |
| 3.5. <i>Protocolo de extração de pigmentos cloroplastídicos</i> | 44 |
| 3.5.1. <i>Hortelã-do-campo</i> | 44 |
| 3.5.2. <i>Mangaba</i> | 48 |
| | |
| 4. DISCUSSÃO | 52 |

| | |
|---|-----|
| 5. CONCLUSÕES | 58 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |
| CAPÍTULO II - ESTUDO DAS VARIAÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS FOTOSINTÉTICAS DE PLÂNTULAS DE MANGABA CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> SUBMETIDAS A DIFERENTES NÍVEIS DE IRRADIÂNCIAS | |
| 1. INTRODUÇÃO | 69 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 71 |
| 2.1. <i>Material vegetal</i> | 71 |
| 2.2. <i>Condições de crescimento</i> | 71 |
| 2.3. <i>Avaliação da taxa fotossintética</i> | 72 |
| 2.4. <i>Avaliação da fluorescência da clorofila a</i> | 73 |
| 2.5. <i>Avaliação de pigmentos cloroplastídicos</i> | 74 |
| 2.6. <i>Características do crescimento</i> | 74 |
| 2.7. <i>Delineamento experimental</i> | 75 |
| 3. RESULTADOS | 75 |
| 3.1. <i>Taxa fotossintética</i> | 75 |
| 3.2. <i>Fluorescência da clorofila a</i> | 76 |
| 3.3. <i>Conteúdo de pigmentos cloroplastídicos</i> | 79 |
| 3.4. <i>Características do crescimento</i> | 81 |
| 4. DISCUSSÃO | 85 |
| 5. CONCLUSÕES | 92 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 93 |
| CONCLUSÃO GERAL | 101 |

ÍNDICE DE TABELAS

PÁGINA

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Resumo da Análise de Variância dos dados de extração de pigmentos cloroplastídicos de plântulas de hortelã-do-campo, com 50 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em que Cla (clorofila <i>a</i>), Clb (clorofila <i>b</i>), Car (carotenoides), Cla/Clb (razão entre clorofila <i>a</i> e clorofila <i>b</i>), e IF (índice de feofitinação)..... | 43 |
| Tabela 2 – Resumo da Análise de Variância dos dados de extração de pigmentos cloroplastídicos de plântulas de mangaba, com 50 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em que Cla (clorofila <i>a</i>), Clb (clorofila <i>b</i>), Car (carotenoides), Cla/Clb (razão entre clorofila <i>a</i> e clorofila <i>b</i>), e IF (índice de feofitinação)..... | 48 |

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

PÁGINA

Figura 1. Câmara de medição (A) e fonte de luz originais do Qubit Systems (B). Adaptação do tubo de ensaio como câmara de medição (C), e da fonte de luz para as condições *in vitro* (D). Cuba em poliestireno para evitar aquecimento pelo calor liberado pela fonte de luz (E)..... 18

Figura 2. Esquema da adaptação da câmara foliar para medições de trocas gasosas para as condições *in vitro*. (A). Entrada do ar de referência; (B). Tubo de ensaio contendo plântula; (C). Saída do ar de análise; (D) Tubo de ensaio com plântula; (D). Compartimento de isopor revestido internamente com papel alumínio; (E). Cuba em poliestireno contendo água para isolamento térmico..... 19

Figura 3. Esquema da adaptação do conjunto analisador de trocas gasosas para as condições *in vitro*. (1). Bolsa de ar; (2). Bomba de fluxo; (3). Monitor de taxa de fluxo de ar (G 265); (4). Tubo de ensaio com plântula; (5). Cuba com água; (6). Compartimento de isopor revestido com papel alumínio; (7). Fonte de luz; (8). Sensor de temperatura e umidade (S 161); (9). Tubo com dryrite (dessecante); (10). IRGA (S 151); (11). Interface (Lab Pro)..... 19

Figura 4. Detalhes do sistema adaptado em procedimento de medição. (A). Bolsa de ar; (B). Bomba de fluxo; (C). Monitor de fluxo de ar (G 265); (D). Tubo de ensaio com plântula envolto em compartimento de isopor revestido com papel alumínio; (E). Sensor de temperatura e umidade (S 161); (F). Tubo com dryrite; (G). IRGA (S 151); (H). Fonte de luz; (I). Interface (Lab Pro)..... 20

Figura 5. Esquema de umedecimento do ar de referência: O ar coletado de um cilindro com mistura padrão de CO₂/N₂ é armazenado numa sacola (A), que posteriormente é bombeado (B) por mangueiras diretamente em água destilada num tubo de ensaio vedado (C). O ar umedecido é impulsionado até uma mangueira posicionada na tampa do tubo e direcionado para o preenchimento de outra sacola de coleta de ar (D). 23

Figura 6. Detalhes do processo de umedecimento do ar..... 24

Figura 7. Câmara úmida utilizada para adaptação das plântulas durante os períodos de medição dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, no claro. 27

- Figura 8. Detalhe de procedimento de medição dos parâmetros de claro da fluorescência da clorofila *a* (curva de fluorescência) em folha de plântula de hortelã-do-campo..... 27
- Figura 9. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*) de plântulas de hortelã-do-campo cultivadas *in vitro*, em função do aumento da densidade de fluxo de fótons e calculada em função da área foliar (*A*), da matéria seca da folha (*B*) e da matéria seca da parte aérea (*C*). Os dados são médias de *n*=8. 30
- Figura 10. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*) de plântulas de mangaba, cultivadas *in vitro*, em função do aumento da densidade de fluxo de fótons e calculada em função da área foliar (*A*), da matéria seca da folha (*B*) e da matéria seca da parte aérea (*C*). Os dados são médias de *n*=10. 31
- Figura 11. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A* - μmol m⁻² s⁻¹) de plântulas de hortelã-do-campo, cultivadas *in vitro*, em função do aumento da taxa do fluxo de ar e calculada em função da área foliar (*A*), da matéria seca da folha (*B*) e da matéria seca da parte aérea (*C*). (*n*=4). 33
- Figura 12. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A* - μmol m⁻² s⁻¹) de plântulas de mangaba, cultivadas *in vitro*, em função do aumento da taxa do fluxo de ar e calculada em função da área foliar (*A*), da matéria seca da folha (*B*) e da matéria seca da parte aérea (*C*). (*n*=4). 34
- Figura 13. Taxa transpiratória (*E*) de plântulas de hortelã-do-campo, cultivadas *in vitro*, em função do aumento da taxa do fluxo de ar e calculada em função da área foliar (*A*), da matéria seca da folha (*B*) e da matéria seca da parte aérea (*C*). O comportamento dos dados é explicado por um modelo linear. Significância: **p*<0,05; ***p*<0,01. 35
- Figura 14. Taxa transpiratória (*E*) de plântulas de mangaba, cultivadas *in vitro*, em função do aumento da taxa do fluxo de ar e calculada em função da área foliar (*A*), da matéria seca da folha (*B*) e da matéria seca da parte aérea (*C*). O comportamento dos dados é explicado por um modelo linear. Significância: **p*<0,05; ***p*<0,01. 36
- Figura 15. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A* - μmol m⁻²s⁻¹) de plântulas de hortelã-do-campo, cultivadas *in vitro*, em função da umidade relativa do ar de medição e calculada em função da área foliar (*A*), da matéria seca da folha (*B*) e da matéria seca da parte aérea (*C*). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Os dados são médias de *n*=10. 37
- Figura 16. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A* - μmol m⁻²s⁻¹) de plântulas de mangaba, cultivadas *in vitro*, em função da umidade relativa do ar de medição e calculada em função da área foliar (*A*), da matéria seca da folha (*B*) e da matéria seca da parte aérea (*C*). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Os dados são médias de *n*=10. 38
- Figura 17. Taxa transpiratória (*E*) de plântulas de hortelã-do-campo, cultivadas *in vitro*, em função da umidade relativa do ar de medição e calculada em função da área foliar (*A*), da matéria seca da folha (*B*) e da matéria seca da parte aérea (*C*). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Os dados são médias de *n*=10. 39

- Figura 18. Taxa transpiratória (E) de plântulas de mangaba, cultivadas *in vitro*, em função da umidade relativa do ar de medição e calculada em função da área foliar (A), da matéria seca da folha (B) e da matéria seca da parte aérea (C). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n=10$ 40
- Figura 19. Rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) de plântulas de hortelã-do-campo e de mangaba, cultivadas *in vitro*. Os dados são médias e desvio padrão ($n=10$). 41
- Figura 20. Taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) [A] e rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$) [B] de plântulas de hortelã-do-campo, cultivadas *in vitro*, em função do aumento da densidade de fluxo de fótons. Em todas as figuras o comportamento dos dados é explicado por um modelo raiz quadrada ($n=8$). Significância: $**p<0,01$ 42
- Figura 21. Taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) [A] e rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$) [B] de plântulas de mangaba, cultivadas *in vitro*, em função do aumento da densidade de fluxo de fótons. Em todas as figuras o comportamento dos dados é explicado por um modelo raiz quadrada ($n=10$). Significância: $**p<0,01$ 43
- Figura 22. Conteúdo de clorofila a (A), clorofila b (B) e carotenoides de plantas de hortelã-do-campo cultivadas *in vitro* extraído em duas diferentes temperaturas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n=45$ 45
- Figura 23. Conteúdo de clorofila total (A), razão entre o conteúdo de clorofila a e clorofila b (Cl_a/Cl_b) (B) de plântulas de hortelã-do-campo cultivadas *in vitro* extraído em duas diferentes temperaturas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n=45$ 46
- Figura 24. Conteúdo de clorofila b (A), razão entre o conteúdo de clorofila a e clorofila b (Cl_a/Cl_b) (B) de plântulas de hortelã-do-campo cultivadas *in vitro* extraídos em diferentes tempos de incubação. O comportamento dos dados é explicado por um modelo raiz quadrada. Os dados são médias de $n=18$. Significância: $**p<0,01$ 47
- Figura 25. Índice de feofitinação (IF) de clorofilas de plântulas de hortelã-do-campo, cultivadas *in vitro*, e extraídas em duas temperaturas e em diferentes tempos de incubação. Em A e B o comportamento dos dados é explicado por um modelo raiz quadrada para a temperatura de 25 °C, e por um modelo linear para a temperatura de 65 °C. Os dados são médias de $n=9$. Significância: $**p<0,01$ 48
- Figura 26. Conteúdo de clorofila b (A) e razão cl_a/cl_b (B) de plantas de mangaba cultivadas *in vitro* extraído em duas diferentes temperaturas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n=60$ 50
- Figura 27. Razão entre o conteúdo de clorofila a e clorofila b em diferentes tempos de incubação (Cl_a/Cl_b) [A] e índice de feofitinação (IF) de clorofilas em duas temperaturas e em diferentes tempos de incubação [B], extraídas de plântulas de

mangaba, cultivadas *in vitro*. O comportamento dos dados de razão Cl_a/Cl_b é explicado por um modelo linear ($n=24$). O comportamento dos dados de IF é explicado por um modelo linear na temperatura de 25°C , e por um modelo quadrático para a temperatura de 65°C ($n=12$). Significância: $*p<0,05$; $**p<0,01$ 51

CAPÍTULO II

Figura 1. Estrutura utilizada para a imposição dos diferentes níveis de irradiância. Cada prateleira representa um ambiente espectral, $12\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (A); $25\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (B); $50\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (C); $100\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (D) e $150\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (E)..... 72

Figura 2. Taxa de assimilação líquida de CO_2 ($A - \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) de plântulas de mangaba, cultivadas *in vitro*, em função de diferentes níveis de irradiância. Os dados são explicados por um modelo raiz quadrada ($n=7$). Significância: $*p<0,05$ 76

Figura 3. Rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) em função dos níveis de irradiância. Os dados foram ajustados conforme modelo linear de regressão ($n=8$). Significância: $**p<0,01$ 77

Figura 4. Rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$) (A), taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) (B), coeficiente de extinção fotoquímica (qP) (C) e coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) (D), em função de diferentes níveis de densidade de fluxo de fótons..... 78

Figura 5. Conteúdo de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) e de carotenoides (C) de plantas de mangaba cultivadas *in vitro* em função dos diferentes níveis de irradiância de crescimento. ($n=5$). Significância: $**p<0,01$ 79

Figura 6. Conteúdo de clorofila total (A), razão clorofila *a/b* (B), razão carotenoides/clorofilas (C) de plantas de mangaba cultivadas *in vitro* em função dos diferentes níveis de irradiância de crescimento. Em todas as características foram ajustados modelos lineares de regressão ($n=5$). Significância: $**p<0,01$ 80

Figura 7. Índice de feofitinação (IF) de plantas de mangaba cultivadas *in vitro* em função dos diferentes níveis de irradiância de crescimento. Os dados foram ajustados conforme modelo linear de regressão ($n=5$). Significância: $**p<0,01$ 81

Figura 8. Número de folhas (A), área foliar (B) e área foliar específica (AFE) (C) de plântulas de mangaba cultivadas *in vitro* em função dos diferentes níveis de irradiância de crescimento, ($n=10$). Significância: $*p<0,05$; $**p<0,01$ 83

Figura 9. Comprimento de plântulas (A), e massa seca da parte aérea (MSPA) [B], de plântulas de mangaba cultivadas *in vitro* em função dos diferentes níveis de irradiância de crescimento. ($n=10$). Significância: $*p<0,05$; $**p<0,01$ 84

Figura 10. Plântulas de mangaba de 50 dias de cultivo, cultivadas *in vitro*, após 35 dias de exposição a diferentes níveis de irradiância, $12\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (A), $25\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (B), $50\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (C), $100\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (D) e $150\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (E). Barra = 10 mm..... 85

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| $\Delta F/F_m'$ | Rendimento quântico efetivo |
| A | Taxa fotossintética líquida ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}/\mu\text{mol g MS}^{-1} \text{s}^{-1}$) |
| AF | Área foliar (cm^2) |
| AFE | Área foliar específica ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) |
| ANA | Ácido naftaleno acético |
| CaCO_3 | Carbonato de cálcio |
| Car | Carotenoides ($\mu\text{g cm}^{-2}$) |
| Cl a | Clorofila a ($\mu\text{g cm}^{-2}$) |
| Cl b | Clorofila b ($\mu\text{g cm}^{-2}$) |
| Cl t | Clorofilas totais ($\mu\text{g cm}^{-2}$) |
| DFD | Densidade de Fluxo de Fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| E | Taxa Transpiratória ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}/\text{mmol g MS}^{-1} \text{s}^{-1}$) |
| e_s | Tensão de vapor d'água (kPa) |
| ETR | Taxa relativa de transporte de elétrons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) |
| F_m | Fluorescência máxima |
| F_o | Fluorescência mínima |
| FS I | Fotossistema I |
| FS II | Fotossistema II |
| F_v | Fluorescência variável |
| F_v/F_m | Rendimento Quântico Máximo do Fotossistema II |
| IF | Índice de feofitinação |
| IRGA | Analisador de Gases no Infravermelho |
| MS (Meio) | Meio de cultivo Murashige e Skoog |
| MS | Massa seca (g) |
| MSPA | Massa seca da parte aérea (mg) |
| NPQ | Coefficiente de extinção não fotoquímica |
| PSL | Ponto de saturação luminoso ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) |
| qP | Coefficiente de extinção fotoquímica |
| UR | Umidade Relativa (%) |
| WPM | Woody Plant Medium |

RESUMO

ROSA, Márcio, M.Sc., Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde – GO, agosto de 2011. **Metodologia para avaliação da eficiência fotossintética *in vitro* de plantas do Cerrado.** Orientador: Dr. Alan Carlos Costa. Coorientadores: Clarice Aparecida Megguer e Fabiano Guimarães Silva

A avaliação da eficiência fotossintética de plântulas *in vitro* pode proporcionar subsídios para o manejo das condições de crescimento e assim aumentar a capacidade de sucesso na etapa de aclimatização. Objetivou-se com este estudo adaptar metodologias tradicionais utilizadas para a avaliação da eficiência fotossintética de plantas para serem utilizadas na avaliação de plântulas *in vitro*, e estudar as respostas de assimilação de CO₂ sob diferentes níveis de irradiância. O ajuste da metodologia para avaliação das trocas gasosas em plântulas de hortelã-do-campo (*Hyptis marrubioides* Epling) e mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) cultivadas *in vitro*, fundamentou-se em curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz (curva A/I); curvas de resposta de trocas gasosas à taxa de fluxo do ar através do tubo de ensaio; ajuste das condições de umidade relativa do ar de entrada (ar de referência) no tubo e das equações para cálculo das trocas gasosas em plântulas *in vitro*. O ajuste foi complementado por meio da avaliação da fluorescência da clorofila *a* e da elaboração de protocolo para determinação do conteúdo de pigmentos cloroplastídicos para as plântulas deste estudo. A caracterização do efeito da irradiância nos processos fotossintéticos sobre plântulas de mangaba cultivada *in vitro* foi realizada em cinco condições de irradiância: 12, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram avaliadas a taxa de assimilação de CO₂ (*A*), os

parâmetros da fluorescência da clorofila, o conteúdo de pigmentos cloroplastídicos e alguns parâmetros do crescimento. O conjunto analisador de gases no infravermelho adotado neste estudo foi sensível às respostas de assimilação de CO₂ em plântulas de hortelã-do-campo e de mangaba cultivadas *in vitro* possibilitando avaliar de maneira coerente juntamente com as avaliações de fluorescência, pigmentos cloroplastídicos e de crescimento, as respostas ecofisiológicas de plântulas de mangaba crescidas *in vitro* sob diferentes níveis de irradiâncias. Os resultados obtidos neste estudo comprovam que as plântulas de hortelã-do-campo e de mangaba cultivadas *in vitro*, possuem aparato fotossintético funcional, e, além disso, respondem às variações das condições de medição, exibindo valores consideráveis de taxa de assimilação de CO₂ sob condições de irradiância de saturação.

Palavras-chave: fotossíntese *in vitro*, *Hyptis marruboides* Epling, *Hancornia speciosa* Gomes.

ABSTRACT

ROSA, Márcio, M.Sc., Instituto Federal Goiano - *Campus* Rio Verde - GO, August - 2011. **Methodology for assessment of photosynthetic efficiency *in vitro* of Cerrado plants.** Advisor: Dr. Alan Carlos Costa. Co-advisors: Clarice Aparecida Megguer and Fabiano Guimarães Silva.

Evaluation of photosynthetic efficiency of *in vitro* plantlets can provide subsidies for the management of growing conditions also increasing the ability to succeed in the stage of acclimatization. The objective of this study was to adapt traditional methods used to assess the photosynthetic efficiency of plants to use in the evaluation of *in vitro* plantlets, and study the responses of CO₂ assimilation under different irradiance levels. The adjustment methodology for evaluation of gas exchange in seedlings of hortelã-do-campo (*Hyptis marruboides* Epling) and mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) *in vitro* was based on response curves of net photosynthesis in the light (curve A / D); response curves of the gas exchange rate of air flow through the test tube, adjusting the relative humidity conditions of inlet air (reference air) in the tube and the equations for calculation of gas exchange in seedlings *in vitro*. The setting was complemented by evaluating the fluorescence of chlorophyll *a* and developing a protocol for determining the content of pigments seedlings for this study. The characterization of the effects of irradiance on photosynthetic processes in mangaba seedlings grown *in vitro* was performed in five irradiance conditions: 12, 25, 50, 100 and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. It was evaluated the rate of CO₂ assimilation (*A*), the parameters of chlorophyll fluorescence,

pigment content and some parameters of growth. All infrared gas analyzer used in this study was sensitive to the responses of CO₂ assimilation in seedlings of hortelã-do-campo and mangaba turning possible to evaluate *in vitro* in a manner consistent with the assessments of fluorescence pigments and growth ecophysiological responses of seedlings of mangaba grown *in vitro* under different levels of irradiance. The results of this study show that the seedlings of the hortelã-do-campo and mangaba cultured *in vitro*, have functional photosynthetic apparatus, and also respond to the changing conditions of measurement, showing considerable amounts of CO₂ assimilation rate in saturation irradiance conditions.

Keywords: photosynthesis *in vitro*, *Hyptis marrubioides* Epling, *Hancornia speciosa* Gomes.

INTRODUÇÃO

A melhoria do desempenho fotossintético de culturas *in vitro* é fundamental para assegurar uma alta taxa de sobrevivência das plântulas quando transplantadas para as condições *ex vitro*. No ambiente *in vitro* as culturas se desenvolvem na presença de grande quantidade de fonte de carbono orgânico, geralmente sacarose, sob baixa densidade de fluxo de fótons (DFP) e alta umidade relativa. Nas condições *in vitro*, cria-se um ambiente que favorece o crescimento heterotrófico ou mixotrófico (GALZY e COMPAN, 1992). Além de que as condições físicas e nutricionais são determinantes nas características das folhas *in vitro*, ou seja, anatomia anormal, pouco desenvolvimento dos grana (WETZTEIN e SOMMER, 1982) e baixa fotossíntese (POSPÍŠILOVÁ et al., 1992).

Os processos bioquímicos podem também ser afetados pela baixa quantidade e atividade da Rubisco (GROUT, 1988), que tem sido relacionada ao alto conteúdo de sacarose no meio, causando a repressão de algumas enzimas fotossintéticas (SHEEN, 1994). Apesar disso, mesmo as plântulas *in vitro* sendo heterotróficas ou fotomixotróficas, elas são capazes de desenvolver um aparato fotossintético funcional a taxas mensuráveis (TICHÁ et al., 1998; AMÂNCIO et al., 1999).

Obter plântulas *in vitro* com habilidade fotossintética é de suma importância, visto que as condições de sala de crescimento onde os fatores ambientais são relativamente controlados constituem apenas a etapa inicial, transitória, do ciclo de vida da planta. Geralmente, na prática, essas plantas completam seu ciclo de vida em condições *ex vitro*, onde as condições ambientais são completamente opostas. A transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, exige que as plantas possuam um

determinado grau de habilidade fisiológica, sendo assim a aclimatização a fase mais crítica da micropropagação (PREECE e SUTTER, 1991; KADLECEK et al., 2001).

A adoção de medidas de cultivo que visem à autotrofia das plantas é uma estratégia que tende a viabilizar a etapa de aclimatização. Entre as medidas mais relevantes está o manejo da densidade de fluxo de fótons para o crescimento dos explantes. Geralmente nos cultivos *in vitro* as irradiâncias são muito baixas e escolhidas empiricamente, sendo em muitos casos dependentes da própria estrutura laboratorial (ORTÍZ, 2004).

Aumentos na irradiância levam a modificações no aparato fotossintético de modo a tolerar essa nova condição de estresse, e ao mesmo tempo manter a eficiência produtiva (MURCHIE e HORTON, 1997; WALTERS et al., 2003). Estas modificações ocorrem principalmente em nível de cloroplastos, caracterizando por uma diminuição da síntese de pigmentos fotossintéticos e alterações na relação clorofila *a/b*, por outro lado, há um maior investimento em componentes para o transporte de elétrons e de assimilação de carbono, decorrentes de elevadas taxas fotossintéticas (ANDERSON et al., 1995; LEE et al., 2007). Apesar da adaptabilidade das plantas à irradiância, aumentos excessivos deste fator podem levar à fotoinibição, uma condição de estresse em que a oferta de luz excede a capacidade de utilização pela fotossíntese e que ocasiona danos principalmente ao fotossistema II (FS II).

A técnica da fluorescência pode fornecer informações importantes sobre o estado do FS II em plântulas *in vitro*, sobre o funcionamento e eficiência com que o FS II utiliza a energia absorvida pelas clorofilas e a extensão dos danos causados pelo excesso de irradiância em combinação a outras condições de cultivo. Diversos estudos utilizaram a fluorescência da clorofila *a* para avaliar o efeito da irradiância, da concentração de sacarose no meio de cultivo e ainda para caracterizar o comportamento autotrófico de plântulas (SERRET et al., 1996; KADLECEK et al., 2003; FUENTES et al., 2005; ZANANDREA et al., 2007). Outros estudos avaliaram o efeito de condições estressantes no rendimento quântico do FS II, como salinidade *in vitro* (TURCHETTO et al., 2005), e hiperhidricidade (FRANCK et al., 2001); na avaliação da infecção viral de plantas *in vitro* (CHRISTOV et al., 2007) e ainda no efeito de químicos no controle de fungos inoculados em plantas *in vitro* (SANTOS et al., 2006).

Basicamente não há um método generalizado para medições do intercâmbio gasoso e da avaliação de fluorescência da clorofila em plantas cultivadas *in vitro*. E a carência de metodologias para avaliações a respeito do desempenho fotossintético se

acentua nesta técnica de cultivo quando se trata de espécies nativas do cerrado. Desta forma, a calibração de um método eficaz na caracterização fotossintética do cultivo *in vitro* pode contribuir com a otimização da interação entre fatores abióticos como nutrientes, irradiância, temperatura, umidade, substrato entre outros; e fatores bióticos como balanço hormonal, material genético, entre outros, que atuam diretamente sobre o estabelecimento, crescimento e desenvolvimento das plântulas.

Com a utilização de uma técnica que permita a mensuração das características do processo fotossintético *in vitro* será possível contribuir para a otimização das condições que favorecem o aumento da capacidade autotrófica. Uma maior eficiência autotrófica pode representar uma redução significativa dos custos excessivos com fontes de carbono e fitorreguladores, e até mesmo reduzir o tempo necessário para a obtenção massiva de material *in vitro* e para a aclimatização das plântulas ao ambiente *ex vitro*.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo ajustar uma metodologia para avaliação da eficiência fotossintética em plantas *in vitro*, por meio da medição da taxa fotossintética, da fluorescência da clorofila *a*, e da determinação do conteúdo de pigmentos cloroplastídicos de plântulas *in vitro* de hortelã-do-campo (*Hyptis marruboides* Epling) e de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMÂNCIO, S.; REBORDÃO, J. P.; CHAVES, M. M. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: photosynthetic competence and carbon allocation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 58, p.31–37, 1999.

ANDERSON, J. M.; CHOWS, W. S.; PARK, Y-I. The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. **Photosynthesis Research**, 46, p.129-139, 1995.

CHRISTOV, I.; STEFANOV, D.; VELINOV, T.; GOLTSEV, V.; GEORGIEVA, K.; ABRACHEVA, P.; GENOVA, Y.; CHRISTOV, N. Study on symptomless leaf infection in grapevine plants grown *in vitro* with grapevine leafroll associated virus 3. **Journal Plant of Physiology**, 164, p.1124-1133, 2007.

FRANCK, T.; GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; DOMMES, J.; HAUSMAN, J. F. Are hyperhydric shoots of *Prunus avium* L. energy deficient? **Plant Science**, 160, p.1145–1151, 2001.

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

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

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

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

KADLECEK, P.; TICHÁ, I.; HASEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SCHAFER, C. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. **Plant Science**, 161, p. 695-701, 2001.

LEE, S. H.; TEWARI, R. K.; HAHN, E. J. PAEK, K. Y. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Plantlets. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 90, p.141–151, 2007.

MURCHIE, E. H.; HORTON, P. Acclimation of photosynthesis to irradiance and spectral quality in British plant species: chlorophyll content, photosynthetic capacity and habitat preference. **Plant Cell & Environment**, 20, p.438-448, 1997.

ORTÍZ, C. E. R.; Avaliação fisiológica de plantas de urucum *Bixa orellana* L. 2004. 100p. **Tese** (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2004.

POSPÍŠILOVÁ, J.; SOLÁROVÁ, J.; CATSKÝ, J. Photosynthetic responses to stresses during *in vitro* cultivation. **Photosynthetica**, 26, p.3–18, 1992.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropapagated plants to the greenhouse and field, in: P.C. Debergh, R.H. Zimmerman (Eds.), **Micropropagation. Tecnology and Application**, Kluwer, Dordrecht, 1991, p.71-93.

SANTOS, C.; FRAGOEIRO, S.; OLIVEIRA, H.; PHILLIPS, A. Response of *Vitis vinifera* L. plants inoculated with *Phaeoacremonium angustius* and *Phaeomoniella chlamydospora* to thiabendazole, resveratrol and sodium arsenite. **Scientia Horticulture**, 107, p.131-136, 2006.

SERRET, M. D.; TRILLAS, M. I.; MATAS, J.; ARAUS, J. L. Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 45, p.1-16, 1996.

SHEEN, J. Feedback control of gene expression. **Photosynthesis Research**, 39, p.427–438, 1994.

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

TURCHETTO, A. C.; ZANANDREA, I.; NASSI, F.L.; BRAGA, E. J. B.; PETERS, J. A.; BACARIN, M. A. Cinética da emissão da fluorescência das clorofilas em folhas de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivadas *in vitro* sob estresse salino. Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Recife, PE. **CD-ROM** do 10^o Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2005.

WALTERS, R. G.; SHEPHARD, F.; ROGERS, J. J. M.; ROLFE, S. A. HORTON, P. Identification of mutants of *Arabidopsis* defective in acclimation of photosynthesis to the light environment. **Plant Physiology**, 131, p.472-481, 2003.

WETZTEIN, H. I.; SOMMER, H. E. Leaf anatomy of tissue cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. **American Journal of Botany** 69, p.1579–1586, 1982.

ZANANDREA, I.; BACARIN, M. A.; FALQUETO, A. R.; BRAGA, E. J. B.; PETERS, J. A. Características fotossintéticas de macieira cultivada *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, 5, p.885-887, 2007.

CAPÍTULO I

EFEITO DA IRRADIÂNCIA, DA TAXA DE FLUXO E DA UMIDADE DO AR NA DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA *IN VITRO* EM PLÂNTULAS DO CERRADO

RESUMO

A avaliação da eficiência fotossintética é uma importante ferramenta para as investigações das respostas das plantas às condições ambientais, bem como para a seleção de genótipos. Porém, há uma carência de protocolos funcionais para esses tipos de avaliações para plantas cultivadas *in vitro*. Objetivou-se neste estudo ajustar a metodologia convencional de medição de trocas gasosas para as plantas *in vitro* mediante análise do efeito da irradiância, da taxa de fluxo e da umidade do ar sobre a taxa fotossintética em plântulas de *Hyptis marrubioides* Epling e de *Hancornia speciosa* Gomes. O ajuste foi complementando pela avaliação de fluorescência, e pela determinação do conteúdo de pigmentos cloroplastídicos. O conjunto analisador de gases adotado neste estudo foi sensível às respostas de assimilação de CO₂ pelas plântulas destas espécies. As avaliações de fluorescência confirmaram a habilidade fotossintética das plantas neste estudo, inclusive a curva de ETR teve padrão semelhante à curva de resposta de assimilação de CO₂ em função da DFF, obtida pelo IRGA. A utilização de DMSO para extração de pigmentos em ambas as espécies foi adequada. As metodologias propostas neste trabalho podem se estender, com pequenos ajustes a outras espécies cultivadas *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

A avaliação da taxa fotossintética constitui uma ferramenta importante para a análise do impacto das condições ambientais na produtividade das plantas, bem como para sugerir medidas técnicas ou de melhoramento genético a fim de otimizar a eficiência do uso da água e do carbono (MOON et al., 1987). Diversos métodos podem ser utilizados para quantificar a taxa fotossintética, no entanto, dois métodos são os mais empregados: incremento de matéria seca pela planta e avaliação de trocas gasosas (WANG et al., 2004). As avaliações de trocas gasosas se baseiam principalmente nas taxas de evolução de O₂ ou de consumo de CO₂. No entanto, há uma carência de protocolos funcionais para a avaliação da eficiência fotossintética de cultivos *in vitro*, por meio de metodologias que não alterem as condições de crescimento das plântulas durante as avaliações.

Em alguns estudos, a taxa fotossintética das plântulas *in vitro* foi avaliada por meio da evolução de oxigênio, utilizando equipamentos denominados eletrodos de Clark e analisadores de O₂ (CHEN, 2006). Alguns exemplos são aqueles realizados por Kadlecek et al. (2001), Le et al. (2001) e Cassana et al. (2010), para verificar efeitos da irradiância e da concentração de sacarose no meio de cultivo, bem como o comportamento autotrófico de plântulas, e a infecção viral de plantas *in vitro* (CHRISTOV et al., 2007). Embora o método possa ser utilizado para avaliar a capacidade fotossintética de fragmentos de folhas, a técnica não reflete as condições de crescimento *in vitro* das plântulas, uma vez, que o procedimento envolve a retirada de fragmentos foliares, na forma de discos, e, conseqüentemente alterações drásticas das condições atmosféricas do ambiente *in vitro*.

A cromatografia gasosa, também tem sido alternativa para avaliação da taxa fotossintética em plântulas *in vitro*. Utilizando este método é possível quantificar a variação da concentração de CO₂ nas condições *in vitro* e, conseqüentemente, a taxa fotossintética de plântulas (MOSALEEYANON et al., 2004; LUCCHESINI et al., 2006; XIAO e KOZAI, 2006). Neste método, amostras de gás do frasco de cultivo são injetadas dentro do sistema de análise do cromatógrafo, e a concentração de CO₂ é determinada por um filamento detector de condutividade térmica ou por um detector de ionização de chama. Embora permita estimar a taxa fotossintética *in vitro*, esta técnica se caracteriza por não considerar o microclima do frasco de cultivo (CHEN, 2006). A

maioria dos equipamentos comerciais para medição de taxa fotossintética se baseiam no consumo de CO₂, por meio de analisadores de gases no infravermelho (IRGA).

Uma importante metodologia para avaliações ecofisiológicas é a que utiliza a técnica da fluorescência da clorofila *a*, mediante a utilização de equipamentos denominados fluorômetros ou fluorímetros. Embora a fluorescência da clorofila *a* não quantifique as trocas gasosas ela se destaca por ser utilizada como um indicador da eficiência fotoquímica e da ocorrência da fotoinibição (BJÖRKMAN e DEMMIG, 1987; KRAUSE e WEIS, 1991). O rendimento da fluorescência da clorofila *a* é afetado pela organização do complexo antena, pelo transporte de elétrons no aparato fotossintético (SCHNETTGER et al., 1994), pela competição com o processo fotoquímico e ainda como processos não fotoquímicos como a dissipação térmica, entre outros (MAXWELL e JOHNSON, 2000).

A medição dos parâmetros da fluorescência da clorofila é um método não invasivo, rápido, eficiente, sensível a vários tipos de estresse (YUSUF et al., 2010) permitindo avaliar o desempenho e a capacidade fotossintética (SNEL e VAN KOOTEN, 1990), por meio do rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm), pela taxa relativa de transporte de elétrons (ETR), pelo rendimento quântico máximo do FS II ($\Delta F/F_m'$) (GENTY et al., 1989), e ainda pela extinção fotoquímica (qP) e não fotoquímica (NPQ) (MAXWELL e JOHNSON, 2000).

Talvez a falta de protocolos detalhados de calibração destas medidas para as plântulas *in vitro*, ainda seja uma das principais limitações para o aumento do seu emprego na cultura de tecidos. Alguns ajustes e cuidados devem ser observados, de forma a evitar, por exemplo, uma desidratação rápida das plântulas, gerando um estresse adicional por ocasião da própria medição, o que poderia interferir nos resultados obtidos e não refletir exatamente a resposta fisiológica típica em uma condição *in vitro*.

Um dos fatores ligados à eficiência fotossintética de plantas e, conseqüentemente, ao crescimento e à adaptabilidade a diversos ambientes é o conteúdo de clorofilas e carotenoides. O conteúdo de clorofila nas folhas frequentemente é utilizado para estimar o potencial fotossintético das plantas, pela sua ligação direta com a absorção e transferência de energia luminosa (RÊGO e POSSAMAI, 2004). A determinação precisa de clorofilas e de carotenoides é relativamente fácil, e associada com outras avaliações fisiológicas como fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas, ampliam o entendimento das respostas do aparato fotossintético das plantas.

No cultivo *in vitro* convencional, as plantas geralmente possuem folhas com menor número de cloroplastos, com empilhamento de tilacoides pouco desenvolvidos (MAJADA et al., 2002), baixa quantidade de clorofilas e grana desorganizados (LUCCHESINI et al., 2006). A determinação dos pigmentos cloroplastídicos é justificável visto que estão no centro do processo de captação de energia luminosa. O conhecimento dos teores relativos destes pigmentos constitui uma boa ferramenta para comparar tratamentos, e tem sido extensivamente utilizado para avaliações fisiológicas do cultivo *in vitro*, por exemplo, nas respostas de diferentes concentrações de cobre em estévia (JAIN et al., 2009), e de nitrogênio em diferentes genótipos de cana-de-açúcar (DONATO et al., 2003); em vários trabalhos com enriquecimento do meio de cultivo com CO₂ e/ou sacarose (MOSALEEYANON et al., 2004; JO et al., 2008), na influência do fotoperíodo em *Alocasia amazonica* (JO et al., 2008), na qualidade da luz (LEE et al., 2007; IACONA e MULEO, 2010), na influência da ventilação (MOHAMED e ALSADON, 2010), no efeito da irradiância (VENTURA, 2007; LEE et al., 2007) entre outros.

Os métodos existentes para determinar o conteúdo de clorofilas em plantas superiores podem ser invasivos ou não invasivos. Os não invasivos são baseados na absorbância e/ou reflectância da radiação em determinados comprimentos de onda, por folhas intactas, utilizando equipamentos denominados medidores de clorofila. Os métodos invasivos se baseiam na extração dos pigmentos utilizando solventes orgânicos (NETTO et al., 2005), sendo a acetona e o éter os mais comuns (LICHTENTHALER, 1987). Algumas vantagens do dimetilsulfóxido (DMSO) sobre a acetona, como a dispensa de maceração dos tecidos e centrifugação do extrato, bem como, maior estabilidade do extrato armazenado, têm sido apontadas com o intuito de se estabelecer a ampliação da utilização deste solvente (WELBURN, 1994; KUKI et al., 2005; SANTOS et al., 2008).

Poucos são os relatos de protocolos para extração de clorofilas e carotenoides em plantas crescidas *in vitro*. O DMSO por meio de suas características físico-químicas e praticidade de utilização possui potencial para determinar pigmentos cloroplastídicos em espécies cultivadas nessas condições, e por isso se torna importante o ajuste do método de extração a cada nova espécie estudada, objetivando obter a máxima eficiência na extração.

As espécies vegetais do bioma cerrado, tais como a hortelã-do-campo (*H. marruboides* Epling) e a mangaba (*H. speciosa* Gomes), possuem importantes

propriedades que as tornam plantas potenciais para a exploração econômica. A hortelã-do-campo é uma espécie herbácea, da família Lamiaceae, possui aroma característico e é espécie de uso medicinal conhecida pelas suas atividades contra infecções gastrointestinais, infecções de pele, dores e câimbras (CORRÊA, 1931; SALES et al., 2009). Já a mangaba, pertence à família Apocynaceae, é uma espécie frutífera arbórea, cujos frutos possuem polpa de coloração branca, agridoce e aromática, podendo ser consumida *in natura* ou na preparação de diversos produtos alimentícios (COHEN e SANO, 2010). Além disso, esta espécie tem potencial para a produção de borracha (PAULA, 1992).

Reconhecendo a importância destas espécies nativas do cerrado, torna-se necessário o estabelecimento de técnicas de multiplicação em escala comercial e a adequação de metodologias, como as destinadas às avaliações da funcionalidade do aparato fotossintético, que permitam avaliar o desempenho fisiológico das plântulas em diversas condições do ambiente *in vitro*.

Diante do exposto, este estudo teve por objetivo ajustar a metodologia para avaliação da eficiência fotossintética por meio, da medição da taxa fotossintética, da fluorescência da clorofila *a*, e da determinação do conteúdo de pigmentos cloroplastídicos de plântulas *in vitro* de hortelã-do-campo (*H. marruboides* Epling) e mangaba (*H. speciosa* Gomes).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos foram conduzidos no Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde, sendo o cultivo *in vitro* realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e as avaliações fisiológicas realizadas no Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal.

2.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado na propagação *in vitro* consistiu de plântulas estabelecidas *in vitro*, obtidas a partir de sementes, de hortelã-do-campo (*H. marruboides* Epling) e de mangaba (*H. speciosa* Gomes). As sementes de hortelã-do-campo foram oriundas do cerrado do município de Luminárias - MG e as de mangaba foram provenientes do município de Montes Claros de Goiás - GO, Fazenda Gameleira.

As sementes foram submetidas à assepsia e então inoculadas em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultivo. Após inoculação os tubos de ensaio, em ambas as espécies, foram vedados com tampas de polipropileno. Para a germinação de hortelã-do-campo utilizou-se o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com a metade da concentração original, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 3,0 g L⁻¹ de ágar. Para as sementes de mangaba o meio de cultivo utilizado foi o WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 3,5 g L⁻¹ de ágar. Não houve adição de regulador de crescimento para nenhuma das espécies. O meio de cultivo foi ajustado para pH 5,7 ± 0,3 e foi autoclavado a 121°C, sob pressão de 1,5 atm, por 20 minutos.

a) Condições de crescimento

Os frascos inoculados foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas com temperatura de 25 ± 3°C, umidade relativa de 50 ± 5% e radiação fotossinteticamente ativa de 50 ± 5 μmol m⁻² s⁻¹, fornecidas por tubos fluorescentes OSRAM[®], com potência de 40 W, luz do dia. A irradiância foi aferida por meio do sensor de radiação fotossinteticamente ativa, modelo QSO-S (Decagon Devices, Pullman, WA, USA).

Foram realizadas contagens diárias para averiguar a completa estabilização da porcentagem de germinação.

As sementes de hortelã-do-campo e de mangaba permaneceram no meio inicial, por 30 e 60 dias respectivamente, até atingirem o comprimento de ± 3,0 cm. Após este período foi feito o primeiro subcultivo, em que os segmentos nodais foram excisados e dispostos no mesmo tipo de meio que lhes deram origem, com redução pela metade dos sais em mangaba. Estes explantes permaneceram incubados durante 50 dias. A partir do primeiro subcultivo foram obtidas plântulas de hortelã-do-campo suficientes para o ajuste da metodologia e para caracterização da eficiência fotossintética. Para a obtenção de plântulas suficientes de mangaba foi necessário fazer o segundo subcultivo onde as plantas permaneceram mais 50 dias até serem avaliadas.

2.2. Descrição e ajuste do aparelho para a avaliação das trocas gasosas

Comercialmente não há disponível um equipamento que seja adequado para a medição das características fotossintéticas em plântulas *in vitro*. No entanto, mediante alguns ajustes e adaptações, é possível medir estas características com equipamentos

disponíveis no mercado. Neste estudo foi utilizado o analisador de gases no infravermelho, modelo S151 (Qubit Systems, Kingston, ON, Canadá).

O analisador de gases no infravermelho (IRGA) utilizado nestes estudos possui os componentes e sensores acoplados entre si por mangueiras flexíveis e conexões ajustáveis, o que permite adaptações de modo a alterar o caminho do ar de referência e de análise. Semelhante aos modelos de IRGAs de outros fabricantes, o aparelho possui uma bomba de fluxo conectada à câmara foliar, posteriormente um sensor de umidade e temperatura e finalmente um analisador de CO₂.

Para a medição das trocas gasosas das plântulas *in vitro*, foi necessário substituir a câmara foliar original do IRGA da Qubit System, pelo tubo de crescimento das plântulas para proceder os ajustes necessários (Figura 1).

O ar utilizado nas medições pode ser proveniente de uma bolsa ou coletado diretamente da atmosfera. Este ar é bombeado a uma taxa de fluxo constante, e regulável, até a câmara foliar (tubo contendo a plântula). Posteriormente o ar é analisado por um sensor de umidade e temperatura, resultando em leituras cujos sinais elétricos são convertidos, por uma interface, em medidas de umidade relativa (UR, %) e temperatura (°C) e os envia ao *software* instalado num computador. Ao sair do sensor de umidade e temperatura o ar passa por um tubo contendo um dessecante para retirada do vapor d'água, seguindo então, para o analisador de gases no infravermelho para medida da concentração de CO₂. Este procedimento é realizado com o ar passando pela câmara foliar vazia, obtendo-se as medidas do ar de referência. Repetindo o procedimento, tendo a folha da planta na câmara foliar, obtém-se então, as medidas do ar de análise. As diferenças entre as medidas do ar de análise e o ar de referência são utilizadas para o cálculo do intercâmbio gasoso.

O tubo contendo o material vegetal foi posicionado dentro de um compartimento circular de isopor, revestido internamente, com papel alumínio, com a finalidade de otimizar e uniformizar a incidência de luz (Figuras 1C e 2B). A entrada de ar (ar de referência) ocorre por uma mangueira flexível através de uma perfuração na tampa do tubo (Figura 2A). A extremidade desta mangueira é posicionada até a base da plântula, de modo que o fluxo de ar percorra uniformemente por toda a parte aérea do vegetal, sendo que o ar de saída (ar de análise) é levado ascendentemente até outra mangueira localizada na extremidade superior do tubo (Figura 2C).

Em síntese o ajuste da metodologia para avaliação das trocas gasosas *in vitro* fundamentou-se em:

- curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz (curva A/I);
- curvas de resposta de trocas gasosas à taxa de fluxo do ar através do tubo de ensaio;
- ajuste das condições de umidade relativa do ar de entrada (ar de referência) no tubo;
- ajuste das equações para cálculo das características das trocas gasosas em plântulas *in vitro*.

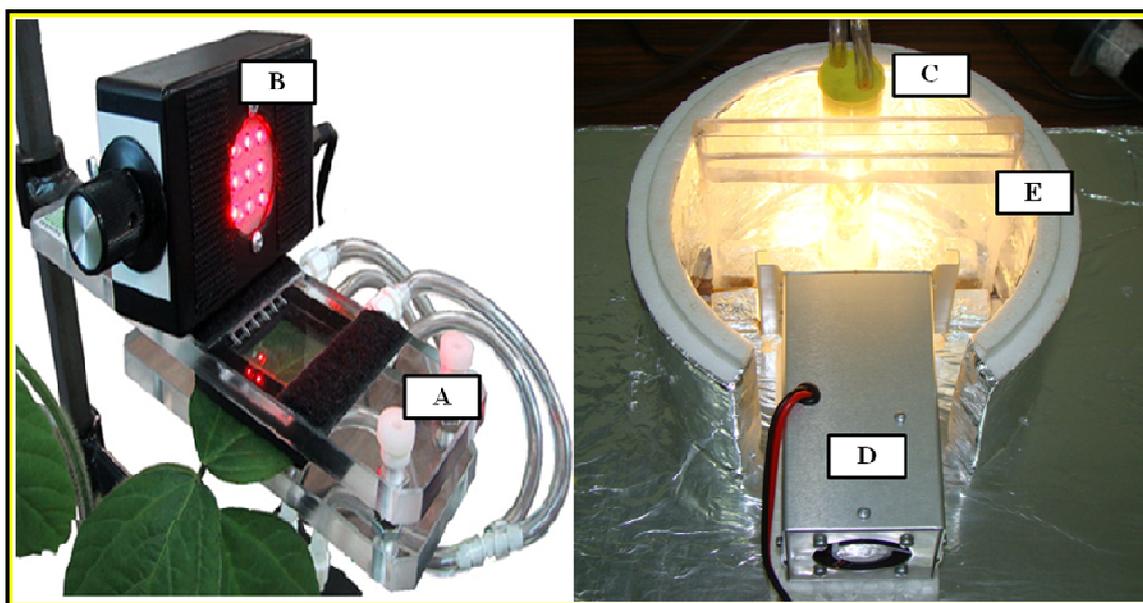


Figura 1. Câmara de medição (A) e fonte de luz originais do Qubit Systems (B). Adaptação do tubo de ensaio como câmara de medição (C), e da fonte de luz para as condições *in vitro* (D). Cuba em poliestireno para evitar aquecimento pelo calor liberado pela fonte de luz (E).

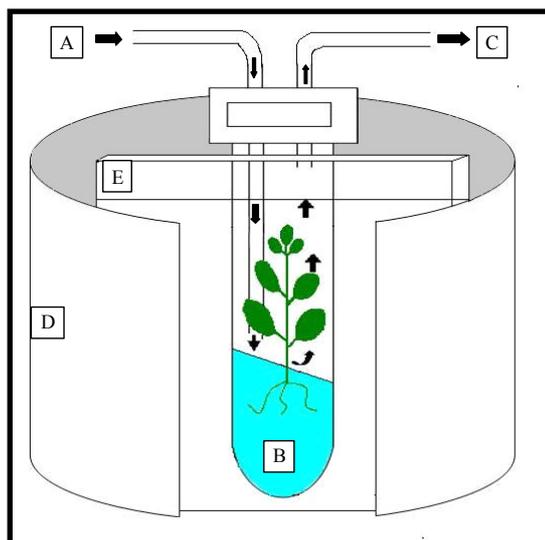


Figura 2. Esquema da adaptação da câmara foliar para medições de trocas gasosas para as condições *in vitro*. (A). Entrada do ar de referência; (B). Tubo de ensaio contendo plântula; (C). Saída do ar de análise; (D). Compartimento de isopor revestido internamente com papel alumínio; (E). Cuba em poliestireno contendo água para isolamento térmico.

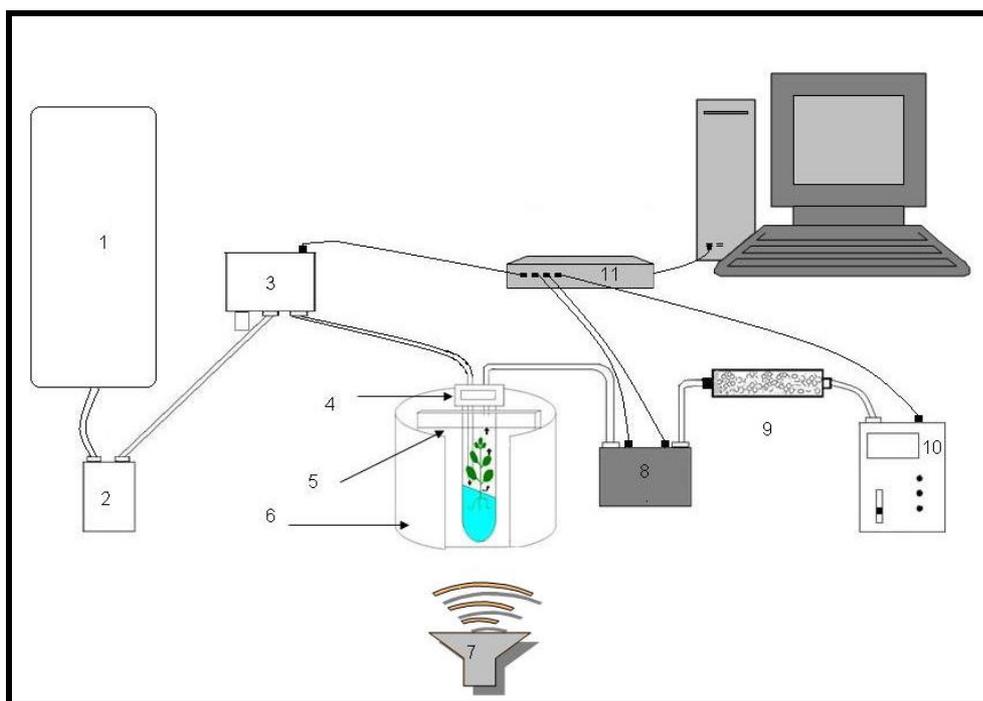


Figura 3. Esquema da adaptação do conjunto analisador de trocas gasosas para as condições *in vitro*. (1). Bolsa de ar; (2). Bomba de fluxo; (3). Monitor de taxa de fluxo de ar (G 265); (4). Tubo de ensaio com plântula; (5). Cuba com água; (6). Compartimento de isopor revestido com papel alumínio; (7). Fonte de luz; (8). Sensor de temperatura e umidade (S 161); (9). Tubo com dryrite (dessecante); (10). IRGA (S 151); (11). Interface (Lab Pro).

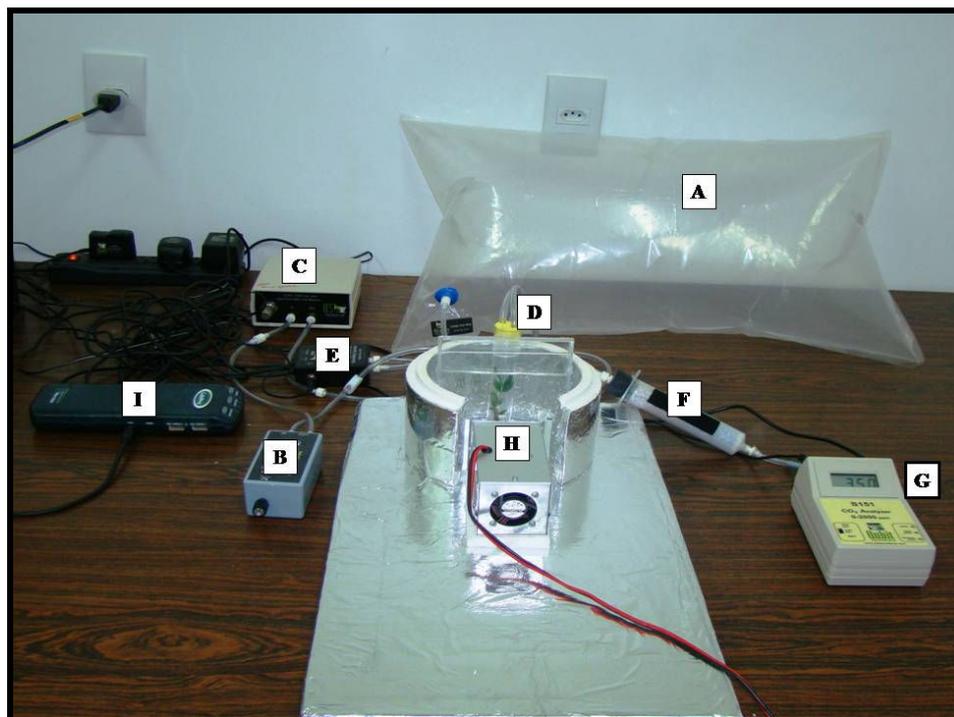


Figura 4. Detalhes do sistema adaptado em procedimento de medição. (A). Bolsa de ar; (B). Bomba de fluxo; (C). Monitor de fluxo de ar (G 265); (D). Tubo de ensaio com plântula envolto em compartimento de isopor revestido com papel alumínio; (E). Sensor de temperatura e umidade (S 161); (F). Tubo com dryrite; (G). IRGA (S 151); (H). Fonte de luz; (I). Interface (Lab Pro).

2.3. *Curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz (curva A/I)*

A curva de luz consistiu na medição da taxa fotossintética líquida potencial a partir da imposição das plântulas *in vitro* a diferentes níveis de densidade de fluxo de fótons (DFF). A respiração no escuro também foi avaliada submetendo as plântulas à escuridão total. No dia das medições as plântulas foram mantidas por oito horas no escuro (durante a noite) e antes do início das medições, foram expostas por sessenta minutos na irradiância de crescimento e imediatamente avaliadas.

As plântulas, dentro do tubo de crescimento *in vitro*, foram submetidas às densidade de fluxo de fótons decrescentes de 1350; 1200; 950; 450; 250; 110; 50 e 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As medições foram realizadas em temperatura ambiente de 25 ± 1 °C, com a taxa de fluxo de ar ajustada para 300 mL min^{-1} por meio do monitor de fluxo digital G265 (Qubit Systems, Kingston, ON, Canadá) e, a umidade do ar de medição foi ajustada para 80 ± 5 %. Tanto a temperatura quanto a umidade relativa do ar de referência e do ar de análise foram monitoradas utilizando o sensor de temperatura e umidade modelo S161 (Qubit Systems, Kingston, ON, Canadá). A fonte de luz utilizada

foi a LCi Light Systems (ADC Bioscientific, Great Amwell, Herts, England), a qual consiste de um suporte com ventilação contendo uma lâmpada halógena dicróica de 20 W. Para a medição do último ponto da curva (DFF $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o tubo foi envolvido com papel alumínio. Para evitar o aquecimento do tubo de ensaio em decorrência do calor liberado pela fonte de luz foi confeccionada uma cuba em poliestireno (Figuras 1E e 2E) nas dimensões de 140 mm de altura, 125 mm de largura e 5 mm de espessura (com paredes de 1mm) que fora preenchida com água. A cuba foi posicionada entre o tubo de ensaio e a fonte de luz, e a água trocada periodicamente.

A irradiância em cada ponto da curva foi obtida pela variação da distância entre a fonte de luz e o tubo de ensaio. Em cada ponto, a irradiância foi ajustada previamente utilizando sensor de radiação fotossinteticamente ativa, modelo QSO-S (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). Nesse ajuste foi considerada a posição da plântula no tubo, e a transmissividade da luz através do tubo e da cuba contendo água.

As plântulas permaneceram por um período de 10 minutos de exposição em cada irradiância. Após esse período foram registrados os valores da concentração de CO_2 e da temperatura do ar que saiu do tubo. Essas medidas foram utilizadas posteriormente para o cálculo da taxa fotossintética das plântulas.

As curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz foram obtidas a partir do ajustamento dos dados originais ao modelo de hipérbole não retangular (PRIOUL e CHARTIER, 1977), conforme a equação a seguir:

$$A = \frac{\phi_{(I_0)} \cdot I + A_{max} - \sqrt{(\phi_{(I_0)} \cdot I + A_{max})^2 - 4\theta \cdot \phi_{(I_0)} \cdot I \cdot A_{max}}}{2\theta} - R_d$$

Em que:

A = taxa fotossintética líquida ($\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ou $\mu\text{mol g MS}^{-1} \text{s}^{-1}$);

$\phi_{(I_0)}$ = eficiência quântica máxima obtida para $I = 0$ ($\mu\text{mol } \mu\text{mol}^{-1}$);

I = densidade de fluxo fotossinteticamente ativo ($\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$);

A_{max} = taxa fotossintética bruta de saturação ($\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ou $\mu\text{mol g MS}^{-1} \text{s}^{-1}$);

R_d = respiração no escuro ($\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ou $\mu\text{mol g MS}^{-1} \text{s}^{-1}$);

θ = convexidade da curva (adimensional).

A irradiância de saturação foi dada pelo valor de DFF no qual $A = 90\%$ da A_{max} . A taxa fotossintética foi calculada com base na área foliar, na massa seca foliar e da massa seca da parte aérea. A área foliar foi avaliada por meio da integração das imagens das folhas em um *software*. A determinação da matéria seca das folhas e da parte aérea das plântulas foi realizada mediante a secagem em estufa a 65°C por 72 horas.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, utilizando-se oito repetições de plântulas de hortelã-do-campo e dez repetições de mangaba. Cada repetição foi constituída por um tubo de ensaio contendo uma plântula.

2.4. Curvas de resposta de trocas gasosas à taxa de fluxo do ar através do tubo de ensaio

A adequação da taxa de fluxo do ar através do tubo de ensaio foi ajustada de forma a obter a faixa adequada do sinal elétrico nos sensores, associada à mínima alteração do ambiente *in vitro* para o cálculo da taxa fotossintética e da taxa transpiratória.

Foram testadas cinco taxas de fluxos de ar, sendo: 50, 100, 200, 300 e 400 mL min⁻¹ por meio da configuração do monitor de fluxo digital modelo G265 (Qubit Systems, Kingston, ON, Canadá). Taxas de fluxos maiores que 400 mL min⁻¹ foram descartadas, porque em testes preliminares, não se obteve a estabilidade na sinalização de leituras pelo equipamento. O tempo de leitura, tanto do ar de referência, quanto do ar de análise, em cada repetição, foi de 10 minutos. O ar de referência, em cada repetição, foi registrado antes e depois da exposição das plântulas a cada taxa de fluxo, a fim de minimizar os efeitos resultantes da oscilação de sinal elétrico do equipamento e das condições ambientais. Tanto a temperatura quanto a umidade relativa do ar de referência foram monitoradas utilizando o sensor S161 (Qubit Systems, Kingston, ON, Canadá). As medições foram realizadas em temperatura ambiente de 25 ± 1°C, umidade relativa do ar de referência em 80 ± 5% e sob a irradiância de 600 μmol m⁻² s⁻¹, considerando os resultados preliminares da curva de luz descrita anteriormente.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, utilizando as quatro repetições para ambas as espécies. Cada repetição foi constituída por um tubo de ensaio contendo uma plântula.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e quando necessário, às médias foram ajustados modelos de regressão utilizando o *software* SAEG 9.1 (UFV, 2007).

2.5. Ajuste das condições de umidade relativa do ar de referência

O objetivo deste procedimento foi verificar o efeito da umidade relativa do ar de entrada (ar de referência) no tubo de ensaio, nas trocas gasosas das plântulas *in vitro*. Além disso, evitar que durante as medições as condições da atmosfera do ar do tubo sofressem alterações que pudessem modificar a resposta real das plântulas.

Foram testados dois percentuais de umidade relativa do ar de entrada no tubo, sendo $20 \pm 5\%$ e $80 \pm 5\%$. O ar com umidade relativa de 20% foi obtido diretamente a partir de um cilindro de CO_2/N_2 , com concentração padrão de CO_2 de $380 \mu\text{mol mol}^{-1}$. O ar com umidade relativa de 80% foi obtido a partir do borbulhar do ar do cilindro num tubo de ensaio contendo 30 mL de água destilada, fervida e resfriada em temperatura ambiente. A fervura foi realizada objetivando eliminar o CO_2 da água e manter a estabilidade da concentração de CO_2 do ar do cilindro. Simultaneamente ao borbulhar, o ar umedecido foi armazenado em bolsas plásticas para utilização durante as medições (Figuras 5 e 6). Tanto a temperatura quanto a umidade relativa do ar de referência foram monitoradas utilizando o sensor S161 (Qubit Systems, Kingston, ON, Canadá).

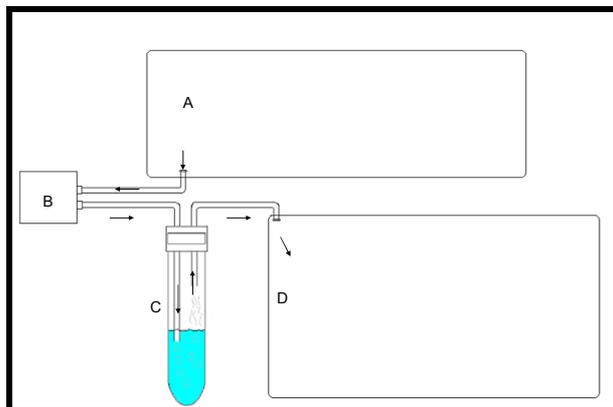


Figura 5. Esquema de umedecimento do ar de referência: O ar coletado de um cilindro com mistura padrão de CO_2/N_2 é armazenado numa sacola (A), que posteriormente é bombeado (B) por mangueiras diretamente em água destilada num tubo de ensaio vedado (C). O ar umedecido é impulsionado até uma mangueira posicionada na tampa do tubo e direcionado para o preenchimento de outra sacola de coleta de ar (D).



Figura 6. Detalhes do processo de umedecimento do ar.

As medições foram realizadas a temperatura ambiente de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, taxa de fluxo do ar de 300 mL min^{-1} e sob a irradiância de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, considerando os resultados preliminares da curva de luz descrita anteriormente.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, utilizando dez repetições para ambas as espécies. Cada repetição foi constituída por um tubo de ensaio contendo uma plântula.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e a diferença entre as médias comparadas pelo teste F da própria análise de variância.

2.6. Ajuste das equações para cálculo das características das trocas gasosas nas plântulas in vitro.

O ajuste das equações se deu a partir de modificações nas equações fornecidas pelo próprio manual do equipamento (Qubit Systems, 2009), conforme descrito a seguir:

a) Taxa de assimilação de CO_2 (A):

$$A = \frac{\Delta\text{CO}_2 \times F \times 10^{-3} \times 273}{60 \times 22,415 \times (T_c + 273) \times AF}$$

Em que:

ΔCO_2 = Diferença entre a concentração de CO_2 ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) do ar de referência e do ar de análise;

F = Taxa de fluxo de ar que passa pelo tubo de ensaio (mL min^{-1});

T_c = Temperatura da câmara durante a medição ($^{\circ}\text{C}$);

22,415 = Constante do volume molar (L mol^{-1}) dos gases na CNPT;

AF = Área foliar das plântulas dentro do tubo em m^2 (ou grama de matéria seca das folhas ou da parte aérea das plântulas dentro do tubo). Quando os cálculos foram feitos com base na área foliar os dados foram expressos como $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e quando efetuados com base na matéria seca foliar ou da parte aérea, foram expressos como $\mu\text{mol g MS}^{-1} \text{s}^{-1}$.

A partir da mesma fórmula utilizada para o cálculo da taxa fotossintética, calculou-se também o valor de respiração (R_d), ao impor uma condição de escuridão no tubo contendo as plântulas durante a medição.

b) Taxa transpiratória (E):

$$E = \frac{e_{s(T_c)} \times (UR_{AA} - UR_{AR})}{AF \times (100p - UR_{AA} \times e_{s(T_c)}) \times 100p} \times F \times 10^{-3} \times \left[\frac{273}{60 \times 22,415 \times (T_c + 273)} \right]$$

Em que:

UR_{AA} - Umidade relativa do ar de análise (%);

UR_{AR} - Umidade relativa do ar de referência (%);

p = Pressão atmosférica local (kPa);

e_s = Tensão de vapor d'água (kPa);

F = Taxa de fluxo de ar (mL min^{-1});

T_c = Temperatura da câmara de medição (tubo contendo a plântula) ($^{\circ}\text{C}$);

AF = Área foliar das plântulas dentro do tubo em m^2 (ou grama de matéria seca das folhas ou da parte aérea das plântulas dentro do tubo).

A taxa transpiratória obtida foi expressa em $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ou em $\text{mmol g MS}^{-1} \text{s}^{-1}$.

2.7. Avaliação da fluorescência da clorofila *a*

As avaliações de fluorescência da clorofila *a* foram realizadas nas folhas das plântulas utilizadas nas medições das trocas gasosas. Nestas medições, foi utilizado um fluorômetro modulado MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Germany).

As análises foram feitas seguindo a metodologia descrita por Schreiber et al. (1986) e Genty et al. (1989), avaliando a emissão de fluorescência da clorofila *a* da parte superior do limbo foliar e usando as terminologias e cálculos propostos por Snel e Van Kooten (1990).

Na avaliação da fluorescência da clorofila das plântulas, algumas adaptações foram necessárias em relação aos procedimentos executados nas condições *ex vitro*, objetivando minimizar estresses adicionais decorrentes dos procedimentos de medição.

Antes do início das análises, os tubos de ensaio fechados, contendo as plântulas, foram mantidos no escuro à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ de UR do ar externo, por um período de 30 minutos, para a completa oxidação dos componentes de sistema de transporte de elétrons das folhas. Ao fim desse período de adaptação, as plântulas foram retiradas totalmente do tubo, ainda numa condição de ausência de irradiância fotossinteticamente ativa e pinçadas para a inserção do cabo da fibra ótica do fluorômetro. A retirada das plântulas se tornou necessária uma vez que, o manuseio das pinças e do cabo da fibra ótica é impossibilitado pelas dimensões do tubo de ensaio.

A área foliar sob a pinça foi então submetida a um pulso de luz vermelha modulada de baixa intensidade ($0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e em seguida a um pulso de 0,8 segundos de luz actínica saturante ($> 6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Assim, foi possível calcular o rendimento quântico potencial do fotossistema II, $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$, em que F_o é a fluorescência mínima, obtida pela aplicação da luz de baixa intensidade; e F_m é a fluorescência máxima obtida pela aplicação do pulso de luz actínica saturante.

Posteriormente as mesmas plântulas utilizadas no procedimento anterior, foram colocadas em uma câmara úmida por aproximadamente 20 minutos sob irradiância de $50 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ até serem medidos os parâmetros de fluorescência do claro. A câmara úmida foi construída utilizando uma bandeja de polietileno nas dimensões de 20 cm largura x 30 cm comprimento e 6 cm de profundidade, forrada com uma camada de chumaços de algodão e duas camadas de papel Germitest[®] umedecidos. A bandeja foi vedada com uma placa de vidro transparente de forma a permitir a passagem da luz, e minimizar a desidratação das plântulas até que se procedesse as medições (Figura 7). O

desempenho fotossintético em função da DFF foi determinado utilizando a programação do fluorômetro, com níveis crescentes de luz durante 4 minutos (0 a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), em oito estádios de 30 s cada (Figura 8). Ao final de cada nível de luz foi aplicado um pulso saturante para a determinação de parâmetros de fluorescência.



Figura 7. Câmara úmida utilizada para adaptação das plântulas durante os períodos de medição dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, no claro.

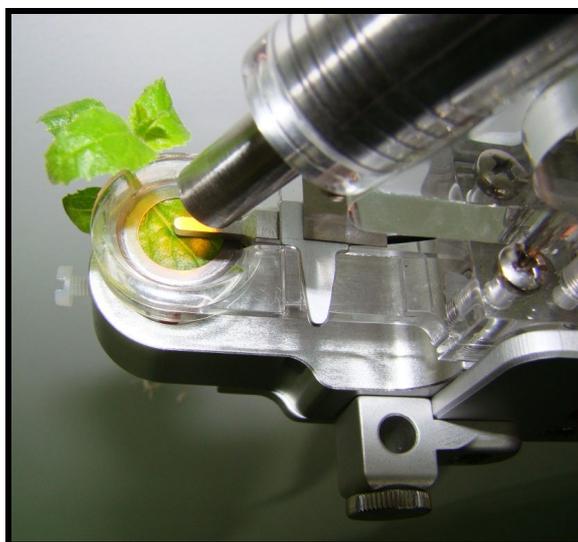


Figura 8. Detalhe de procedimento de medição dos parâmetros de claro da fluorescência da clorofila *a* (curva de fluorescência) em folha de plântula de hortelã-do-campo.

O rendimento quântico efetivo do fotossistema II foi determinado como $\Delta F/F_m' = (F_m' - F) / F_m'$, em que F é o rendimento de fluorescência antes do pulso de saturação e F_m' a fluorescência máxima durante o pulso de saturação. O $\Delta F/F_m'$ foi posteriormente utilizado para calcular e estabelecer a curva da taxa relativa de

transporte de elétrons (ETR máxima) em resposta à irradiância.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, utilizando dez repetições para hortelã-do-campo e dez repetições para mangaba. Cada repetição foi constituída por um tubo de ensaio contendo uma plântula.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e quando necessário, às médias foram ajustados modelos de regressão utilizando o *software* SAEG 9.1 (UFV, 2007).

2.8. Protocolo para extração de pigmentos cloroplastídicos

O conteúdo de pigmentos cloroplastídicos foi determinado, em cada espécie, por meio da extração com solução de dimetilsulfóxido (DMSO) saturada com carbonato de cálcio (50g L^{-1}), mediante ajuste da metodologia descrita por Kuki et al. (2005).

Foram retirados três discos foliares de 5 mm de diâmetro de plântulas de hortelã-do-campo e de mangaba, ambas com 50 dias de cultivo *in vitro*, e incubados em 5 mL de DMSO em frascos de vidro vedados e envolvidos com papel alumínio, nas temperaturas de 25 e 65 °C. Foram feitas cinco leituras de absorbância, às 4, 8, 12, 24 e 48 horas após a incubação. As absorbâncias dos extratos foram determinadas por meio de um espectrofotômetro UV-VIS, modelo Evolution 60S (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA).

Os comprimentos de onda, as equações e cálculos para a determinação do conteúdo de pigmentos foram baseados no trabalho de Wellburn (1994), considerando:

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g cm}^{-2}\text{)} = \frac{(12,47A_{665,1} - 3,62 A_{649,1}) \times V}{S}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (}\mu\text{g cm}^{-2}\text{)} = \frac{(25,06A_{649,1} - 6,5 A_{665,1}) \times V}{S}$$

$$\text{Carotenoides (}\mu\text{g cm}^{-2}\text{)} = \frac{(1000A_{480} - 1,29 Ca - 53,78Cb)/200 \times V}{S}$$

$$\text{Clorofila total (}\mu\text{g cm}^{-2}\text{)} = (Ca + Cb)$$

Em que:

A = absorbância no comprimento de onda indicado;

V = volume final do extrato;

Ca e Cb = Conteúdo de clorofila a e b, respectivamente;

S = área dos discos foliares.

A degradação da clorofila também foi avaliada por espectrofotometria, adotando o índice de feofitinação ($IF = A_{435}/A_{415}$), segundo Ronen e Galun (1984).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, utilizando nove repetições para as plântulas de hortelã-do-campo e doze para mangaba. Cada repetição foi constituída por um tubo de ensaio contendo uma plântula.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e submetidas ao ajuste de modelos de regressão utilizando o *software* SAEG 9.1 (UFV, 2007).

3. RESULTADOS

3.1. *Curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz (curva A/I)*

Tanto em plântulas de hortelã-do-campo quanto em mangaba, observou-se um aumento da taxa fotossintética na medida em que a densidade de fluxo de fótons foi aumentada. As curvas de resposta da fotossíntese líquida à luz segundo o ajuste do modelo de hipérbole não retangular indicaram que em ambas as espécies a saturação da assimilação de CO_2 ocorreu próximo à irradiância de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figuras 9 e 10).

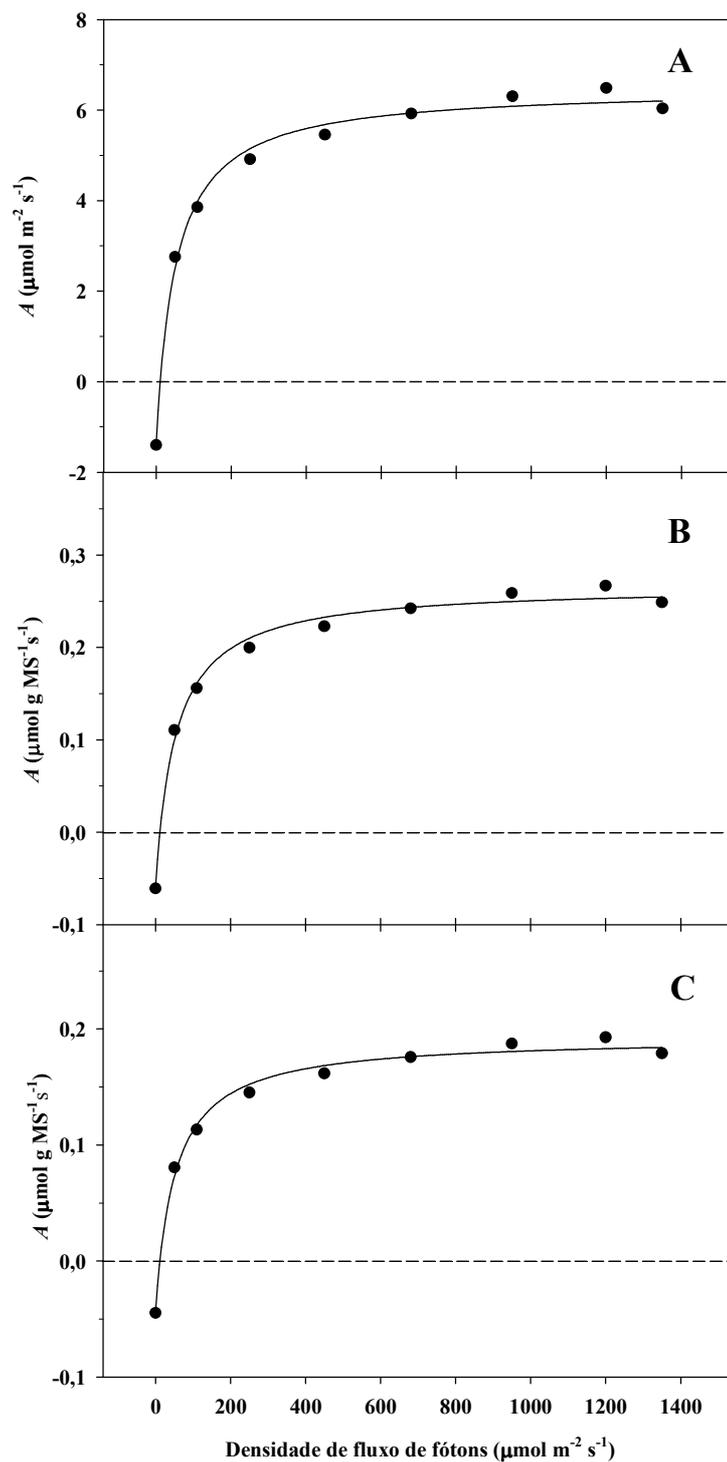


Figura 9. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) de plântulas de hortelã-do-campo cultivadas *in vitro*, em função do aumento da densidade de fluxo de fótons e calculada em função da área foliar (A), da matéria seca da folha (B) e da matéria seca da parte aérea (C). Os dados são médias de $n=8$.

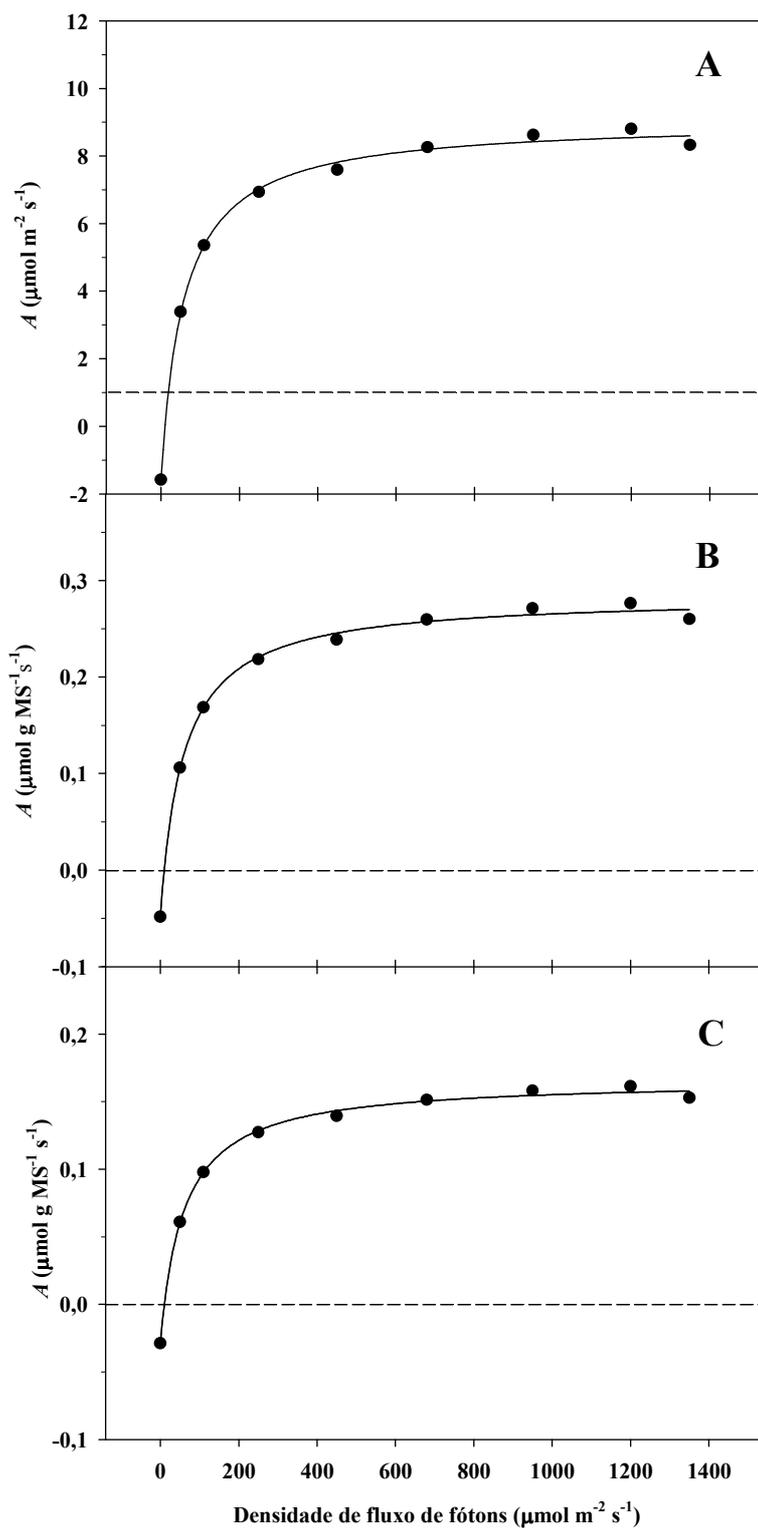


Figura 10. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) de plântulas de mangaba, cultivadas *in vitro*, em função do aumento da densidade de fluxo de fótons e calculada em função da área foliar (A), da matéria seca da folha (B) e da matéria seca da parte aérea (C). Os dados são médias de $n=10$.

3.2. Curvas de resposta das trocas gasosas à taxa de fluxo do ar através do tubo de ensaio

Embora tenha sido observada resposta da taxa fotossintética à variação da taxa do fluxo do ar através do tubo de crescimento das plântulas de hortelã-do-campo e mangaba, não foi possível ajustar um modelo de regressão significativo que explicasse o comportamento desta característica (Figura 11 e 12). Esta resposta foi semelhante independente se os cálculos foram feitos com base na área foliar, na massa seca foliar ou na massa seca da parte aérea (Figuras 11 e 12, respectivamente).

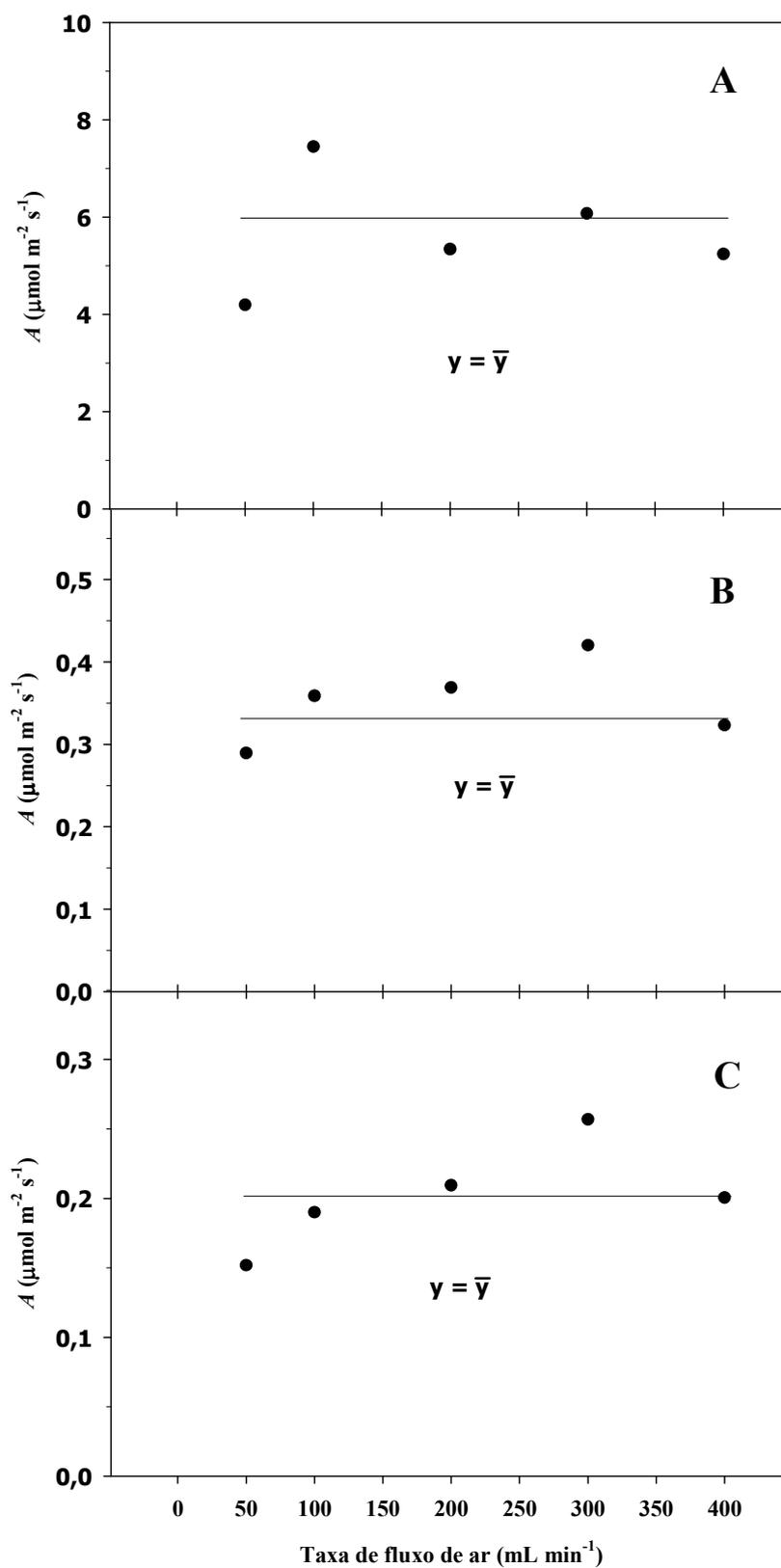


Figura 11. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A - $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de plântulas de hortelã-do-campo, cultivadas *in vitro*, em função do aumento da taxa do fluxo de ar e calculada em função da área foliar (A), da matéria seca da folha (B) e da matéria seca da parte aérea (C). ($n=4$).

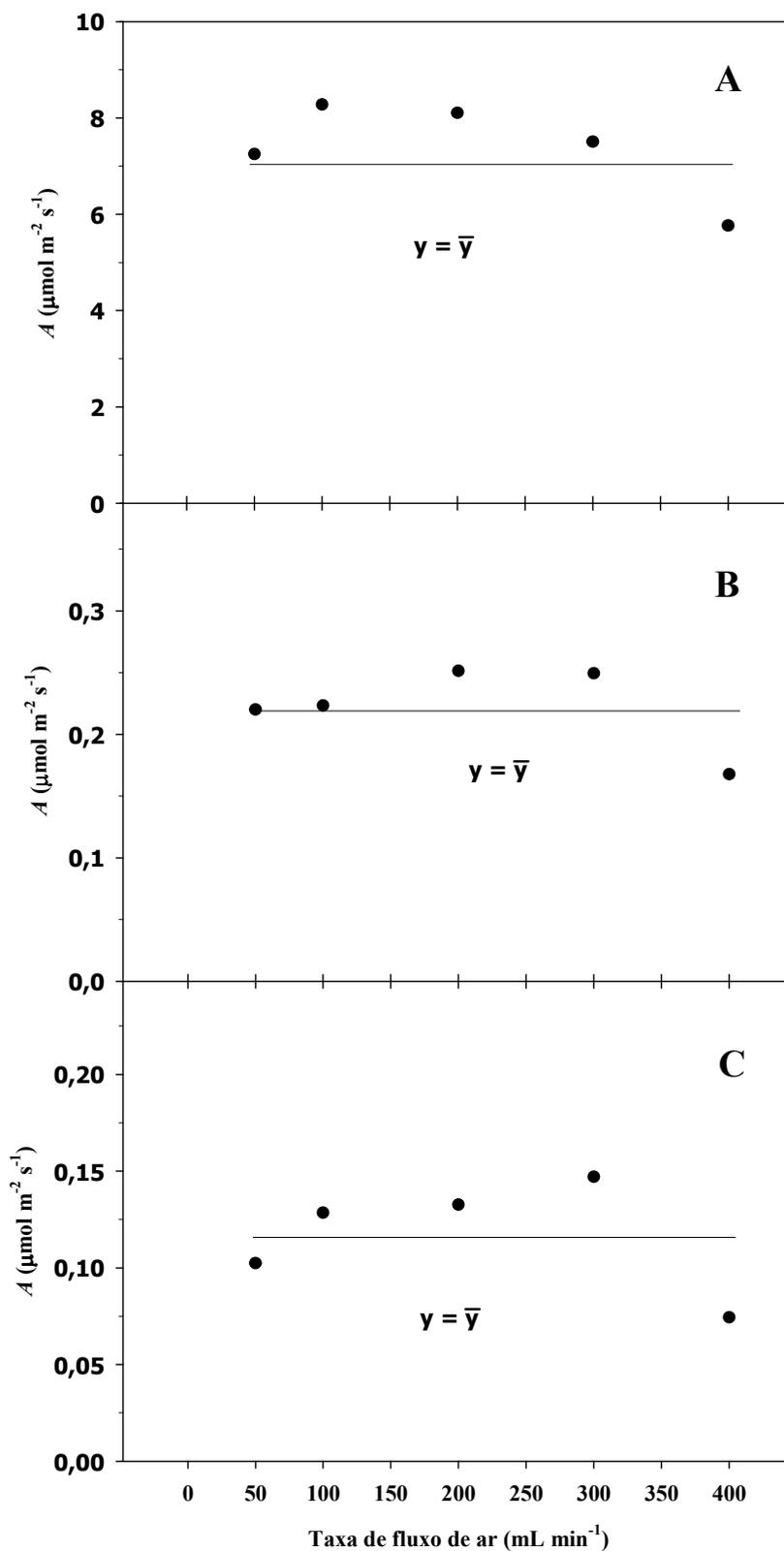


Figura 12. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A - $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de plântulas de mangaba, cultivadas *in vitro*, em função do aumento da taxa do fluxo de ar e calculada em função da área foliar (A), da matéria seca da folha (B) e da matéria seca da parte aérea (C). ($n=4$).

O aumento da taxa de fluxo de ar promoveu a elevação da E tanto em hortelã-do-campo (Figura 13) quanto em mangaba (Figura 14).

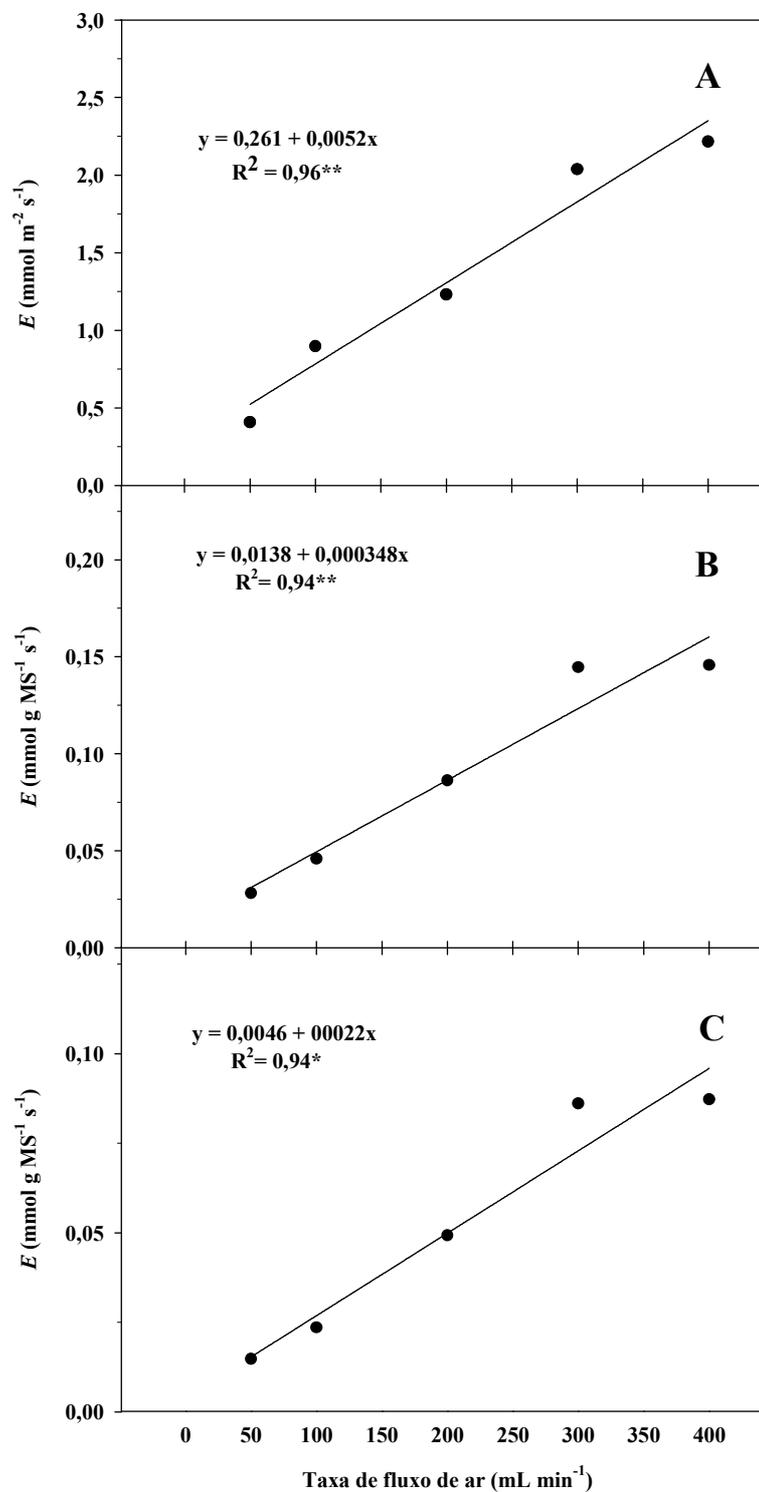


Figura 13. Taxa transpiratória (E) de plântulas de hortelã-do-campo, cultivadas *in vitro*, em função do aumento da taxa do fluxo de ar e calculada em função da área foliar (A), da matéria seca da folha (B) e da matéria seca da parte aérea (C). O comportamento dos dados é explicado por um modelo linear. Significância: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$.

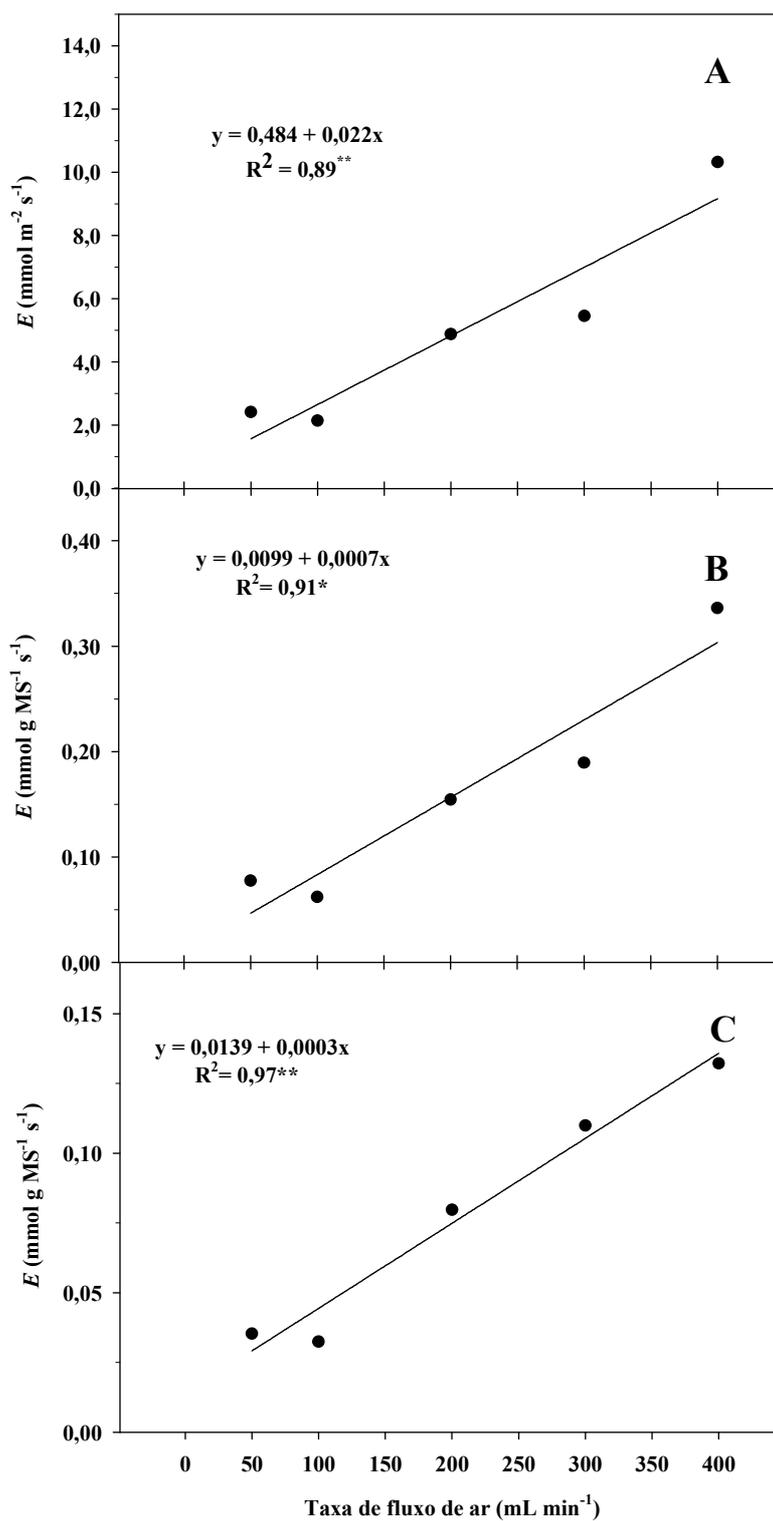


Figura 14. Taxa transpiratória (E) de plântulas de mangaba, cultivadas *in vitro*, em função do aumento da taxa do fluxo de ar e calculada em função da área foliar (A), da matéria seca da folha (B) e da matéria seca da parte aérea (C). O comportamento dos dados é explicado por um modelo linear. Significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.3. Ajuste das condições da umidade relativa do ar de referência

As maiores taxas fotossintéticas tanto nas plântulas *in vitro* de hortelã-do-campo (Figura 15) quanto de mangaba (Figura 16), foram observadas nas medições realizadas com a UR do ar de entrada no tubo em $80 \pm 5\%$, embora essas diferenças não tenham sido significativas, independente do método de cálculo utilizado. A exceção foi verificada em plântulas de mangaba, em que se observou um aumento significativo de 25% na A , em UR de 80 %, em relação a UR de 20%, quando a taxa fotossintética foi calculada em função da área foliar (Figura 16A).

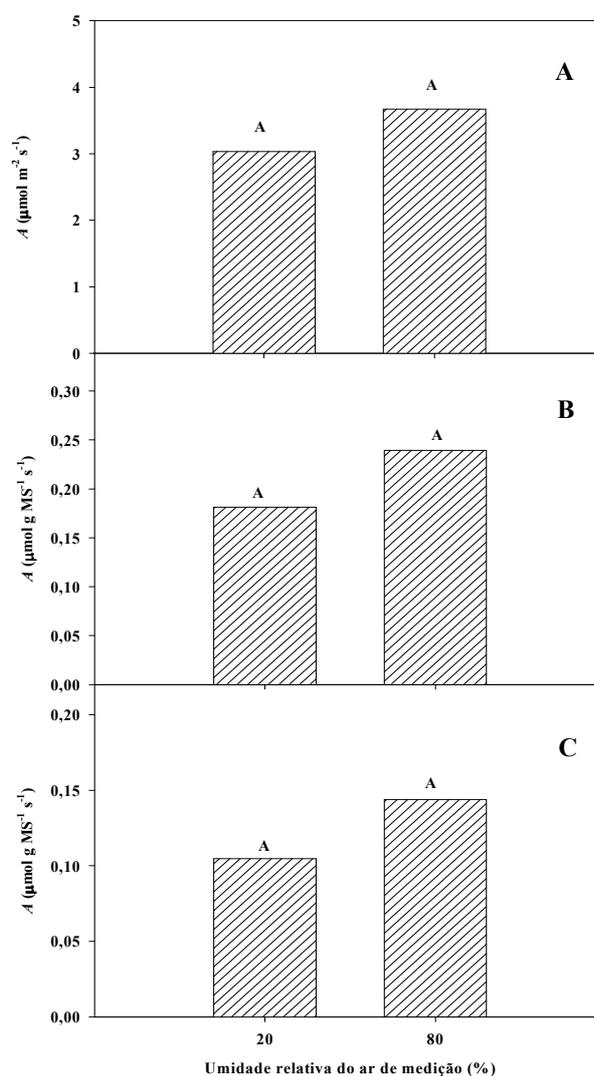


Figura 15. Taxa de assimilação líquida de CO_2 (A - $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de plântulas de hortelã-do-campo, cultivadas *in vitro*, em função da umidade relativa do ar de medição e calculada em função da área foliar (A), da matéria seca da folha (B) e da matéria seca da parte aérea (C). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n=10$.

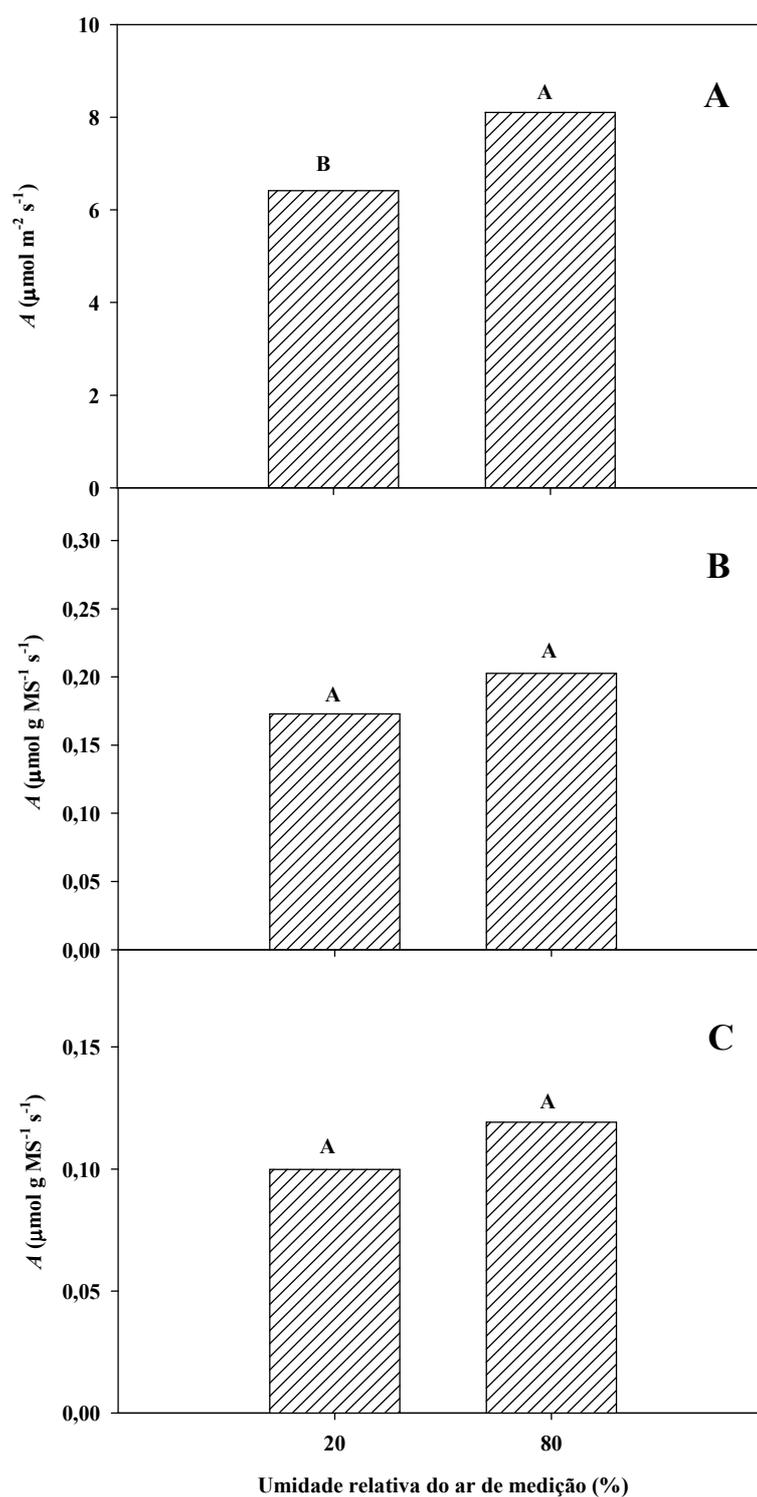


Figura 16. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A - $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de plântulas de mangaba, cultivadas *in vitro*, em função da umidade relativa do ar de medição e calculada em função da área foliar (A), da matéria seca da folha (B) e da matéria seca da parte aérea (C). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n=10$.

Ao contrário do observado na taxa fotossintética, os menores valores da taxa transpiratória foram observados na UR de 80% tanto em plântulas de hortelã-do-campo quanto em plantas de mangaba (Figuras 17 e 18).

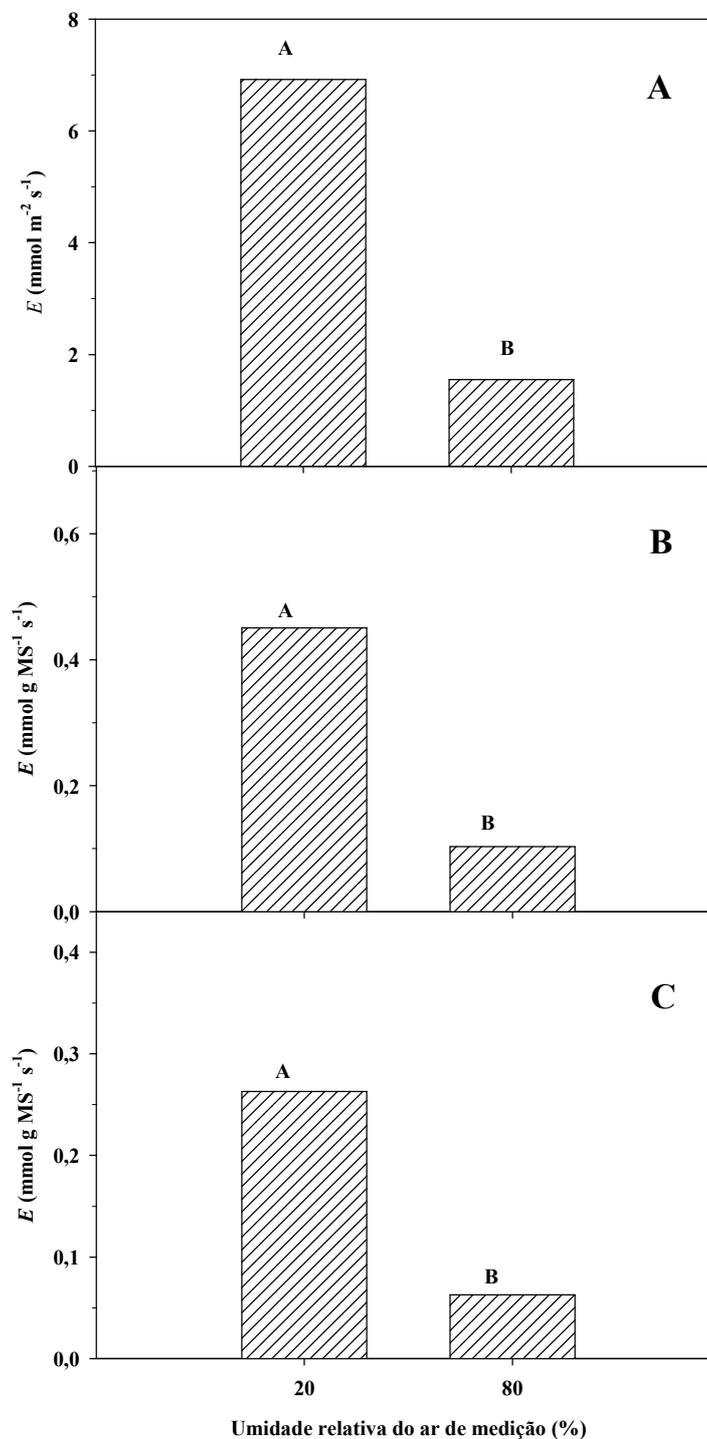


Figura 17. Taxa transpiratória (E) de plântulas de hortelã-do-campo, cultivadas *in vitro*, em função da umidade relativa do ar de medição e calculada em função da área foliar (A), da matéria seca da folha (B) e da matéria seca da parte aérea (C). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n=10$.

Independente da espécie, e do método utilizado no cálculo da taxa transpiratória, observou-se diminuição superior a 75% na UR 80% em relação à UR 20%. Quando a taxa transpiratória foi calculada em função da área foliar, foram observados valores da E maiores do que $13 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em plântulas de mangaba (Figura 18A), enquanto em plântulas de hortelã-do-campo esses valores se mantiveram em torno de $6,9 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figura 17A).

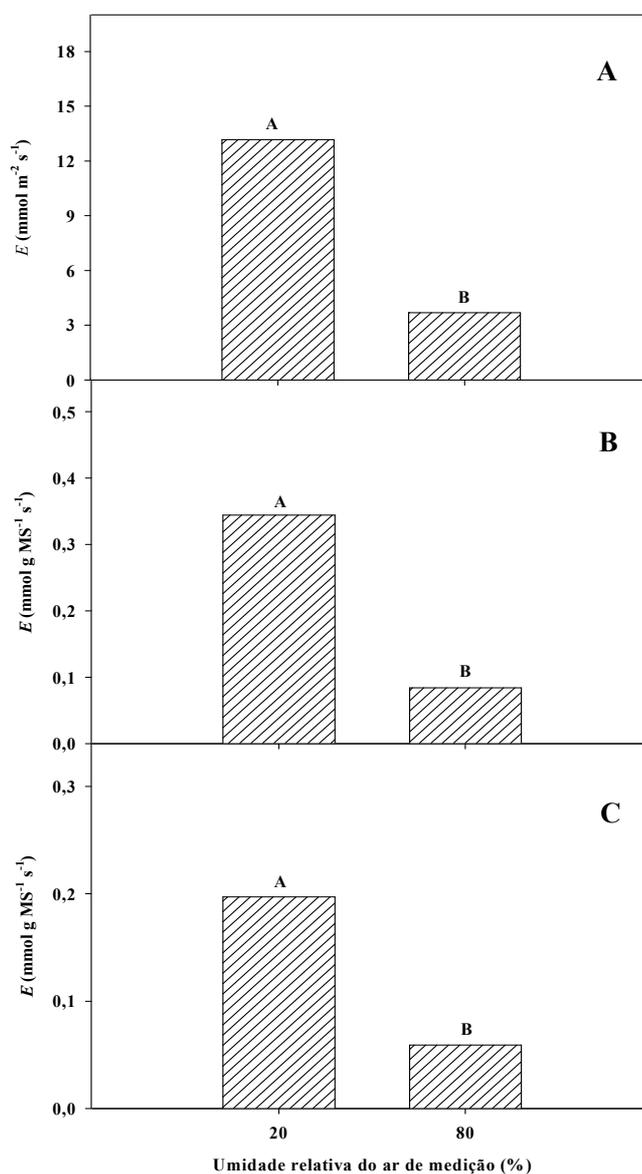


Figura 18. Taxa transpiratória (E) de plântulas de mangaba, cultivadas *in vitro*, em função da umidade relativa do ar de medição e calculada em função da área foliar (A), da matéria seca da folha (B) e da matéria seca da parte aérea (C). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n=10$.

3.4. Avaliações de fluorescência

As avaliações de fluorescência da clorofila em folhas de hortelã-do-campo e de mangaba, previamente adaptadas ao escuro, resultaram em valores de rendimento quântico potencial do FSII (F_v/F_m) em torno de 0,79 para ambas as espécies (Figura 19).

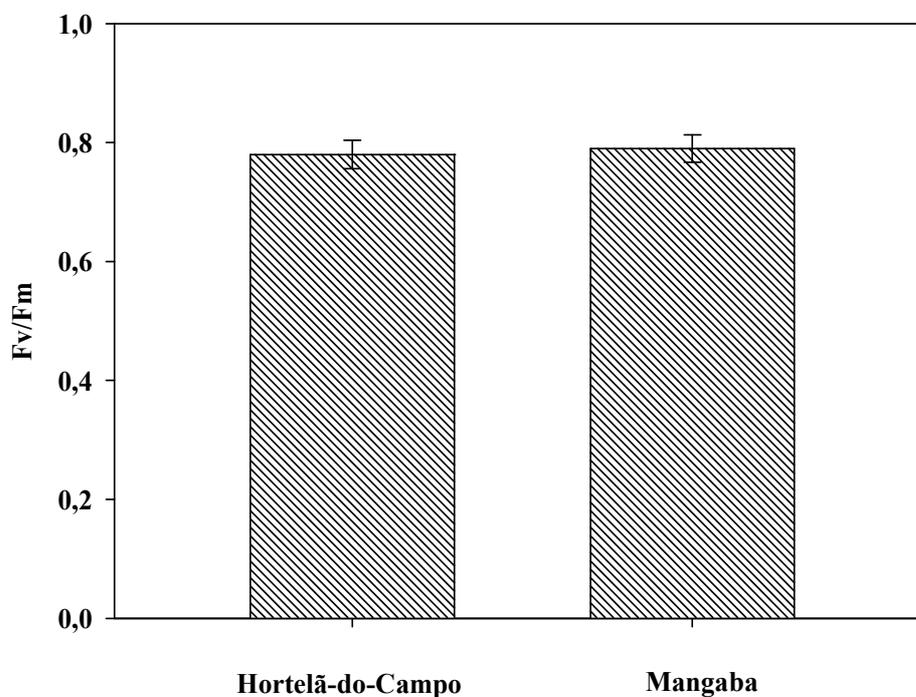


Figura 19. Rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) de plântulas de hortelã-do-campo e de mangaba, cultivadas *in vitro*. Os dados são médias e desvio padrão ($n=10$).

Verificou-se nas curvas de fluorescência que a taxa relativa de transporte de elétrons (ETR), tanto de plântulas de hortelã-do-campo (Figura 20A) quanto de mangaba (Figura 21A), aumentou em função do aumento da densidade de fluxo de fótons (DFF), saturando-se em irradiância de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Este comportamento foi explicado por um modelo de regressão raiz quadrada (Figuras 20A e 21A).

Como esperado, em ambas as espécies, o rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$) diminuiu progressivamente com o incremento da DFF. A partir da irradiância de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a redução do $\Delta F/F_m'$ foi mais acentuada, sendo mais proeminente nas plântulas de mangaba. Em ambas as espécies o comportamento da $\Delta F/F_m'$ em função do aumento da DFF também foi explicado por um modelo de regressão raiz quadrada (Figura 20B e 21B).

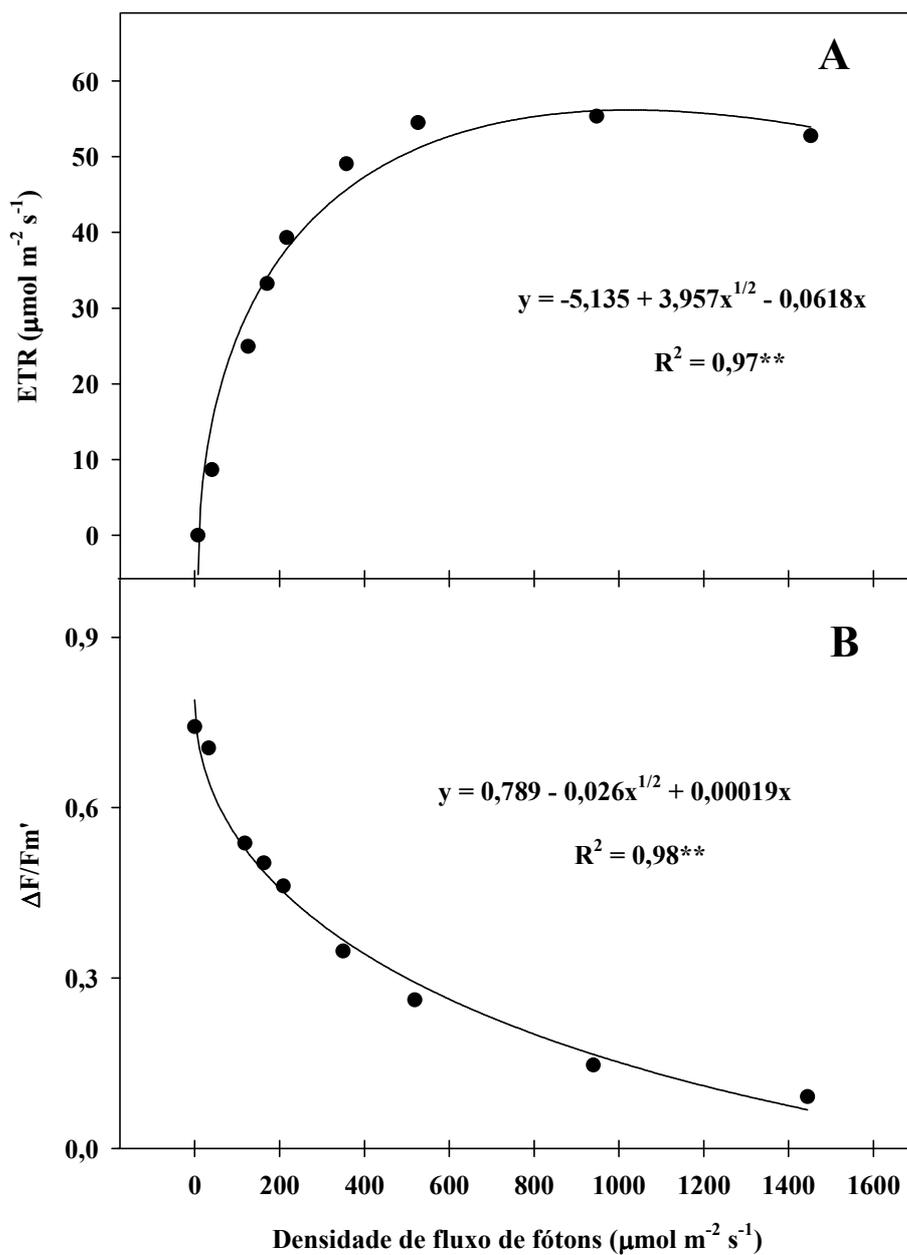


Figura 20. Taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) [A] e rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/Fm'$) [B] de plântulas de hortelã-do-campo, cultivadas *in vitro*, em função do aumento da densidade de fluxo de fótons. Em todas as figuras o comportamento dos dados é explicado por um modelo raiz quadrada ($n=8$). Significância: $**p<0,01$.

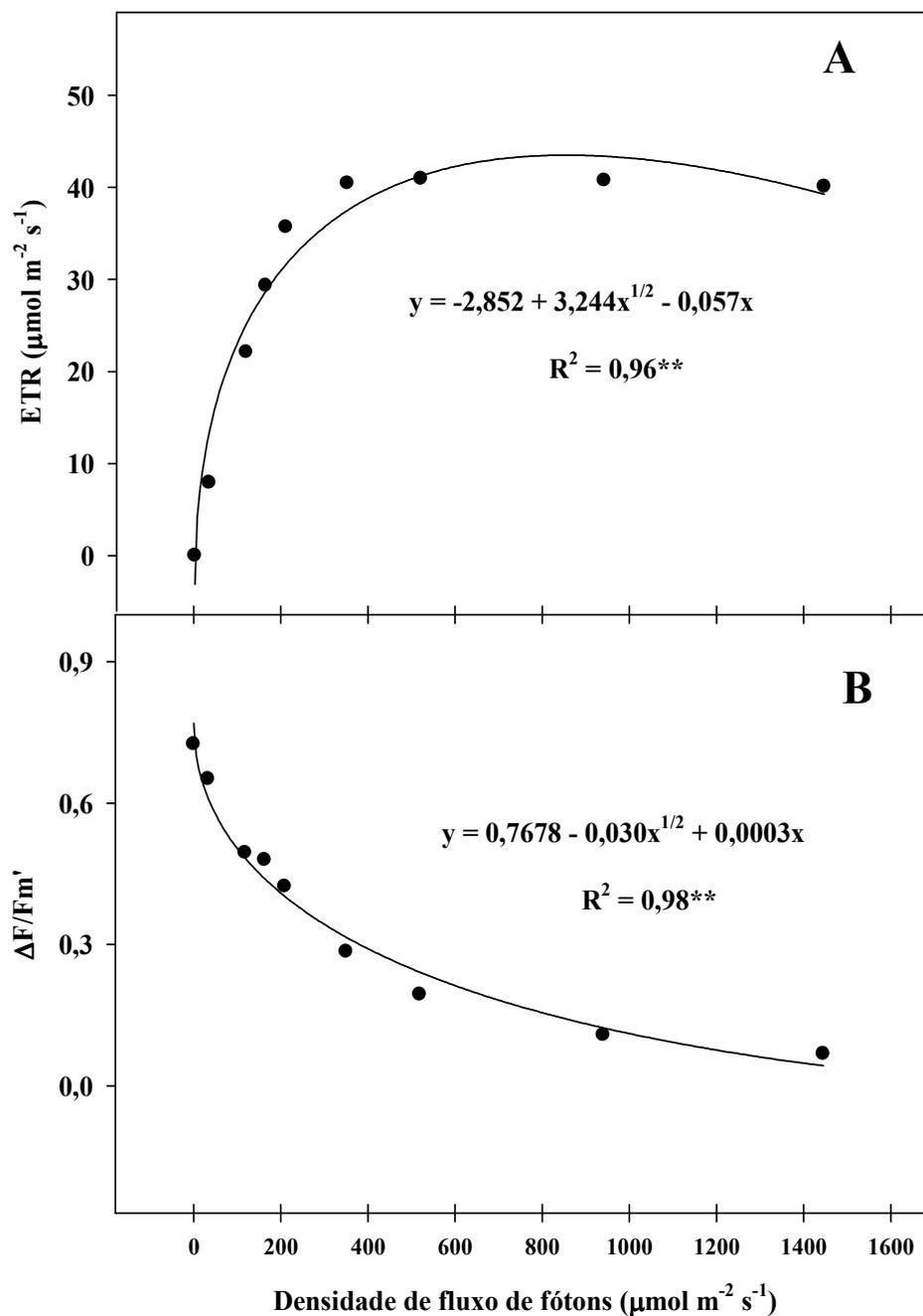


Figura 21. Taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) [A] e rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/Fm'$) [B] de plântulas de mangaba, cultivadas *in vitro*, em função do aumento da densidade de fluxo de fótons. Em todas as figuras o comportamento dos dados é explicado por um modelo raiz quadrada ($n=10$). Significância: $**p<0,01$.

3.5. Protocolo de extração de pigmentos cloroplastídicos

3.5.1. Hortelã-do-campo

Na Tabela 1, é apresentado o resumo da análise de variância dos dados de extração de pigmentos cloroplastídicos em tecidos foliares de hortelã-do-campo. Observa-se que a interação dos fatores “temperatura e horas de incubação” não foi significativa para a maioria das características avaliadas, a exceção ocorreu apenas no índice de feofitinação (IF). No entanto, observou-se o efeito isolado da temperatura em todas as características avaliadas, com exceção do IF. Já o tempo, determinado em horas de incubação, exerceu efeito isolado apenas sobre o conteúdo de Clb e da razão Cla/Clb.

Tabela 1 – Resumo da Análise de Variância dos dados de extração de pigmentos cloroplastídicos de plântulas de hortelã-do-campo, com 50 dias de cultivo *in vitro*, em que Cla (clorofila *a*), Clb (clorofila *b*), Car (carotenoides), Cla/Clb (razão entre clorofila *a* e clorofila *b*), e IF (índice de feofitinação).

| Fonte de Variação | Cla | Clb | Car | Clt | Cla/Clb | IF |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|---------|----|
| Temperatura | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| Horas | ns | ** | ns | ns | ** | ** |
| Temp. x Horas | ns | ns | ns | ns | ns | ** |

ns, não significativo; ** significativo ao nível de 1% pelo teste de *F*.

A maior extração de clorofila *a* (Figura 22 A), carotenoides (Figura 22C), clorofilas totais (Figura 23A) e maior razão Cla/Clb (Figura 23B), foi obtida na temperatura de 25 °C.

Por outro lado, a maior extração de clorofila *b* foi obtida na temperatura de 65 °C (Figura 22B), embora esse acréscimo não tenha ultrapassado 10%. Consequentemente ocorreu diminuição nos valores da razão Cla/Clb, nesta mesma temperatura (Figura 23 B).

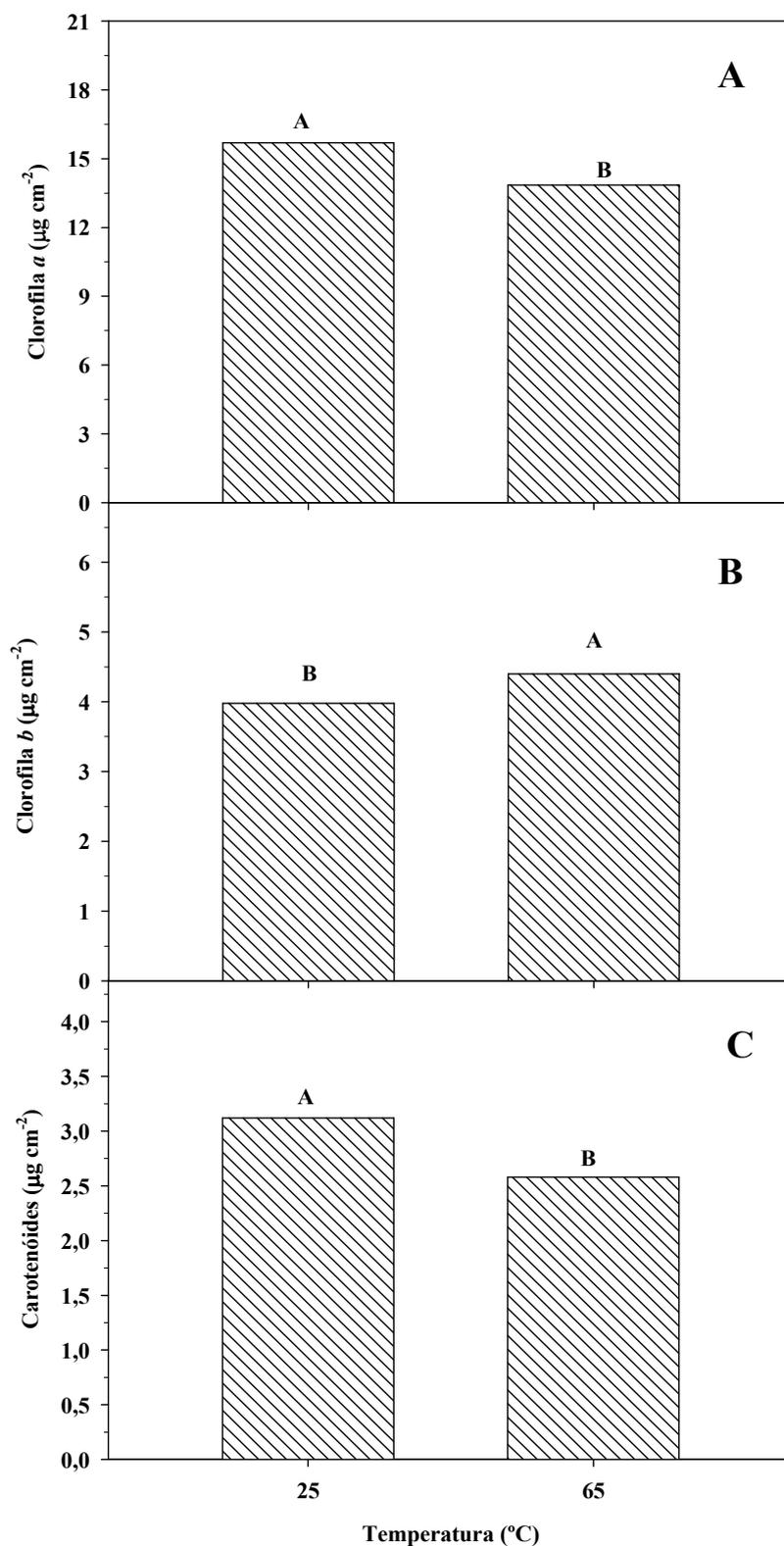


Figura 22. Conteúdo de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) e carotenóides de plantas de hortelã-do-campo cultivadas *in vitro* extraído em duas diferentes temperaturas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n=45$.

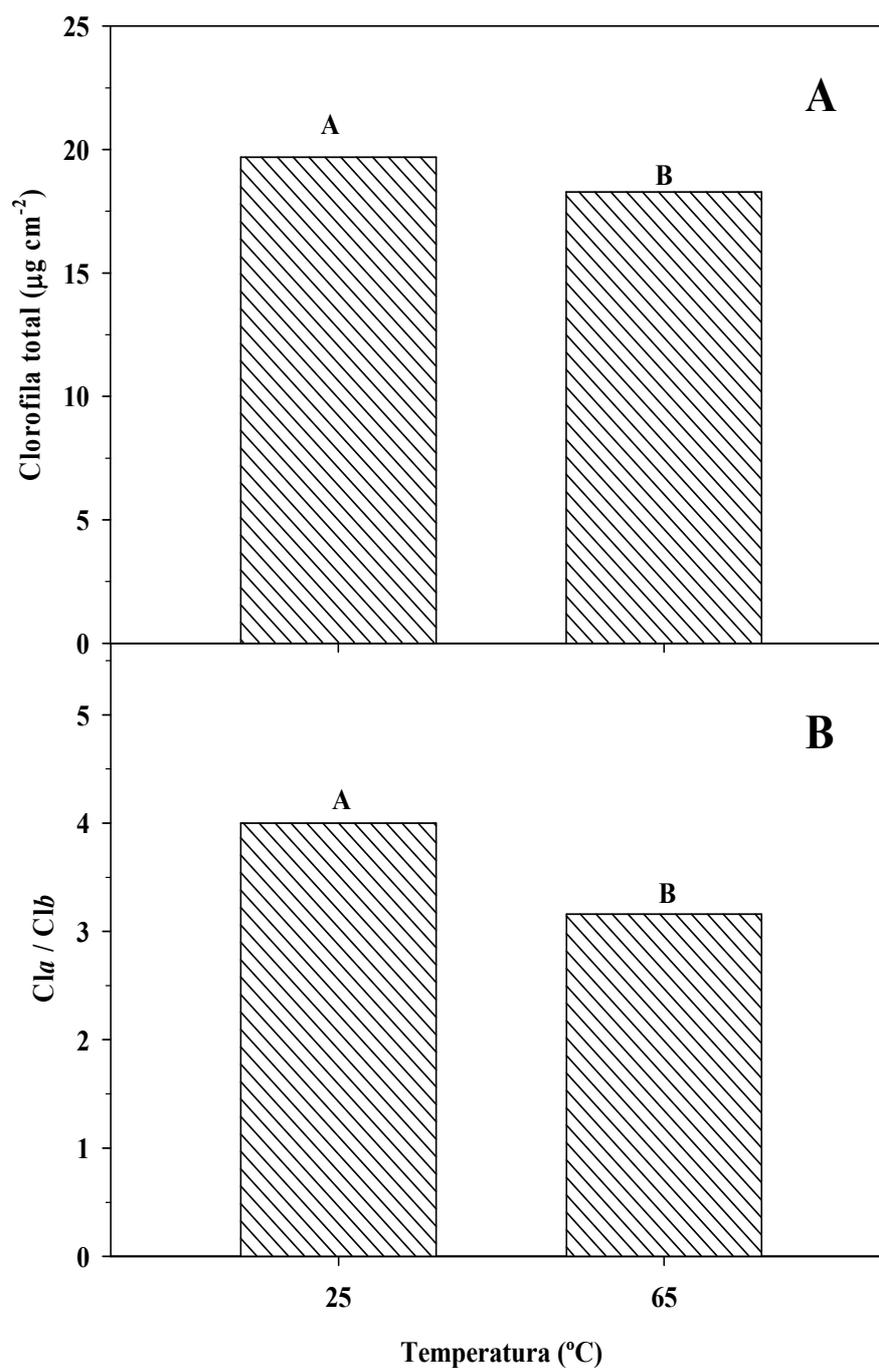


Figura 23. Conteúdo de clorofila total (A), razão entre o conteúdo de clorofila *a* e clorofila *b* (Cla/Clb) (B) de plântulas de hortelã-do-campo cultivadas *in vitro* extraído em duas diferentes temperaturas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n=45$.

Na figura 24A, observa-se que, independente da temperatura, ocorreu aumento na extração da Clb em função do aumento do tempo de incubação. O incremento total foi superior a 30% e esse comportamento foi explicado pelo ajuste de um modelo de regressão raiz quadrada. Ao contrário do observado na Clb, o aumento do tempo de incubação, promoveu diminuições de até 25% na razão Cla/Clb (Figura 24B).

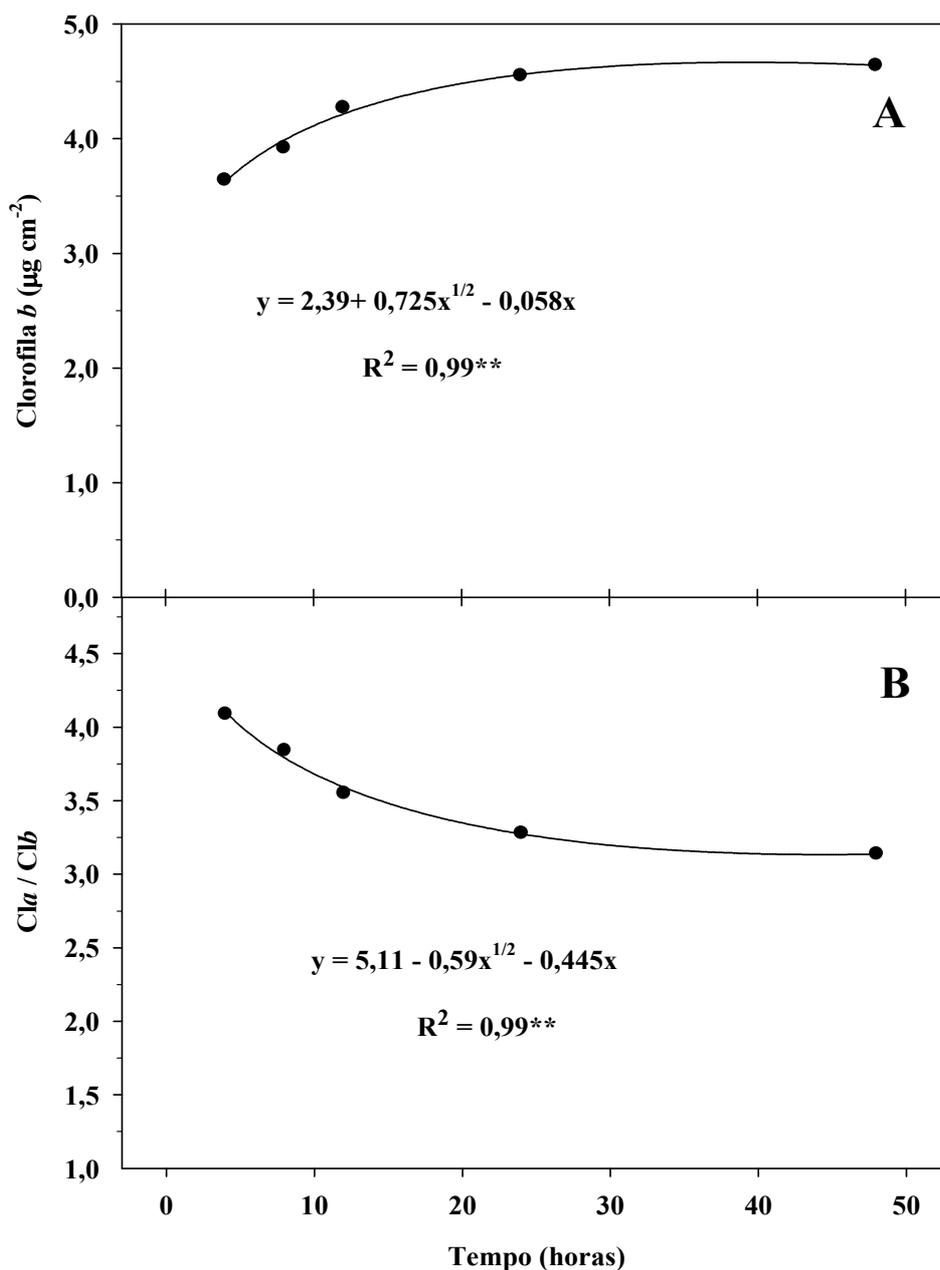


Figura 24. Conteúdo de clorofila *b* (A), razão entre o conteúdo de clorofila *a* e clorofila *b* (Cla/Clb) (B) de plântulas de hortelã-do-campo cultivadas *in vitro* extraídos em diferentes tempos de incubação. O comportamento dos dados é explicado por um modelo raiz quadrada. Os dados são médias de $n=18$. Significância: $**p<0,01$.

Em função do tempo de incubação, observou-se diminuição, embora discreta, no índice de feofitinação em ambas as temperaturas (Figura 25). Estas reduções foram mais pronunciadas na temperatura de 65 °C, ocorrendo diminuição de até 14%, enquanto na temperatura de 25 °C, essa diminuição não alcançou 5%.

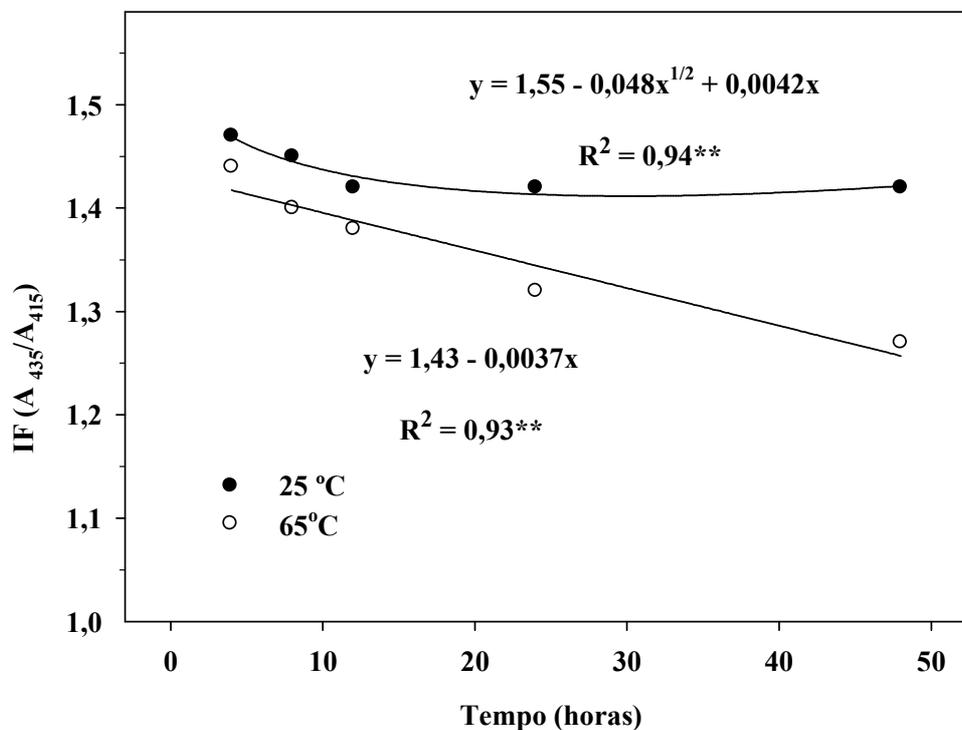


Figura 25. Índice de feofitinação (IF) de clorofilas de plântulas de hortelã-do-campo, cultivadas *in vitro*, e extraídas em duas temperaturas e em diferentes tempos de incubação. Em A e B o comportamento dos dados é explicado por um modelo raiz quadrada para a temperatura de 25 °C, e por um modelo linear para a temperatura de 65 °C. Os dados são médias de $n=9$. Significância: $**p<0,01$.

3.5.2. Mangaba

Na Tabela 2, é apresentado o resumo da análise de variância dos dados de extração de pigmentos cloroplastídicos em tecidos foliares de mangaba *in vitro*. Semelhante ao observado em plântulas de hortelã-do-campo, a interação dos fatores “temperatura e horas de incubação” não foi significativa para a maioria das características avaliadas, e a exceção ocorreu, também, apenas para o índice de feofitinação (IF).

No entanto, diferente do observado em hortelã-do-campo, a temperatura como efeito isolado, afetou apenas o conteúdo de *Clb* e conseqüentemente também a razão *Cl*/*Clb*. Já o tempo de incubação afetou apenas a razão *Cl*/*Clb*.

Tabela 2 – Resumo da Análise de Variância dos dados de extração de pigmentos cloroplastídicos de plântulas de mangaba, com 50 dias de cultivo *in vitro*, em que *Cl* (clorofila *a*), *Clb* (clorofila *b*), *Car* (carotenoides), *Cl*/*Clb* (razão entre clorofila *a* e clorofila *b*), e IF (índice de feofitinação).

| Fonte de Variação | <i>Cl</i> | <i>Clb</i> | <i>Car</i> | <i>Cl</i> | <i>Cl</i> / <i>Clb</i> | IF |
|-------------------|-----------|------------|------------|-----------|------------------------|----|
| Temperatura | ns | * | ns | ns | ** | ** |
| Hora | ns | ns | ns | ns | ** | ** |
| Temp. x Hora | ns | ns | ns | ns | ns | ** |

ns, não significativo; ** significativo ao nível de 1% pelo teste de *F*; * significativo ao nível de 5% pelo teste de *F*.

O maior conteúdo de *Clb* foi extraído em plântulas incubadas a 65 °C (Figura 26A), e ao contrário, a menor razão *Cl*/*Clb* foi observada também nesta temperatura (Figura 26B).

Assim como em hortelã-do-campo, o aumento do tempo de incubação, promoveu diminuições na razão *Cl*/*Clb* em mangaba, neste caso a redução chegou até a 12% (Figura 27A).

Em função do tempo de incubação se observou diminuição, embora discreta, no índice de feofitinação em ambas as temperaturas (Figura 27B). No entanto, estas reduções foram mais pronunciadas na temperatura de 65 °C, ocorrendo diminuição de até 14%, enquanto na temperatura de 25 °C, essa diminuição não alcançou 5%.

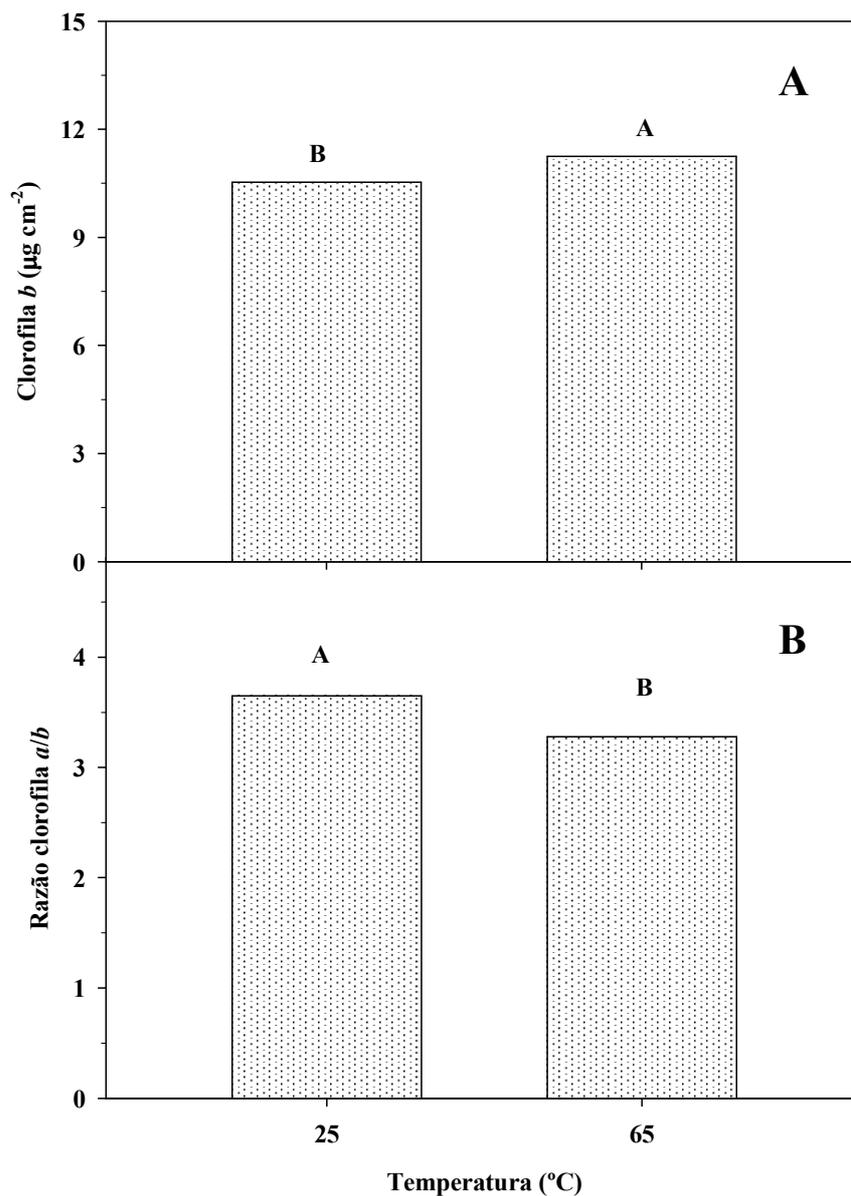


Figura 26. Conteúdo de clorofila *b* (A) e razão *ca/clb* (B) de plantas de mangaba cultivadas *in vitro* extraído em duas diferentes temperaturas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n=60$.

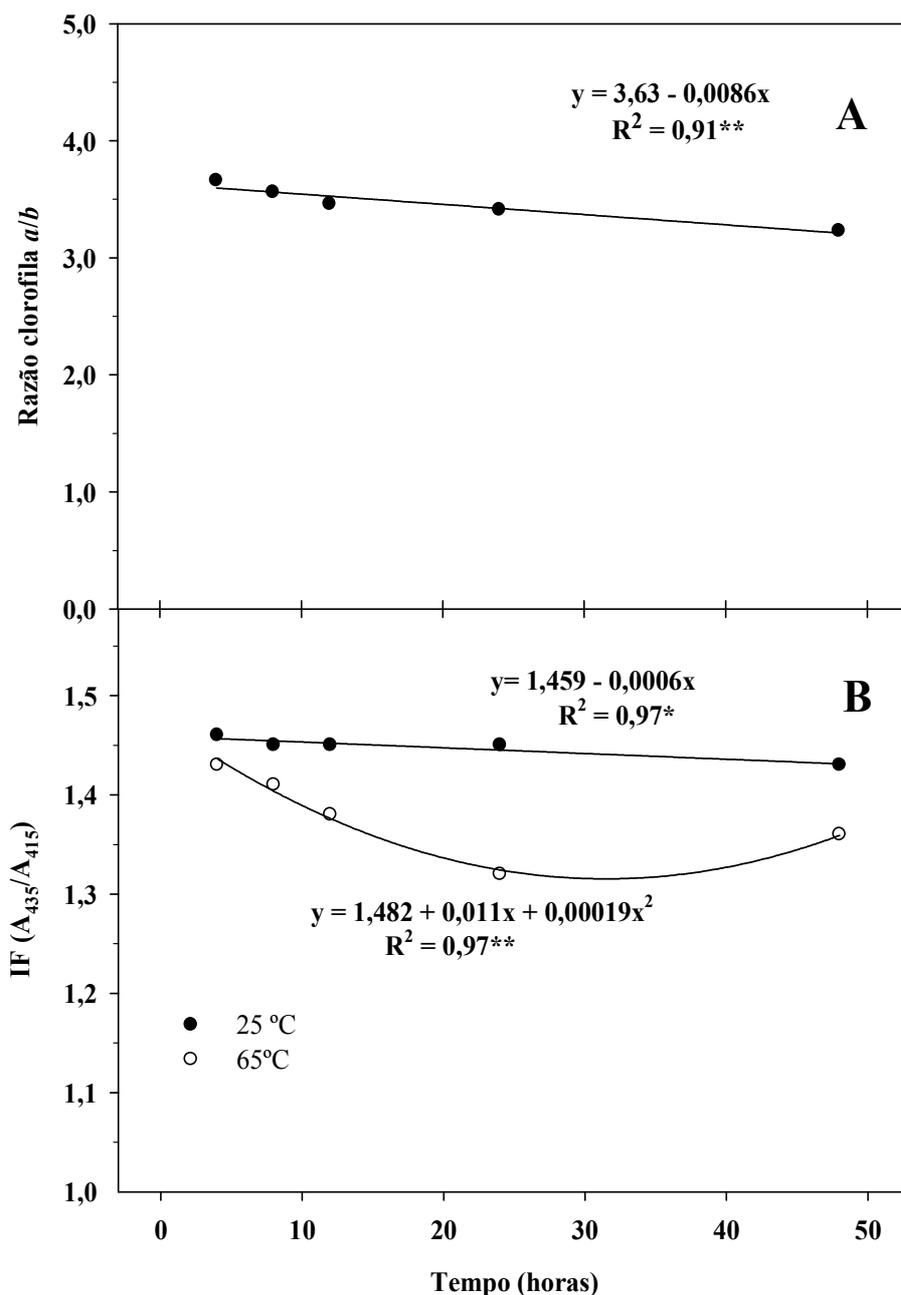


Figura 27. Razão entre o conteúdo de clorofila *a* e clorofila *b* em diferentes tempos de incubação (*Cl*_{*a*}/*Cl*_{*b*}) [A] e índice de feofitinação (IF) de clorofilas em duas temperaturas e em diferentes tempos de incubação [B], extraídas de plântulas de mangaba, cultivadas *in vitro*. O comportamento dos dados de razão *Cl*_{*a*}/*Cl*_{*b*} é explicado por um modelo linear ($n=24$). O comportamento dos dados de IF é explicado por um modelo linear na temperatura de 25 °C, e por um modelo quadrático para a temperatura de 65 °C ($n=12$). Significância: * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

4. DISCUSSÃO

De modo geral, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, verificou-se que as plântulas *in vitro* possuem aparato fotossintético funcional.

Quanto aos dados obtidos pela curva de luz, verificaram-se taxas fotossintéticas positivas mesmo em baixas irradiâncias, como observado na DFF de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Esta irradiância inclusive é utilizada na sala de crescimento na maioria dos laboratórios de cultura de tecidos vegetais. Além de funcional, os resultados permitem verificar que o aparato fotossintético destas plantas responde às DFFs consideravelmente elevadas, uma vez que o ponto de saturação luminoso (PSL), para ambas as espécies ocorreu em 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. E também são coerentes com o PSL de outras espécies cultivadas *in vitro*, Viña et al. (1999), em estudo com plântulas de *Persea americana* Mill., cultivadas *in vitro*, e em condições de crescimento semelhante às conduzidas neste trabalho, constatou o PSL desta plântula em 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Resultado semelhante também foi encontrado em plântulas de *Asparagus officinalis* L. com cinco semanas de cultivo *in vitro*, cujo PSL se estabilizou em 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (De YUE et al., 1991). No entanto, alterações no PSL podem ocorrer em função das condições de cultivo *in vitro*. No caso de plântulas de *Actinidia deliciosa*, com 40 dias de cultivo *in vitro*, com baixo conteúdo ou ausência total de sacarose, o PSL estabilizou em 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (ARIGITA et al., 2002). É importante ressaltar ainda, que a irradiância de crescimento destas plântulas foi de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, metade da encontrada no PSL.

Os valores de DFF que saturaram a taxa fotossintética em hortelã-do-campo e mangaba cultivadas *in vitro*, neste estudo são semelhantes aos de algumas espécies lenhosas e arbustivas de cerrado, em condição de campo, cujos pontos de saturação luminoso estão em torno de 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PALHARES et al., 2010).

As taxas fotossintéticas no PSL das plântulas de mangaba *in vitro* deste estudo, também se assemelham àquelas verificadas em plantas da mesma espécie cultivadas em condições *ex vitro*. Em avaliações da taxa fotossintética de mudas de mangaba com 98 dias de cultivo, em diferentes adubações fosfatadas, Vieira Neto (2010), encontrou resultados de *A* entre 8,9 e 12,4 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Valores próximos a estes também foram encontrados por LOBO et al. (2008) em mangabeiras adultas submetidas a tratamento com imposição ou ausência de irrigação.

Em irradiâncias de saturação, o processo fotoquímico não é limitado e a taxa fotossintética começa a se estabilizar. Incrementos na DFF não afetam mais as taxas de fotossíntese, sendo que fatores tais como, a atividade da rubisco, e o metabolismo das trioses fosfato tornam os fatores limitantes a novos incrementos na fotossíntese (LAMBERS et al., 2008; MELIS, 2009).

Os resultados do ponto de saturação luminoso, observados na curva de luz nas condições deste estudo, retratam a fotossíntese líquida potencial, com respostas de curto prazo não indicando necessariamente que estas espécies devam crescer sob altas DFF, visto que níveis elevados de irradiância, tal como os verificados no PSL destas plântulas, por longos períodos, podem levar à fotoinibição. Por outro lado, os dados obtidos nesses pontos extremos das curvas permitem ampliar as respostas do desempenho fotossintético das plantas e assim caracterizar mais claramente as diferenças entre tratamentos.

Embora nenhum modelo de regressão tenha sido significativo para explicar o comportamento fotossintético das plântulas de mangaba em função da variação da taxa de fluxo do ar através do tubo, observou-se que os valores extremos dessa variável (50 e 400 mL min⁻¹), resultaram nos menores valores médios de taxa fotossintética. Além disso, observou-se que em taxas de fluxo inferiores a 100 mL min⁻¹, ocorreram instabilidades de leitura, possivelmente por causa das perdas de sinal elétrico do sensor.

Em grande parte dos trabalhos publicados sobre avaliação de taxa fotossintética *in vitro* não há a especificação da taxa de fluxo de ar utilizado, mas nas poucas citações, observa-se uma grande variação das taxas de fluxo aplicadas. Em procedimento em que se destacou a folha de *Cocos nucifera* e a retirou parcialmente do tubo para avaliação da fotossíntese, adotaram taxa de fluxo de 140 mL min⁻¹ na câmara de medição (Triques et al., 1997). Em procedimento semelhante, Fila et al. (2006), utilizaram taxa de fluxo de 330 mL min⁻¹ em medições de plântulas de videira. Em sistemas que utilizam câmaras adaptadas para medição de fotossíntese em tubos de ensaio, Matysiak e Nowak (1994) em avaliações de plântulas de *Homalomena* cv 'Emerald Gem', e Alexandre (2006) em plântulas de *Passiflora edulis* cultivadas *in vitro*, utilizaram taxas de fluxo de 300 mL min⁻¹. Também Viña et al. (1999) utilizando câmara adaptada relataram a utilização de taxas de fluxo de 420 mL min⁻¹ em avaliações de *Persea americana*. Embora o manual do fabricante (Qubit Systems, 2009) recomende a utilização de taxa de fluxo de 500 mL min⁻¹ para avaliação das trocas gasosas em plantas em condições *ex vitro*, em testes preliminares (resultados não demonstrados) em taxas de fluxo maiores do que 400 mL

min^{-1} não foi obtida a estabilidade necessária nas características avaliadas na câmara de medição *in vitro*.

Apesar de ajustados modelos de regressão que explicassem o comportamento da taxa transpiratória em função do aumento das taxas de fluxo de ar, estas respostas não refletem o comportamento fisiológico das plântulas. O incremento da taxa transpiratória observada nesse estudo, provavelmente está relacionada ao arraste de vapor d'água promovido pelos fluxos elevados. A principal evidência deste fato estava associada ao acúmulo de vapor d'água nas mangueiras de conexão entre os sensores do equipamento quando se trabalhou com altas taxas de fluxo. Taxas de fluxo entre 100 e 300 mL min^{-1} demonstraram ser as mais indicadas para as medições de taxa fotossintética, por promoverem os maiores valores médios de taxa fotossintética, sem contudo, proporcionar grandes perturbações na atmosfera do tubo de crescimento das plântulas.

Nas condições em que esse estudo foi realizado, não foram observadas diferenças significativas na taxa fotossintética de plântulas de hortelã-do-campo entre as duas umidades relativas testadas. No entanto, as maiores médias da taxa fotossintética, foram sempre observadas no tratamento de UR 80%. Em mangaba, esse comportamento se confirmou, principalmente quando a taxa fotossintética foi calculada em função da área foliar ocorrendo diferença significativa estatisticamente.

A maior taxa fotossintética observada nas avaliações utilizando o ar com UR 80% possivelmente está relacionada a uma menor perturbação e dessecação da atmosfera do tubo de crescimento das plântulas. A UR de 80% é a que mais se aproxima da umidade relativa da atmosfera *in vitro*. Segundo Kozai et al. (2005), a umidade dentro do frasco de cultivo *in vitro* é geralmente alta, variando entre 80 a 100%. Embora plantas *in vitro* sejam caracterizadas por não desenvolverem camadas de cera epicuticular, nem estômatos funcionais (CAPELLADES, 1990; ZOBAYED et al., 2001) possivelmente sob UR 20% o alto déficit de pressão de vapor ocasionou a inibição da taxa fotossintética por fechamento dos estômatos, semelhantemente ao que ocorre em plantas *ex vitro*. De acordo com Shirke e Parthre (2004), há um declínio relevante na condutância estomática e, portanto, na fotossíntese líquida sob altos índices de déficit de pressão de vapor.

Neste estudo, a taxa transpiratória das plantas *in vitro* alcançou valores de até 13 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em UR 20%, valores estes, bem acima daqueles observados em plantas *ex vitro*. As taxas transpiratórias extremamente elevadas em plantas submetidas a fluxos

com UR 20% se devem, no entanto, mais as diferenças no déficit de pressão de vapor promovido no ambiente de crescimento das plantas por ocasião da medição, do que necessariamente a perda de água pelas folhas. Tal resultado foi superestimado em decorrência da taxa transpiratória que se baseia nesta variável, porque segundo Kozai et al. (2005), a taxa transpiratória é proporcional ao déficit de pressão de vapor. Isto pode ser confirmado ao comparar as plantas de hortelã-do-campo com mangaba. Embora a primeira possua maiores valores de área foliar, as maiores taxas transpiratórias foram verificadas em tubos de ensaio contendo mangaba. Nestas plantas evidências demonstram que a quantidade de água livre na atmosfera do tubo é nitidamente menor em relação ao tubo de crescimento *in vitro* de hortelã-do-campo.

A alta umidade relativa da atmosfera do tubo de crescimento das plantas, associada ao arraste de água livre pelo fluxo de ar no tubo, contribuíram para o acúmulo de vapor d'água nas mangueiras de conexão dos sensores do equipamento. Esta condição provavelmente levou a superestimativas da taxa transpiratória. De forma mais proeminente, esta condição levou a valores da condutância estomática, completamente adversos e instáveis, não sendo possível nem mesmo interpretá-los. Decorrente desta situação, os dados de condutância estomática foram descartados neste estudo.

Foram observadas respostas similares quando as taxas fotossintética e transpiratória foram calculadas tanto com base na área foliar quanto na matéria seca foliar e ou na matéria seca da parte aérea, especialmente em plântulas de hortelã-do-campo. Em mangaba, os cálculos com base na área foliar se mostraram um indicador mais sensível da taxa fotossintética. A base mais satisfatória para expressar a taxa fotossintética aparentemente é a área foliar (KRAMER e KOSLOWSKY, 1979). Segundo Lambers et al. (2008), a taxa fotossintética por unidade de área foliar deve ser superior para folhas de sol se comparadas com folhas de sombra, enquanto a fotossíntese é praticamente similar quando baseada na massa seca. Folhas de sol, geralmente por serem mais espessas do que folhas de sombra possuem mais cloroplastos por unidade de superfície, sendo assim esperado que essas folhas tenham maior taxa de assimilação líquida de CO₂ por área (DA MATTA et al., 2001). Deste modo o cálculo da taxa fotossintética com base em determinada unidade deve levar em consideração as condições ambientais as quais as plantas estão expostas. O cálculo da taxa fotossintética com base na massa seca, principalmente na matéria seca foliar, pode representar uma alternativa, quando não há a disponibilidade de mecanismos precisos que possibilitem a medição da área foliar, ou a configuração das folhas não é favorável

para tal procedimento, como argumentado por De Yue et al. (1992), em avaliação de taxa fotossintética com plântulas de *Asparagus officinalis* L.

O rendimento quântico máximo do fotossistema II, estimado pela razão F_v/F_m , indica a dissipação fotoquímica de energia e expressa a eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos do FS II (KRAUSE e WEISS, 1991; BAKER, 2008). Segundo Bolhàr-Nordenkamp et al. (1989), quando uma planta não está submetida ao estresse, a razão F_v/F_m deve variar entre 0,75 a 0,85. A razão F_v/F_m (0,79) das plântulas de hortelã-do-campo e de mangaba neste estudo, indicam portanto, que as mesmas, apesar das condições limitantes do ambiente de cultivo *in vitro*, possuem aparato fotossintético capaz de capturar energia luminosa e transferir para processos fotossintéticos.

Segundo Mohamed et al. (1995), a ETR aumenta conforme a intensidade de luz, até que ocorra a saturação dos carreadores de elétrons. Em alguns casos a curva de ETR pode estar correlacionada à taxa fotossintética máxima, apresentando o mesmo padrão da curva de assimilação de CO_2 . Neste estudo os resultados obtidos das curvas de ETR mostraram coerentes com as curvas da taxa fotossintética em ambas as espécies, em que os pontos de saturação se situaram próximos a $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Relação entre curva de ETR e curva A/I como a observada neste estudo foi também observada por Dai et al. (2009), na espécie herbácea *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg sob condições contrastantes de irradiâncias em casa de vegetação.

A redução do rendimento quântico efetivo do FS II ($\Delta F/F_m'$) em função do incremento da densidade de fluxo de fótons, especialmente a partir da irradiância de saturação da taxa relativa de transporte de elétrons (ETR), representa um comportamento típico para estas curvas, indicando que nem todos os elétrons envolvidos nos processos fotoquímicos são de fato utilizados para a fixação de CO_2 . Em condições em que a fixação de CO_2 é limitada, o fluxo de elétrons pode ser redirecionado a outras vias bioquímicas, tais como a redução do oxigênio (O_2 , reação de Mehler) e a fotorrespiração (BUSSOTI et al., 2011).

Os resultados obtidos para extração de pigmentos cloroplastídicos dos tecidos foliares indicaram que a temperatura exerceu influência mais acentuada que o tempo de incubação. Em hortelã-do-campo a temperatura de 25°C se mostrou mais satisfatória em relação à temperatura de 65°C para a extração de clorofila *a* e de carotenoides. De acordo com Santos et al. (2008), plantas desenvolvidas *in vitro*, em virtude de possuírem pequena espessura da lâmina foliar e baixos níveis de cutinização, não

necessitam de tempo prolongado de extração, nem de temperaturas maiores que a ambiente na incubação das amostras foliares para que se tenha eficiência no processo de extração sem degradação de pigmentos foliares. No entanto, neste estudo, houve incremento da extração de clorofila *b* em temperatura de 65°C, tanto em hortelã-do-campo quanto em mangaba, sendo que em hortelã-do-campo o aumento do tempo de exposição das amostras também promoveu acréscimos na extração deste pigmento. Segundo Johnson-Flanagan e Thiagarajah (1990) a clorofila *b* é menos sensível à degradação que a clorofila *a*. A estabilidade da clorofila *b* se deve ao efeito atrativo de elétrons de seu grupo aldeído no C-3 (VON ELBE, 2000; STREIT et al., 2005). No entanto, os resultados de clorofila *b* foram apenas 9,5% superiores na temperatura de 65 °C, se comparada à temperatura de 25 °C.

Em contrapartida, a incubação das amostras de hortelã-do-campo por período de tempo prolongado na temperatura de 25 °C otimizou a extração de clorofila *b*, sem contudo, causar degradação significativa dos demais pigmentos cloroplastídicos. Para esta espécie houve interação da temperatura de extração e do tempo de incubação para o índice de feofitinação. Apesar da redução do IF a partir de 8 horas de incubação a 25° C, os valores para este índice se mantiveram adequados, mesmo com o aumento do tempo de exposição até 48 horas. Segundo Ronen e Galun (1984), a redução do IF a valores muito menores que 1,40 é indicativo da degradação das clorofilas, especialmente da clorofila *a*.

Em mangaba os conteúdos de clorofila *a* e de carotenoides não sofreram efeito da temperatura e do tempo de incubação. No entanto, maiores extrações de clorofila *b* ocorreram na temperatura de 65 °C. A presença de material latescente nas folhas possivelmente pode explicar a menor extração deste pigmento em amostras incubadas a 25 °C.

A interação entre os fatores temperatura e tempo de incubação, para o índice de feofitinação, indicou reduções mais drásticas deste índice em períodos de incubação superiores a 12 horas na temperatura de 65° C.

De acordo com os resultados observados a temperatura de 65 °C e tempos de incubação de até 12 horas propiciaram extrações de clorofila *b* satisfatória, sem contudo, provocar a redução na extração dos demais pigmentos cloroplastídicos.

Os maiores valores de pigmentos cloroplastídicos observados nas plântulas de mangaba justificam a maior taxa fotossintética desta espécie se comparadas às plântulas

de hortelã-do-campo, visto que estes pigmentos estão intimamente relacionados ao processo de captação da energia luminosa.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo comprovam que as plântulas de hortelã-do-campo e de mangaba cultivadas *in vitro*, possuem aparato fotossintético funcional, e além disso, respondem às variações das condições de medição, exibindo valores consideráveis de taxa de assimilação de CO₂ sob condições de irradiância de saturação.

O conjunto analisador de gases no infravermelho adotado neste estudo foi sensível às respostas de assimilação de CO₂ em plântulas de hortelã-do-campo e de mangaba cultivadas *in vitro*, e potencialmente pode ser adaptado para medições das trocas gasosas *in vitro*.

As melhores respostas na avaliação da taxa fotossintética das plântulas *in vitro* foram obtidas nas seguintes condições: densidade de fluxo de fótons em 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; taxas de fluxo do ar de entrada no tubo entre 100 e 300 mL min⁻¹; umidade relativa do ar de entrada no tubo de crescimento das plântulas em 80%, levando-se em consideração que as medições foram executadas sob temperatura de 25 ± 1°C.

Ainda são necessários ajustes para medições coerentes da taxa transpiratória e da condutância estomática nas condições em que se considera o ambiente de crescimento de plântulas, neste caso o tubo de ensaio, como sendo a própria câmara de medição.

A adaptação do ambiente de medição permitiu obter medidas confiáveis e coerentes da fluorescência da clorofila *a* nas plântulas. Estas avaliações confirmaram a habilidade fotossintética das plantas neste estudo, inclusive a curva de taxa relativa de transporte de elétrons teve padrão semelhante à curva de resposta de assimilação de CO₂ em função da DFF, obtida por meio do IRGA.

A extração de pigmentos cloroplastídicos para estas espécies, utilizando o solvente DMSO, foi adequada. Os dados confirmaram comportamentos distintos entre as espécies em relação à influência da temperatura e do tempo de incubação na extração de pigmentos. Em hortelã-do-campo, a temperatura de 25°C, e períodos de incubação entre 24 e 48 horas, tiveram resultados mais satisfatórios. Em mangaba, no entanto, a temperatura de incubação de 65° C, por períodos menores de tempo, 4 a 12 horas, promoveram as maiores extrações e os menores índices de degradação de pigmentos.

As metodologias propostas neste trabalho para hortelã-do-campo e mangaba se mostraram sensíveis às respostas fotossintéticas e podem se estender, com pequenos ajustes, a outras espécies cultivadas *in vitro*, inclusive outras plantas nativas do cerrado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, R. S. Fatores de estresse na germinação de sementes e na propagação *in vitro* de *Passiflora edulis* SIMS f. *flavicarpa* DEGENER. 2006. 166f. **Tese** (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2006.

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

BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A probe a photosynthesis *in vivo*. **Annual Review of Plant Biology**, 59, p.89-113. 2008.

BJÖRKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, 170, p.489–504. 1987.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LONG, S. P., BAKER, N. R., et al. Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. **Functional Ecology**, 3, p.497-514, 1989.

BUSSOTI, F.; DESOTGIU, R.; CASCIO, C.; POLLASTRINI, M.; GRAVANO, E.; GEROSA, G.; MARZUOLI, R.; NALI, C.; LORENZINI.; SALVATORI, E.; MANES, F.; SCHAUB.; STRASSER, R. J. Ozone stress in woody plants assessed with chlorophyll *a* fluorescence. A critical reassessment of existing data. **Environmental and Experimental Botany**, 73, p.19-30, 2011

CAPELLADES, M. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. **Journal American Society Horticulture Science**, 115, p.141-145, 1990.

CASSANA, F. F.; FALQUETO, A. R.; BRAGA, E. J. B.; PETERS, J. A.; BACARIN, M .A. Chlorophyll *a* fluorescence of sweet potato plants cultivated *in vitro* and during *ex vitro* acclimatization. **Brazilian Journal Plant Physiology**, 22(3), p.167-170, 2010.

CHEN, C. *In situ* measurement of microclimate for the plantlets cultured *in vitro*. **Biosystems Engineering**, 95(3), p.413–423, 2006.

CHRISTOV, I.; STEFANOV, D.; VELINOV, T.; GOLTSEV, VASILII.; GEORGIEVA, K.; ABRACHEVA, P., GENOVA, Y.; CHRISTOV, N. Study on symptomless leaf infection in grapevine plants grown *in vitro* with grapevine leafroll associated virus 3. **Journal Plant of Physiology**, 164, p.1124-1133, 2007.

COHEN, K.O.; SANO, S. M. Parâmetros físico-químicos dos frutos de mangabeira. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Cerrados**, 10p. 2010

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1931.

DAI, Y.; SHEN, Z.; LIU, Y.; WANG, L.; HANNAWAY, D.; LU, H. Effects of shade treatments on the photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence, and chlorophyll content of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg. **Environmental and Experimental Botany**. 65, p.177-182, 2009.

DA MATTA, F. M.; LOOS, R. A.; RODRIGUES, R.; BARROS, R. S. Actual and potential photosynthetic rates of tropical crop species. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 13(1), p.24-32, 2001.

DE YUE, Y. D.; DESJARDINS, Y.; LAMARRE, M.; GOSSELIN, A. Photosynthesis and transpiration of *in vitro* cultured asparagus plantlets. **Scientia Horticulturae**, 49, p.9-16, 1992.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; SOUZA, E. S.; FRANÇA, J. G. E. Metabolismo de plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38 (12), p.1373-1379, 2003.

FILA, G.; BADECK, F. W.; MEYER, S.; CEROVIC, Z.; GHASHGHAIE, J Relationships between leaf conductance to CO₂ diffusion and photosynthesis in micropropagated grapevine plants, before and after *ex vitro* acclimatization. **Journal of Experimental Botany**, 57(11), p.2687-2695, 2006.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, **Biochimica et Biophysica Acta**, 990, p.87-92, 1989.

IACONA, A. C.; MULEO, R. Light quality affects *in vitro* adventitious rooting and *ex vitro* performance of cherry rootstock Colt. **Scientia Horticulturae**, 125, p.630–636 2010.

JAIN, P.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI, S. L. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni by using high copper levels in the culture medium. **Scientia Horticulturae**, 119, p.315-319, 2009.

JO, E. A.; TEWARI, R. K.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Effect of photoperiod and light intensity on *in vitro* propagation of *Alocasia amazonica*. **Plant Biotechnology Reports**, 2, p.207-212, 2008.

JOHNSON-FLANAGAN, A. M.; THIAGARAJAH, M. R. Degreening in canola (*Brassica napus*, c.v. Westar) embryos under optimum conditions. **Journal of Plant Physiology**, 136, p.180-186, 1990.

KADLECEK, P.; TICHÁ, I.; HASEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SCHAFER, C. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. **Plant Science**, 161, p.695-701, 2001.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. *In vitro* aerial environments and their effects on growth and development of plants. KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A.; **Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Springer. Netherlands. 2005. 33-43. 316 p.

KRAMER, P. J.; KOZLOWSKY, T. T. **Physiology of woody plants**. Academic Press, New York, 1979. 811p.

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

KUKI, K. N.; OLIVA, M. A.; GOMES, F. P.; COSTA, A. C.; Avaliação da eficiência do dimetilsulfóxido na extração de pigmentos foliares de *Schinus terebenthifolius* e *Cocos nucifera*. In: X Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal e XII Congresso Latino-Americano de Fisiologia Vegetal, Recife. **Anais**, SBFV. CD Rom, 2005.

LAMBERS, H.; CHAPIN III, F. S.; PONS, T. L. **Plant Physiological Ecology**. 2 ed. Springer, New York. 2008. 11-40. 540p.

LE, V. Q.; SAMSON, G.; DESJARDINS, Y. Opposite effects of exogenous sucrose on growth, photosynthesis and carbon metabolism of *in vitro* plantlets of tomato (*L. esculentum* Mill.) grown under two levels of irradiances and CO₂ concentration. **Journal Plant Physiology**, 158, p.599–605, 2001.

LEE, S. H.; TEWARI, R. K.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Plantlets. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 90, p.141–151, 2007.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. (Eds) **Methods in enzymology**, V. 148. Academic Press, San Diego. 1987. p.350-382.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture of mountain laurel **Proceedings of International Propagation Society**, 30, p.421-427, 1980.

LOBO, F. A.; JUNIOR, J. H. C.; RODRÍGUEZ-ORTÍZ, C. E.; LUCENA, I. C.; VOURLITIS, G. L. Leaf and fruiting phenology and gas exchange of Mangabeira in response to irrigation. **Brazilian Journal Plant Physiology**, 20(1), p.1-10, 2008.

LUCCHESINI, M.; MONTEFORTI, G.; MENSUALI-SODI, A.; SERRA, G. Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different *in vitro* culture conditions. **Biologia Plantarum**, 50(2), p.161-168, 2006.

MAJADA, J.P.; FALL, M.A.; TADEO, F.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R.; Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllus* L. cultured *in vitro*. **In Vitro Cellular e Developmental Biology. Plant**, 38, p.272-278, 2002.

MATYSIAK, B.; NOWAK, J. Carbon dioxide and light effects on photosynthesis, transpiration and *ex vitro* growth of *Homalomena* 'Emerald Gem' plantlets. **Scientia Horticulturae**, 57, p.353-358, 1994.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, 51, p.659-668, 2000.

MELIS, A.; Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. **Plant Science**. 177, p.272-280, 2009

MOHAMED, G. H.; BINDER, W. D.; GILLES, L. Chlorophyll fluorescence: a review of its practical forestry applications and instrumentation. **Scandinavian Journal of Forage Research**, 10, p.383-410, 1995.

MOHAMED, M. A. H.; ALSADON, A. A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**. 123, p.295-300, 2010

MOON, J. W.; FLORE, J. A.; HANCOCK, J. F. A comparison of carbon and water vapor gas exchange characteristics between a diploid and highbush blueberry. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 112, p.134–138, 1987.

MOSALEEYANON, A. K.; CHA-UMA, S.; KIRDMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂ enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, 103, p.51–63, 2004.

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

NETTO, A. T.; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIRA, J. G.; BRESSAN-SMITH, R. E. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, 104, p.199–209, 2005.

PALHARES, D.; FRANCO, A. C.; ZAIDAN, L. B. P. Respostas fotossintéticas de plantas de Cerrado na estação seca e chuvosa. **Revista Brasileira de Biociências**. 8(2). p.213-220, 2010.

PAULA, J. E. Cerrado: sugestão para a adequação entre produção e preservação. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, 16, p. 1-2, 47-48, 1992.

PRIOUL, J. L.; CHARTIER, P. Partitioning of transfer and carboxylation components of intracellular resistance to photosynthetic CO₂ fixation: A critical analysis of the methods used. **Annals of Botany**, 41, p.789-800, 1977.

QUBIT SYSTEMS. CO₂ Analysis Package. Instructor's Manual. **Qubit Systems INC.** ON, Canadá, 2009.

RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. Avaliação dos teores de clorofila no crescimento de mudas de jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Embrapa Florestas, n.128, 2004.

RONEN, R.; GALUN, M. Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. **Environmental and Experimental Botany**, 24(3), p. 239-245, 1984.

SAEG 9.1. **Sistema para Análises Estatísticas-SAEG**. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 2007. Versão 9.1.

SALES, F. S.; PINTO, J. E. B. P.; BOTREL, P. P.; SILVA, F. G.; CORREA, R. M.; CARVALHO, J. G. Biomass accumulation, foliar content of nutrients and yield of essential oil of hortelã-do-campo (*Hyptis marrubioides* EPL.) cultivated under organic fertilization. **Bioscience Journal**. 25 (1)60-68, 2009.

SANTOS, R. P. Respostas morfofisiológicas de videiras cultivadas sob diferentes condições *in vitro*. 2007. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.

SANTOS, R. P.; CRUZ, A. C. F.; IAREMA, L.; KUKI, K. N.; OTONI, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, 55(4), p.356-364, 2008.

SCHNETTGER, B.; CRITCHLEY, C.; SANTORE, U. J.; GRAF, M.; KRAUSE, G. H. Relationship between photoinhibition of photosynthesis, D1 protein turnover and chloroplast structure: effects of protein synthesis inhibitors. **Plant Cell & Environment**, 17, p.55-64, 1994.

SCHREIBER U. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. **Photosynthesis Research**, 9, p.261-272, 1986.

SHIRKE, P. A.; PATHRE, U. V. Influence of leaf-to-air vapour pressure deficit (VPD) on the biochemistry and physiology of photosynthesis in *Prosopis juliflora*. **Journal of Experimental Botany**, 55(405), 2111-2120, 2004.

SNEL, J. F. H.; VAN KOOTEN, O. The use of chlorophyll fluorescence and other noninvasive spectroscopic techniques in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, 25, p.146-332, 1990.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, 35(3), p. 748-755. 2005.

TRIQUES. K.; RIVAL. A.; BEULE.T.; PUARD. M, ROY. J.; NATO, A.; LAVERGNE. D.; HAVAUX, M.; VERDEIL, J. L.; SANGARE, A; HAMON, S. Photosynthetic ability of *in vitro* grown coconut (*Cocos nucifera* L.) plantlets derived from zygotic embryos. **Plant Science**, 127, p.39-51, 1997.

VENTURA, G. M. Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, em diferentes meios de cultura e irradiâncias. 2007. 122f. **Tese** (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.

VIEIRA NETO, R.D. Respostas de mudas de mangabeira a fontes e doses de fósforo em solo de baixada litorânea. 2010. 27f. **Dissertação** (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Sergipe. São Cristovão, 2010.

VIÑA, G. DE LA.; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S. P.; MITCHELL,V. L.; PARRY, M. A.; LAWLOR, D. W. Effects of CO₂ and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. **Plant Physiology & Biochemistry**, 37: p.587-595, 1999.

VON ELBE, J. H. Colorantes. In: FENNEMA, O. W. **Química de los alimentos**. 2ed. Zaragoza: Wisconsin – Madison, 2000. Cap.10, p.782-799.

WANG, C.; XING, D.; CHEN, Q. A novel method for measuring photosynthesis using delayed fluorescence of chloroplast. **Biosensors and Bioelectronics**, 20, p.454–459, 2004.

WELBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* e *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144, p.307-313, 1994.

XIAO, Y.; KOZAI, T. *In vitro* multiplication of static plantlets using sugar-free media. **Scientia Horticulturae**, 109, p.71–77, 2006

YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; GOVINDJEE, M. T-M.; SARIN, N. B. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1797, p.1428-1438, 2010.

ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN, F., KOZAI, T. Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. **In Vitro Cellular Developmental Biology. Plant**, 37, p.807-813, 2001.

CAPÍTULO II

ESTUDO DAS VARIAÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS FOTOSSINTÉTICAS DE PLÂNTULAS DE MANGABA CULTIVADAS *IN VITRO* SUBMETIDAS A DIFERENTES NÍVEIS DE IRRADIÂNCIAS

RESUMO

Segmentos nodais de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) foram cultivados *in vitro* em diferentes níveis de irradiância, com o objetivo de estudar a eficiência fotossintética mediante a adoção e verificação da aplicabilidade de novas metodologias para avaliação da taxa fotossintética, da fluorescência da clorofila *a* e do conteúdo de pigmentos cloroplastídicos. As avaliações foram realizadas em plântulas submetidas a cinco condições de irradiância, sendo 12, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram avaliadas a taxa de assimilação de CO_2 (*A*), parâmetros da fluorescência da clorofila *a* e o conteúdo de pigmentos cloroplastídicos. Após 35 dias de exposição aos tratamentos com diferentes ambientes espectrais, observou-se que irradiâncias de crescimento de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionaram as melhores respostas de taxa fotossintética e os melhores índices de área foliar e massa seca. Os extremos de irradiância utilizados neste estudo, 12 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não foram adequados para o cultivo *in vitro* de mangaba, as plântulas crescidas nessas irradiâncias tiveram as menores taxas fotossintéticas e os menores índices de matéria seca, sendo inclusive observado valores de F_v/F_m , que sinalizaram a ocorrência de fotoinibição.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* é uma técnica conhecida pela rápida e uniforme propagação de plantas. Contudo, as folhas formadas durante o crescimento *in vitro* teoricamente poderiam não obter competência fotossintética (YOON et al., 2009), porque crescem em condições de alta umidade relativa, baixa radiação fotossinteticamente ativa e o meio de crescimento inclui carboidratos como fonte de energia. Estas condições induzem o que Pospíšilová et al. (1988) referem como anormalidades que inclui ineficiente retenção de água porque os estômatos possuem uma lenta resposta à queda de umidade relativa (PREECE e SUTTER, 1991). Isto resulta em taxas transpiratórias descontroladas, levando ao murchamento e baixos níveis de taxa fotossintética, o que tende a prejudicar a etapa de aclimatização.

A baixa capacidade fotossintética de plantas crescidas *in vitro*, deve-se principalmente às características nutricionais e ambientais a que são impostas, exercendo assim um comportamento heterotrófico ou fotomixotrófico (DAMIANI e SCHUCH, 2008), ou seja, as plântulas *in vitro* requerem uma fonte exógena de carbono e de energia, em todas as suas fases de seu desenvolvimento. A aquisição da competência fotossintética é um requisito fisiológico crítico de plântulas crescidas *in vitro* para posterior adaptação ao ambiente *ex vitro* (NEWELL, 2006).

Ultimamente, vem sendo desenvolvido trabalhos com a finalidade de aumentar a competência fotossintética das plantas cultivadas *in vitro*, e deste modo diminuir a vulnerabilidade das mesmas aos estresses ocasionados durante a transferência para o ambiente *ex vitro*. Segundo Kubota (2001), medidas como aumento da ventilação do ambiente de cultivo, uso de substratos mais porosos, enriquecimento da atmosfera de crescimento com CO₂, eliminação ou diminuição do uso das fontes de carbono orgânico e aumento da densidade de fluxo de fótons fotossintéticos, elevam a habilidade fotossintética das plantas *in vitro* caracterizando assim a micropropagação fotoautotrófica.

A luz está entre os fatores ambientais que devem ser manipulados durante o crescimento *in vitro* e principalmente durante a aclimatização para posterior transferência *ex vitro*. Um aumento na irradiância resultará numa rápida expansão de folhas novas com características autotróficas, potencializando a melhoria das taxas de sobrevivência (DONNELLY e VIDAVER, 1984). No entanto, se a irradiância excede à

necessidade fotossintética, a fotoinibição pode ocorrer (DEMMIG-ADAMS e ADAMS III, 1992). A extensão da fotoinibição dependerá do *status* fisiológico da planta que, por sua vez, é definido pelas condições ambientais prevalecentes, pela eficiência dos mecanismos de proteção contra o excesso de energia, e pelos processos de reparo para restabelecimento da fotossíntese (KRAUSE e WEIS, 1991). Os parâmetros da fluorescência, associados a resultados de outras técnicas, sugerem que as plântulas *in vitro* são mais afetadas pelo aumento da irradiância quando há pouco desenvolvimento das características fotossintéticas, e as condições de crescimento são fatores decisivos no desenvolvimento destas características (KADLECEK et al., 2003; FUENTES et al., 2005; CHRISTOV et al., 2007).

Contudo, as plantas são capazes de modificar seu crescimento, desenvolvimento e fisiologia de acordo com as variáveis ambientais (RUBAN, 2009). Esta capacidade é determinante para a sua tolerância aos diferentes fatores de estresse e para manter um eficiente crescimento (MURCHIE e HORTON, 1997; WALTERS et al., 2003). As respostas das plantas às variáveis ambientais envolvem modificações no aparato fotossintético, a fim de manter uma alta eficiência fotossintética sob regimes peculiares de luz e então atenuar os efeitos danosos dos extremos ambientais (PARK et al., 1996; SAVITCH et al., 2000.) A aclimação das plantas às adversidades do ambiente é acompanhada de distintas mudanças na expressão gênica, seguida por mudanças da organização de complexos proteicos, composição de lipídios e funções das membranas dos tilacoides (WALTERS, 2005; DANKOV et al., 2011).

Avaliações das trocas gasosas, de parâmetros da fluorescência e de pigmentos foliares representam técnicas que podem tanto diagnosticar um quadro de estresse, antes que os sintomas visuais sejam explícitos, bem como indicar o desenvolvimento de mecanismos de respostas às situações hostis que o ambiente esteja impondo. Poucas são as informações a respeito do desempenho fotossintético de espécies nativas do cerrado em condição *in vitro*, em resposta às variações da intensidade luminosa, no que tange às características da fluorescência da clorofila e a assimilação líquida do CO₂.

Desta forma, objetivou-se neste trabalho estudar a eficiência fotossintética de plântulas de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), cultivadas *in vitro* sob diferentes níveis de irradiância, mediante a adoção de novas metodologias para avaliação da taxa fotossintética, da fluorescência da clorofila das folhas e do conteúdo de pigmentos cloroplastídicos. Além disso, objetivou-se ainda, verificar se a metodologia ajustada para a caracterização da eficiência fotossintética no capítulo anterior deste estudo, pode

ser utilizada para avaliar condições contrastantes de irradiância no ambiente de crescimento de plântulas de mangaba.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde, sendo o cultivo *in vitro* realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, e a imposição dos tratamentos com diferentes níveis de irradiância, e as avaliações fisiológicas, conduzidas no Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal.

2.1. Material vegetal

A obtenção do material vegetal e as condições de cultivo estão descritas no capítulo I desta dissertação.

2.2. Condições de crescimento

Explantos de mangaba de segundo subcultivo com 15 dias, de aproximadamente 1 cm, e no mínimo duas gemas, foram transferidos para a sala de crescimento do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal e distribuídos em diferentes irradiâncias de crescimento (Figura 1).

Nesse ambiente, manteve-se o controle da temperatura em $25 \pm 3^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiâncias, como tratamentos, de 12, 25, 50, 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecidas por tubos fluorescentes Golden[®], com potência de 30 W, luz do dia. As irradiâncias de cada tratamento foram ajustadas por meio do sensor de radiação fotossinteticamente ativa, modelo QSO-S (Decagon Devices, Pullman, WA, USA), e verificadas periodicamente. A quantidade e a distância entre as lâmpadas fluorescentes foram arranjadas de forma a se obter ambientes espectrais uniformes conforme as irradiâncias propostas anteriormente, cujas variações não ultrapassassem $\pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram utilizadas placas de isopor nas superfícies das prateleiras, como isolante térmico evitando assim o aquecimento do fundo dos frascos de cultivo. Além disso, foram instalados exaustores nas laterais das prateleiras, sendo um para cada tratamento objetivando manter constante a renovação do ar em cada ambiente.



Figura 1. Estrutura utilizada para a imposição dos diferentes níveis de irradiância. Cada prateleira representa um ambiente espectral, $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A); $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B); $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (C); $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (D) e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (E).

2.3. Avaliação da taxa fotossintética

As avaliações de taxa fotossintética foram realizadas após 35 dias de imposição dos tratamentos. No dia das medições as plântulas foram mantidas por oito horas no escuro (durante a noite) e antes do início das medições, foram expostas por 60 minutos na irradiância de crescimento e imediatamente avaliadas.

As medições foram realizadas em sala climatizada, utilizando o conjunto analisador de trocas gasosas da Qubit Systems (Kingston, ON, Canadá). A câmara de medição que vem acoplada ao sistema foi substituída pelo tubo de crescimento das plântulas, conforme a metodologia ajustada no Capítulo I desta dissertação.

O ar de referência foi obtido a partir de um cilindro de CO₂/N₂, com concentração padrão de 390 μmol mol⁻¹. O fluxo de ar foi ajustado para 250 mL min⁻¹ por meio do monitor de fluxo digital G265 (Qubit Systems, Kingston, ON, Canadá). O ar de referência foi umidificado para a UR de 80 ± 5%, por meio do borbulhar forçado em 30 mL água fervida e resfriada, colocada num tubo de ensaio conforme método descrito no Capítulo I. A temperatura do ar foi mantida em 25 ± 1°C. Tanto a temperatura quanto a umidade relativa do ar de referência foram monitoradas utilizando o sensor de temperatura e umidade S161 (Qubit Systems, Kingston, ON, Canadá). A concentração de CO₂ foi avaliada utilizando o IRGA modelo S151 (Qubit Systems, Kingston, ON, Canadá). A irradiância de medição foi ajustada em 600 μmol m⁻² s⁻¹, pelo sensor de radiação fotossinteticamente ativa modelo QSO-S (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). Este valor foi adotado a partir do ponto de saturação luminoso verificado nos ajustes de curva de luz para esta espécie no Capítulo I. A fonte de luz consistiu de uma lâmpada halógena dicróica de 20W, do LCI LightSystems (ADC Bioscientific, Great Amwell, Herts, England).

A área foliar das plântulas foi utilizada como base de cálculo da taxa fotossintética conforme metodologia ajustada no Capítulo I, sendo expressa em μmol CO₂, m⁻² de folha s⁻¹ ou simplificando, μmol m⁻² s⁻¹. A área foliar foi obtida a partir da integração das imagens das mesmas em um *software* de tratamento de imagens.

Nas avaliações de taxa fotossintética, foram utilizadas sete repetições por tratamento.

2.4. Avaliação da fluorescência da clorofila *a*

Paralelamente as trocas gasosas foram avaliados os parâmetros da fluorescência da clorofila *a*. As avaliações foram realizadas por meio de um fluorômetro modulado modelo MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). As análises foram feitas seguindo a metodologia descrita por Schreiber et al. (1986) e Genty et al. (1989), avaliando a emissão de fluorescência da clorofila *a* da parte superior do limbo foliar e utilizando as terminologias e cálculos propostos por Snel e Van Kooten (1990).

Os parâmetros de escuro foram avaliados conforme descrito no capítulo I. Posteriormente, as mesmas plântulas foram colocadas em uma câmara úmida por aproximadamente 20 minutos sob as mesmas irradiâncias de crescimento descritas anteriormente, para serem medidos os parâmetros de fluorescência do claro. Estes

parâmetros foram medidos por meio de curva de luz utilizando as seguintes densidades de fluxo de fótons (DFP): 0, 5, 17, 50, 100, 150, 225, 380 e 650 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores foram ajustados conforme a programação do fluorômetro e a intensidade máxima utilizada foi baseada no ponto de saturação de ETR observado para esta espécie nas avaliações do capítulo I.

Por meio das curvas foram avaliados o rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$), a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) de acordo com Bilger et al.(1995), o coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e o coeficiente de extinção não fotoquímica de Stern-Volmer (NPQ), conforme (BILGER e BJÖRKMAN, 1990).

Para as avaliações dos parâmetros de fluorescência das folhas adaptadas ao escuro foram utilizadas oito repetições por tratamento e para os parâmetros de claro foram utilizadas cinco repetições por tratamento.

2.5. Avaliação de pigmentos cloroplastídicos

Para a determinação do conteúdo de pigmentos cloroplastídicos foram utilizados discos foliares incubados em DMSO saturado com CaCO_3 por 12 horas à temperatura de 65 °C, conforme a metodologia descrita e ajustada para esta espécie no capítulo I.

Para as avaliações de pigmentos cloroplastídicos foram utilizadas cinco repetições por tratamento.

2.6. Características do crescimento

Após as avaliações de taxa fotossintética e de fluorescência da clorofila *a* procedeu-se as medições de crescimento, em que foram avaliados o número de folhas, a área foliar, a área foliar específica obtida pela razão entre a área da folha e sua massa, o comprimento da plântula e a massa seca da parte aérea.

A área foliar foi obtida a partir da integração das imagens das mesmas em um *software* de tratamento de imagens. A massa seca, foliar e da parte aérea, foi determinada em balança analítica digital, após a secagem do material a temperatura de 65 °C por 72 horas, em estufa.

2.7. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio. Os dados obtidos para as diferentes características avaliadas foram submetidos à análise de variância e posteriormente ao ajuste de modelos de regressão, por meio do *software* de análises estatísticas SAEG 9.1 (UFV, 2007).

3. RESULTADOS

O aumento da irradiância de crescimento afetou as respostas fisiológicas, as características do crescimento e o aspecto visual das plântulas de mangaba cultivadas *in vitro*.

3.1. Taxa fotossintética

As maiores respostas de taxas fotossintéticas foram verificadas em plântulas de mangaba crescendo sob a irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2). Os menores valores de assimilação de CO_2 foram verificados na menor irradiância de crescimento, $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e na maior irradiância, $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2). O comportamento da taxa fotossintética em função do aumento da irradiância de crescimento foi explicado pelo ajuste do modelo de regressão raiz quadrada.

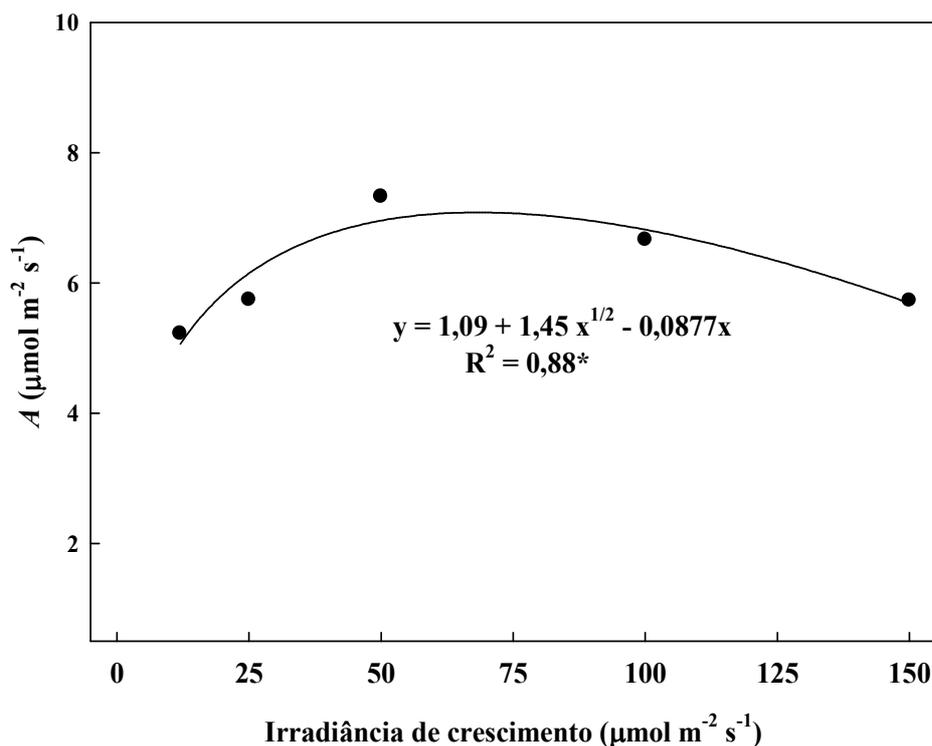


Figura 2. Taxa de assimilação líquida de CO_2 (A - $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de plântulas de mangaba, cultivadas *in vitro*, em função de diferentes níveis de irradiância. Os dados são explicados por um modelo raiz quadrada ($n=7$). Significância: * $p<0,05$.

3.2. Fluorescência da clorofila *a*

O rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) diminuiu significativamente ($p<0,01$) em função do aumento da irradiância de crescimento (Figura 3). As plântulas crescidas na irradiância de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tiveram valores da F_v/F_m abaixo de 0,75, sinalizando a ocorrência da fotoinibição.

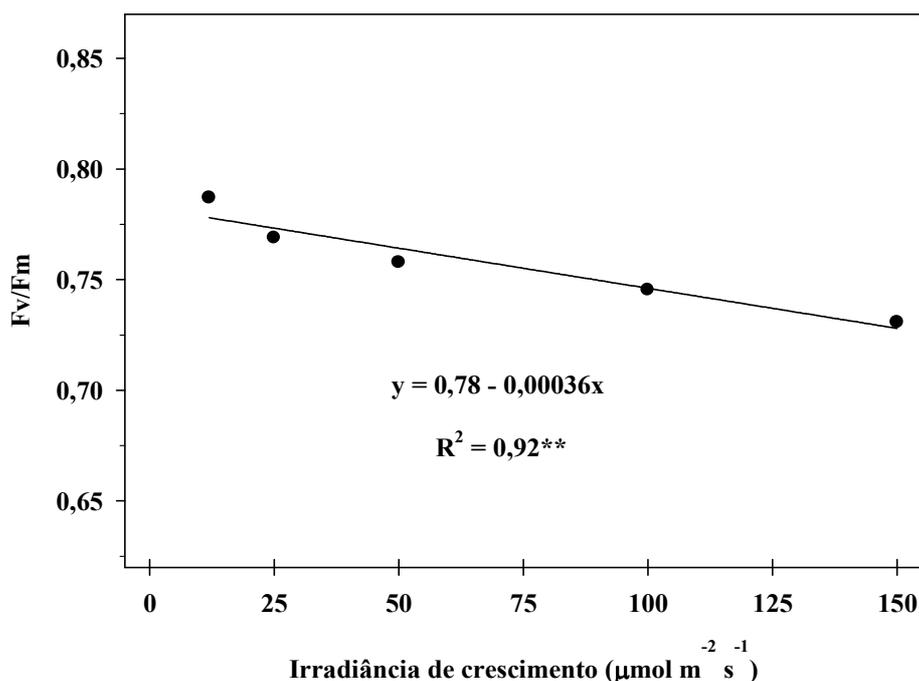


Figura 3. Rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm) em função dos níveis de irradiância. Os dados foram ajustados conforme modelo linear de regressão ($n=8$). Significância: $**p<0,01$.

O comportamento do rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$) foi similar entre os tratamentos, ocorrendo uma pronunciada queda de $\Delta F/F_m'$ em densidades de fluxo fotossintéticos (DFF) superiores a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 4A).

Os resultados obtidos indicam que as folhas de plântulas crescidas sob baixas irradiâncias, 12 e $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tiveram menores valores de ETR (Figura 4B) e do coeficiente de extinção fotoquímica (qP) (Figura 4C).

O coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) aumentou em função do aumento da DFF em todas as plântulas, independente da irradiância de crescimento imposta (Figura 4D). No entanto, as respostas entre os tratamentos sofreram variações adversas diferindo do padrão clássico para esta característica. Observa-se na Figura 4D que os maiores valores de NPQ ocorreram em plântulas submetidas a $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e os menores nas plântulas sob a irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Já as plântulas submetidas às demais irradiâncias tiveram respostas semelhantes entre si (Figura 4D).

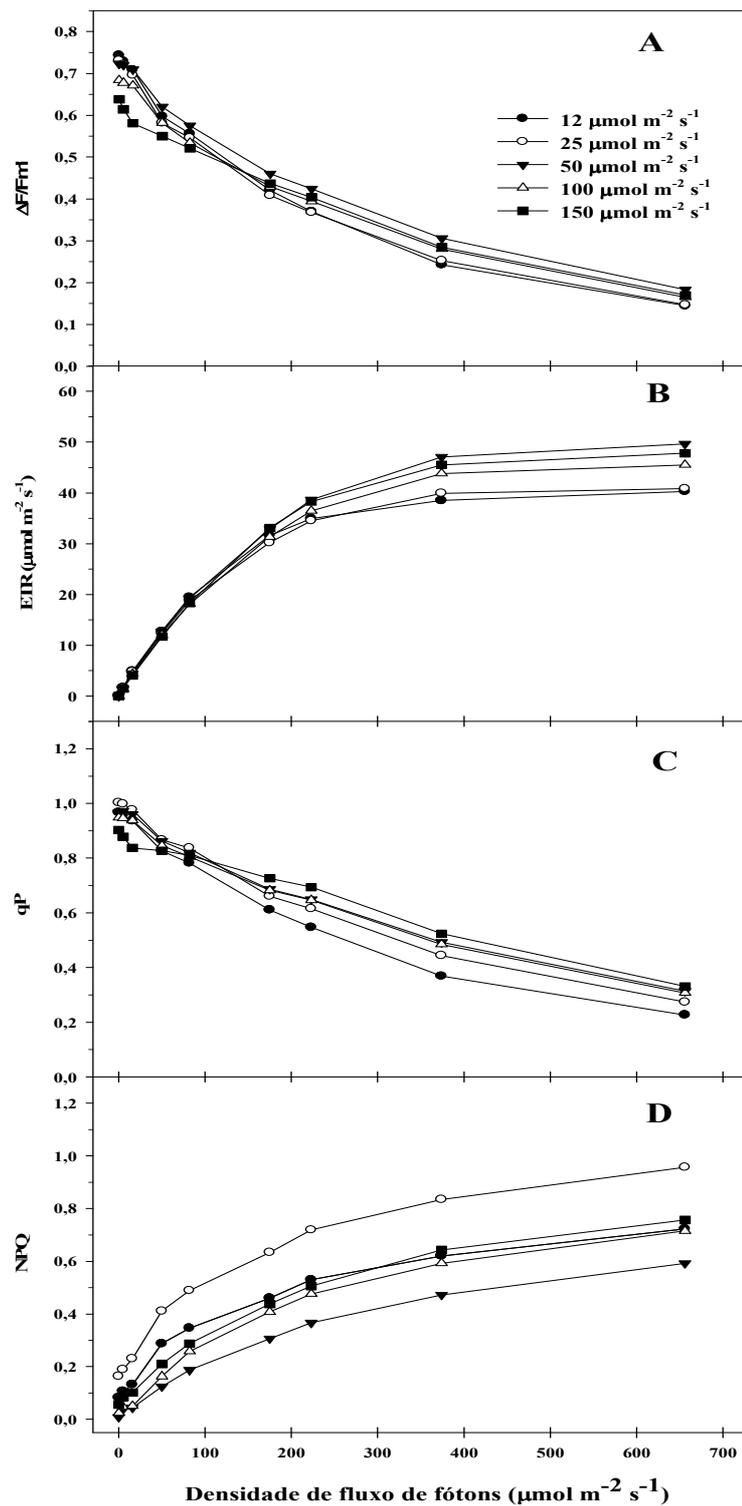


Figura 4. Rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/Fm'$) (A), taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) (B), coeficiente de extinção fotoquímica (qp) (C) e coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) (D), em função de diferentes níveis de densidade de fluxo de fótons.

3.3. Conteúdo de pigmentos cloroplásticos

O conteúdo de clorofila *a* sofreu decréscimo linear com aumento dos níveis de irradiância. Decréscimos mais pronunciados foram verificados em irradiâncias superiores a $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 5A). Por outro lado, não houve diferença entre os tratamentos para o conteúdo de clorofila *b* (Figura 5B), sendo observada uma média de $8,73 \mu\text{g cm}^{-2}$.

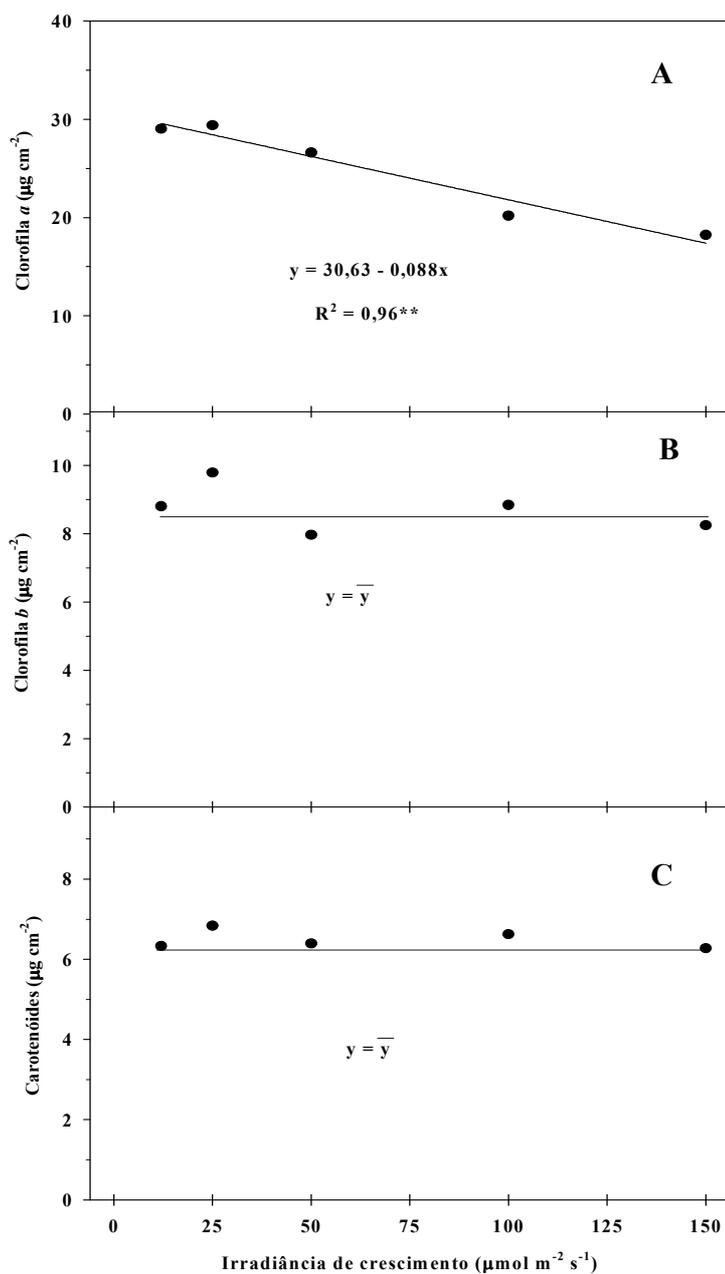


Figura 5. Conteúdo de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) e de carotenoides (C) de plantas de mangaba cultivadas *in vitro* em função dos diferentes níveis de irradiância de crescimento. ($n=5$). Significância: $**p<0,01$.

O conteúdo de carotenoides permaneceu inalterado entre as diferentes irradiâncias de crescimento (Figura 5C), no entanto, a relação carotenoides/clorofilas aumentou significativamente em função do aumento da irradiância (Figura 6C).

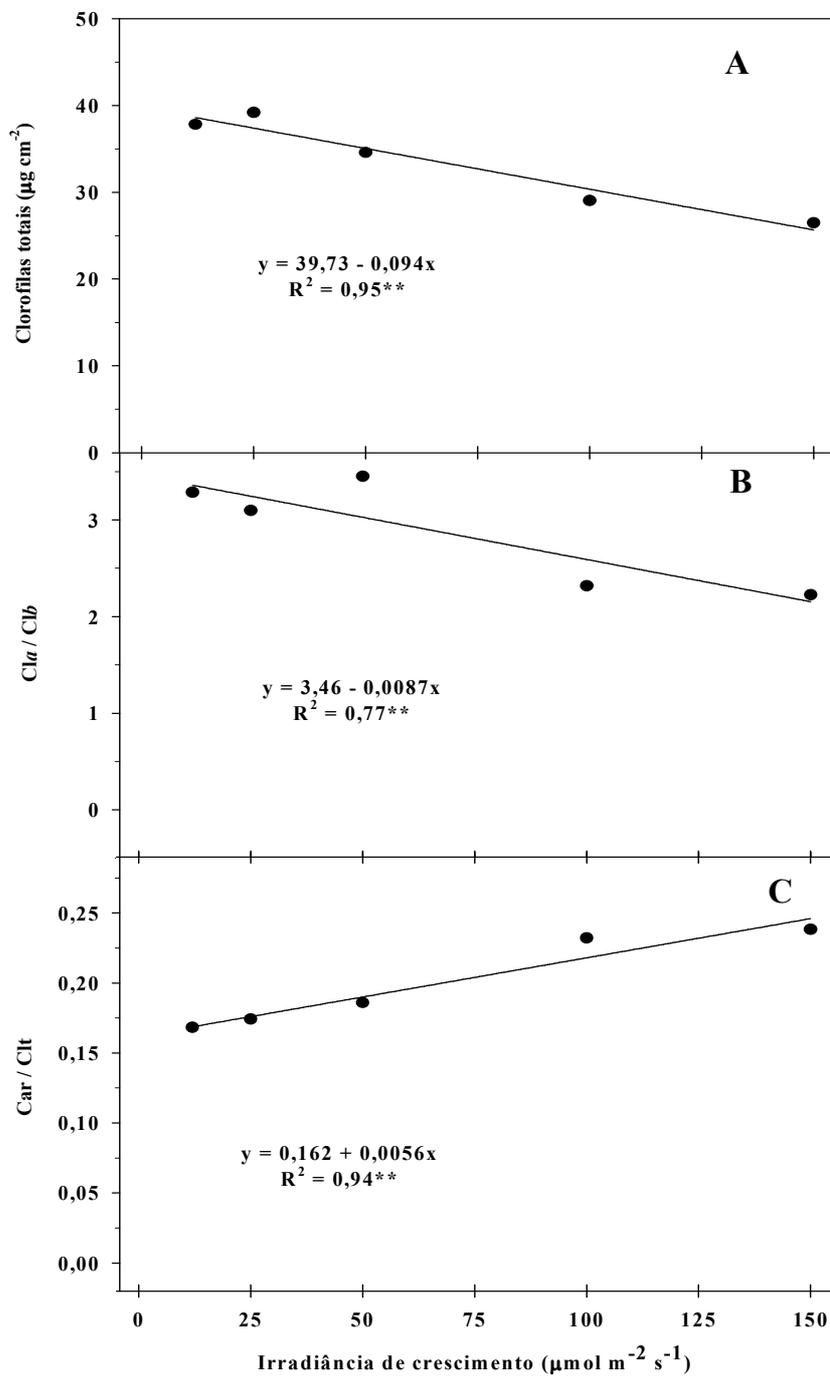


Figura 6. Conteúdo de clorofila total (A), razão clorofila *a/b* (B), razão carotenoides/clorofilas (C) de plantas de mangaba cultivadas *in vitro* em função dos diferentes níveis de irradiância de crescimento. Em todas as características foram ajustados modelos lineares de regressão ($n=5$). Significância: $**p < 0,01$

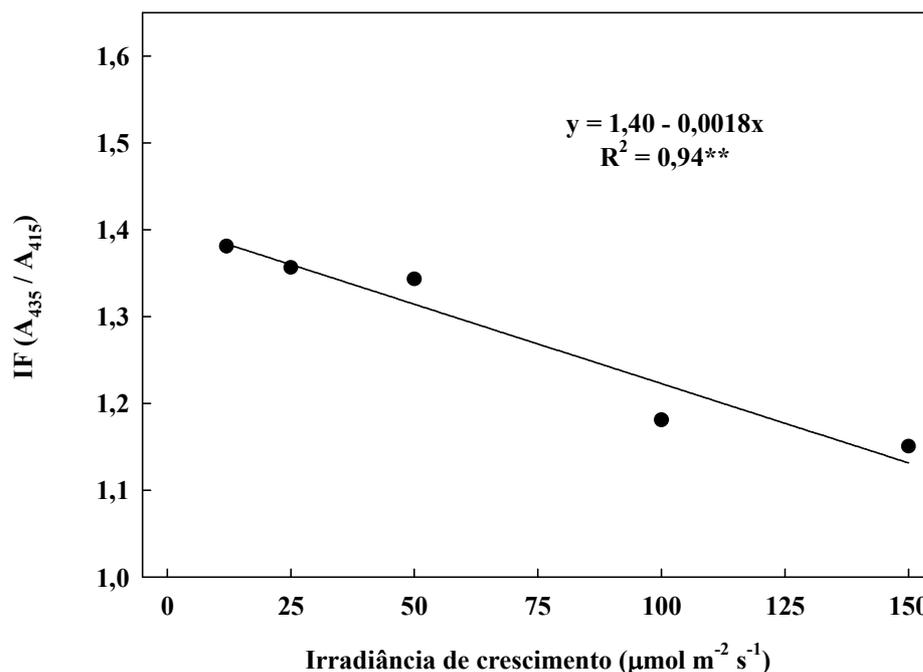


Figura 7. Índice de feofitinação (IF) de plantas de mangaba cultivadas *in vitro* em função dos diferentes níveis de irradiância de crescimento. Os dados foram ajustados conforme modelo linear de regressão ($n=5$). Significância: $**p<0,01$

Comportamento semelhante ao da clorofila *a*, foi observado no conteúdo total de clorofilas (Figura 6A), na razão clorofila *a/b* (Figura 6B) e também no Índice de Feofitinação (IF) (Figura 7), em que o aumento da irradiância promoveu a diminuição dos valores destas características. O IF diminuiu de forma mais pronunciada em irradiâncias superiores a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, alcançando valores inferiores a 1,2 (Figura 7).

3.4. Características do crescimento

As características do crescimento com número de folhas, área foliar, área foliar específica e comprimento da parte aérea são demonstradas nas (Figura 8 e 9).

O número de folhas das plântulas não foi alterado em função das irradiâncias de crescimento (Figura 8A), no entanto, a área foliar diminuiu nas irradiâncias extremas, ou seja, 12 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 8B). Os maiores valores da área foliar foram observados em irradiâncias no entorno de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Já na área foliar específica (AFE), os maiores valores foram verificados nas menores irradiâncias. Em irradiâncias maiores que $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a diminuição da AFE chegou a mais de 30% (Figura 8C).

Os maiores comprimentos de plântulas ocorreram nas menores irradiâncias, sobretudo na irradiância de $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A diminuição do comprimento foi linear com o aumento da irradiância de crescimento. Em irradiâncias maiores que $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verificou-se redução de até 40% no comprimento das plântulas (Figura 9A).

Assim como observado na taxa fotossintética, os maiores valores do peso da matéria seca das plantas (MSPA) foram observados em irradiâncias próximo a $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 9B). Em irradiâncias baixas ($12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ou altas ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram registrados os menores valores da MSPA. Ao comportamento da MSPA em função do aumento da irradiância de crescimento foi ajustado um modelo de regressão raiz quadrada (Figura 9B).

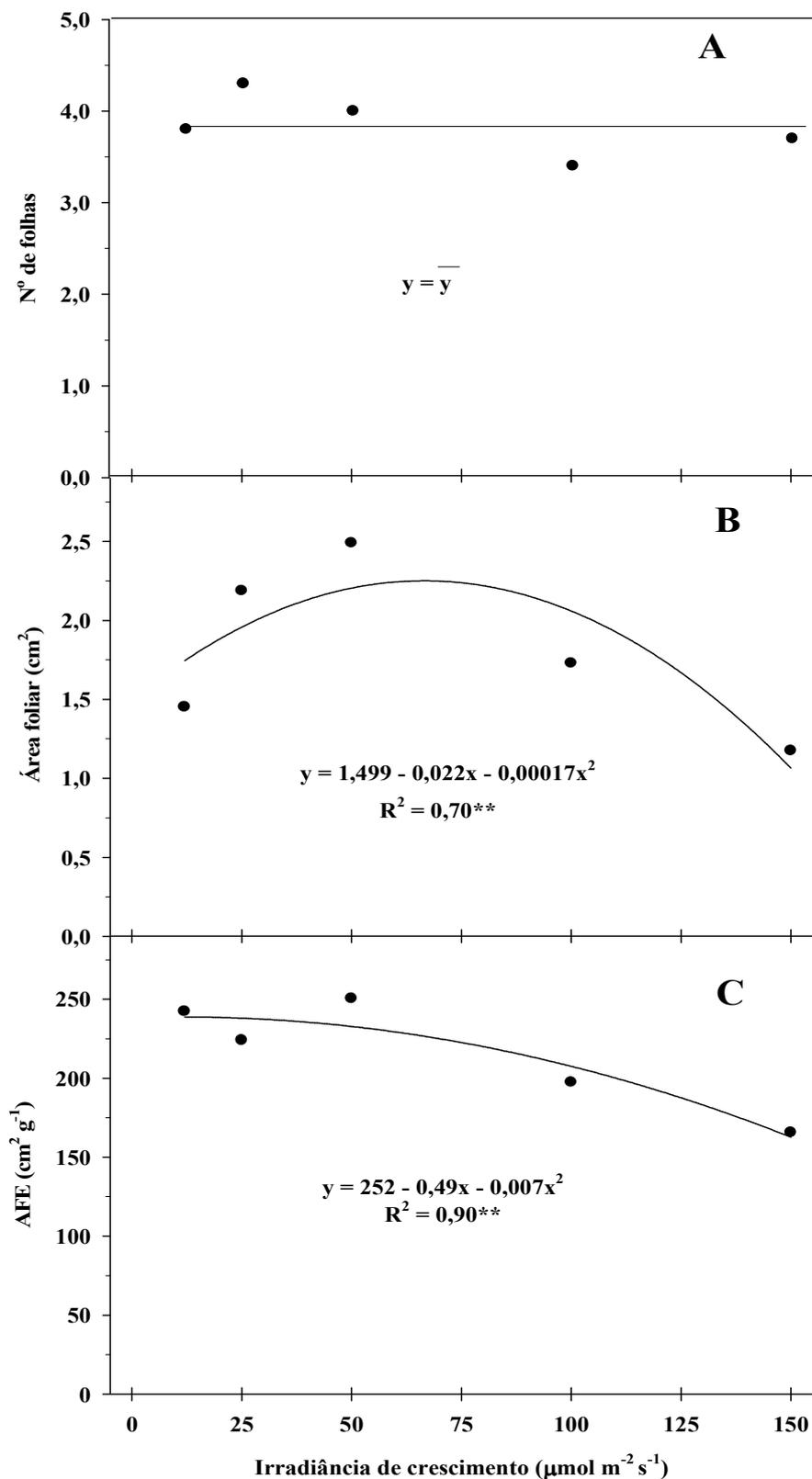


Figura 8. Número de folhas (A), área foliar (B) e área foliar específica (AFE) (C) de plântulas de mangaba cultivadas *in vitro* em função dos diferentes níveis de irradiância de crescimento, ($n=10$). Significância: * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

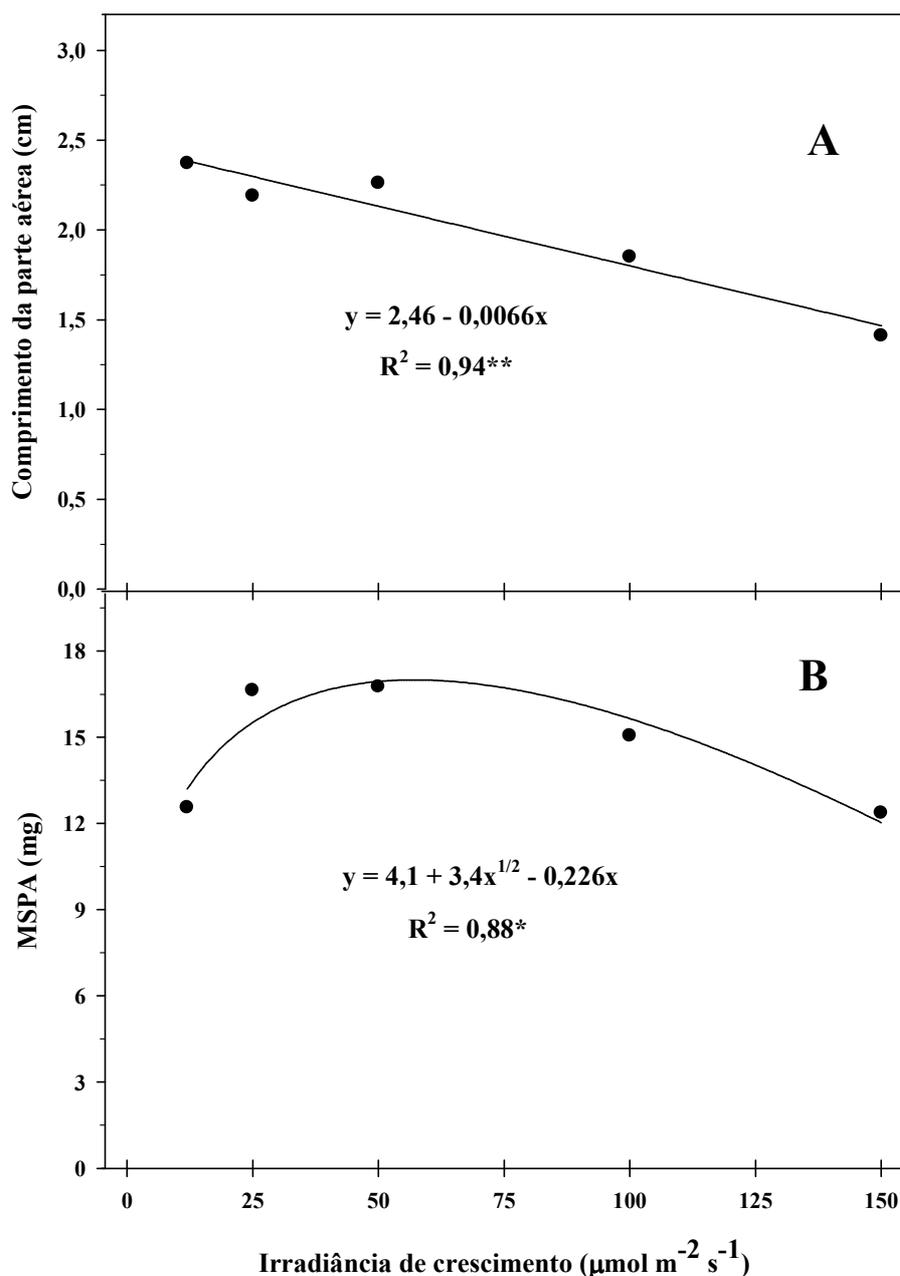


Figura 9. Comprimento de plântulas (A), e massa seca da parte aérea (MSPA) [B], de plântulas de mangaba cultivadas *in vitro* em função dos diferentes níveis de irradiância de crescimento. ($n=10$). Significância: $*p<0,05$; $**p<0,01$.

O aspecto visual das plantas demonstra que as mesmas foram sensíveis aos tratamentos com diferentes níveis de irradiância (Figura 10).

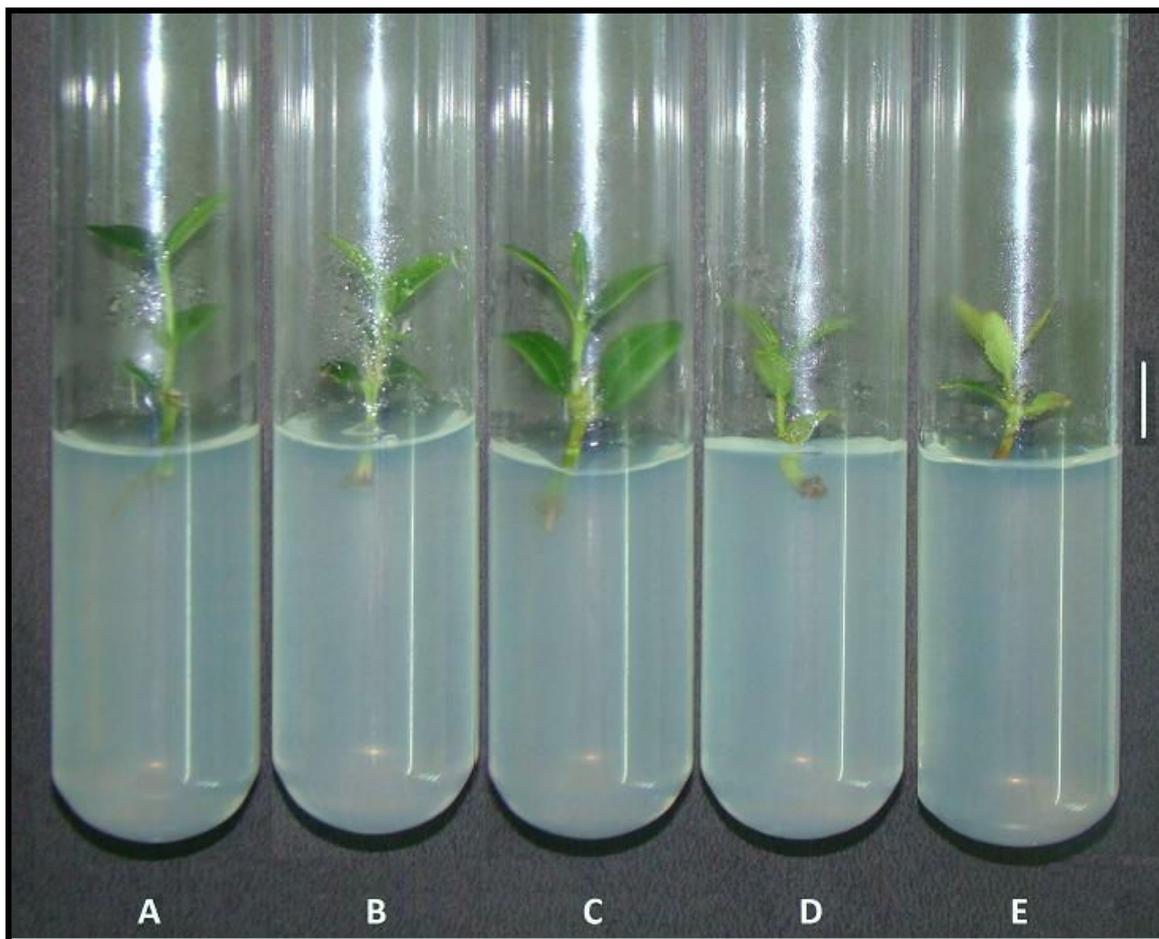


Figura 10. Plântulas de mangaba de 50 dias de cultivo, cultivadas *in vitro*, após 35 dias de exposição a diferentes níveis de irradiância, $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A), $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B), $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (C), $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (D) e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (E). Barra = 10 mm.

4. DISCUSSÃO

As plântulas de mangaba responderam aos tratamentos com diferentes níveis de irradiância de crescimento, sendo este reflexo observado tanto nas avaliações fisiológicas quanto nas avaliações de crescimento.

Embora a capacidade fotossintética das plântulas *in vitro* ainda seja pouco conhecida, as avaliações de taxa fotossintética potencial indicaram uma considerável capacidade de assimilação de CO_2 pelas plântulas de mangaba no ambiente *in vitro*. Mesmo nos tratamentos em que observaram os menores valores de assimilação de CO_2 , nas irradiâncias de 12 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a taxa fotossintética não foi inferior a $4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores obtidos para esta espécie foram inclusive superiores aos obtidos por Viña et al. (1999), utilizando uma metodologia semelhante a empregada neste estudo.

Aqueles autores verificaram valores das taxas fotossintéticas próximos a $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em plântulas de abacate *in vitro*, com idade e condições de crescimento semelhantes às utilizadas neste estudo. Valores ainda inferiores de fotossíntese líquida potencial foram encontrados em plântulas de pupunheira *in vitro* em avaliações utilizando o IRGA modelo LI-6400 (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Nestas plântulas foi verificada taxa fotossintética de apenas $1,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (BATAGIN, 2008).

Mesmo *in vitro*, as taxas fotossintéticas observadas neste estudo são relativamente altas. Os valores de A verificados nas plântulas de mangaba crescidas em irradiância $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, neste estudo, aproximam dos valores alcançados por plantas de cerrado nas condições de campo. Segundo Palhares et al. (2010), plantas arbustivas e arbóreas do cerrado, possuem taxa fotossintética líquida máxima que variam de 4 a $16 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em avaliações da taxa fotossintética de mudas de mangaba com 98 dias de cultivo, em diferentes adubações fosfatadas, Vieira Neto (2010), encontrou resultados de A entre 8,9 e $12,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Valores próximos a estes também foram encontrados por LOBO et al. (2008), em mangabeiras adultas submetidas a tratamento com imposição ou ausência de irrigação.

As taxas fotossintéticas observadas neste estudo correspondem à taxa fotossintética líquida potencial, ou seja, em condições ideais, sem limitações na oferta de luz e CO_2 , o que não ocorreu no decorrer do crescimento destas plântulas. Os baixos rendimentos fotossintéticos das plântulas *in vitro* são em grande parte decorrentes do ambiente de crescimento. No ambiente *in vitro*, as baixas concentrações de CO_2 , por causa da baixa ventilação e permeabilidade gasosa dos frascos de cultivo, inibem a atividade fotossintética das plantas, levando as mesmas a um comportamento heterotrófico ou fotomixotrófico pela absorção de carbono proveniente do açúcar adicionado ao meio (KOZAI e ZOBAYED, 2001).

As concentrações de CO_2 próximas ao ponto de compensação em boa parte do fotoperíodo levam assim a uma baixa exigência de luz e consequentemente baixas taxas fotossintéticas (KOZAI et al., 2005). Portanto, condições ambientais que estimulem o crescimento autotrófico como maior ventilação, controle da umidade e densidades de fluxos de fótons ideais, podem propiciar melhores respostas para o desenvolvimento *in vitro* destas plântulas.

As menores taxas fotossintéticas observadas a partir de irradiâncias superiores a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, provavelmente estão relacionadas ao processo fotoinibitório, evidenciado pela avaliação de fluorescência da clorofila.

Nas avaliações da razão F_v/F_m deste estudo, não foram observados valores superiores a 0,80 em nenhum dos tratamentos, indicando que este parâmetro varia conforme a espécie. Não obstante, pode indicar também que as condições particulares do ambiente *in vitro*, além da irradiância, podem estar atuando como fator de estresse. Entretanto, os valores médios de F_v/F_m abaixo de 0,75 observados em plântulas crescidas nas irradiâncias de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sinalizam a ocorrência de processo fotoinibitório, mesmo que dinâmico, uma vez que nessas irradiâncias, outras características avaliadas como a A , e a degradação de clorofila a , o amarelecimento, corroboram para a confirmação desta hipótese.

A fotoinibição é um fenômeno que se desenvolve quando plantas adaptadas às condições prevalecentes de luz absorvem densidades de fluxo de fótons além daquelas requeridas para a fotossíntese (POWLES, 1984; DEMMIG-ADAMS e ADAMS, 1992; LONG et al., 1994).

A extensão da fotoinibição depende do balanço entre a taxa de dano e reparo do FSII (MURATA et al., 2007). As plântulas deste estudo mostraram capacidade de ajustar a estas condições estressantes, apesar das características avaliadas apontarem a ocorrência da fotoinibição, não houve registro de mortalidade destas plântulas, mesmo após 35 dias de exposição a essas irradiâncias. Possivelmente a diminuição nas características do crescimento observadas nas plântulas de mangaba deste estudo, nas maiores irradiâncias, pode estar relacionada a menor alocação de energia nestas características em detrimento de um maior gasto de energia metabólica em processos de reparo.

Os resultados de rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$) e do coeficiente de extinção fotoquímica (q_P) não revelaram diferenças acentuadas entre os tratamentos, porém foi observada diminuição pronunciada nestas características em densidades de fluxo de fótons superiores a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A ETR se correlaciona negativamente com $\Delta F/F_m'$ pois a ETR, geralmente aumenta com o acréscimo da DFF, até que ocorra a saturação dos carreadores de elétrons (MOHAMED et al., 1995). Os resultados obtidos neste estudo, indicam que as folhas de plântulas crescidas sob baixas irradiâncias, 12 e 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tiveram menores valores de ETR, comportamento semelhante aos de folhas de sombra em condição de campo, como observado em plantas de *Vaccinium corymbosum* cv Bluecrop de dois anos de idade (KIM, et al., 2011). Neste estudo, os maiores valores de ETR observados nas plântulas crescidas sob

irradiâncias de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ possivelmente estão relacionados ao dreno de elétrons por processos fotorrespiratórios (SANTOS, 2007; BUSSOTI et al., 2011).

Os resultados obtidos para o coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) foram inconclusivos, uma vez que não foi possível estabelecer uma relação coerente desta característica entre os tratamentos e os demais resultados da fluorescência da clorofila. Estes resultados apontam a necessidade de proceder ajustes mais finos para aplicação dessas avaliações, como ajustar o tempo de exposição das plântulas às irradiâncias de crescimento antes das medições e ainda, ajustar os intervalos de tempo para a sucessão de pulsos saturantes ao configurar o medidor de fluorescência.

Os maiores conteúdos de clorofilas ocorreram em plantas sob baixas irradiâncias. Ortiz (2004) em estudo de *Bixa orellana* L., cultivada *in vitro*, também constatou maiores conteúdos de clorofilas totais quando as plântulas cresceram sob a irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, observando reduções nas concentrações destes pigmentos em irradiâncias maiores que $105 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em estudos com *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (ALEXANDRE, 2006) e *Cattleya guttata* (VENTURA, 2007) nas irradiâncias semelhantes àquelas adotadas neste trabalho, verificaram redução nos conteúdos de clorofila *a*, *b*, e da relação clorofila *a/b*, e aumento da relação carotenoides/clorofilas em função do incremento da irradiância. Estes resultados são semelhantes aos observados neste estudo.

O aumento da relação carotenoides/clorofilas com o aumento da irradiância, observado neste trabalho é um indicativo da presença de mecanismo fotoprotetor das plantas frente a absorção excessiva de luz. A elevação desta relação também foi observada em *Withania somnifera* (LEE et al., 2007) e em *Allocaasia amazonica* (JO et al., 2008) cultivadas *in vitro* em função dos níveis crescentes de irradiância. Os carotenoides, são associados à dissipação do excesso da energia dos fótons por meio de calor, e desta maneira protegem as clorofilas da foto-oxidação e reduzem o risco de fotoinibição (PANDEY et al., 2005; JEON et al., 2005). A interconversão dos carotenoides violaxantina a anteraxantina, no ciclo das xantofilas, representa um importante mecanismo para a dissipação de energia não fotoquímica, o que contribui para a manutenção da estabilidade do fotossistema II (TAIZ e ZEIGER, 2004). Embora haja debates sobre o impacto de carotenoides sobre a atuação nos processos de dissipação não fotoquímica (RUBAN, 2009), estudos com plantas mutantes de *Arabidopsis* indicaram que praticamente não houve NPQ na ausência dos carotenoides

luteína e zeaxantina, confirmando assim a importância destes pigmentos para a antena coletora de energia do FS II (NIOGI et al., 2001; JOHNSON et al., 2008).

Os baixos valores de índice de feofitinação (IF) obtidos nas irradiâncias de 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ reforçam as evidências que nessas irradiâncias há uma degradação do conteúdo de clorofilas. Ronen e Galun (1984) sugerem que os valores adequados do IF devem ser superiores a 1,4 para a máxima estabilidade da clorofila *a*. Neste estudo, em irradiâncias superiores a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, os valores do IF foram inferiores a 1,2. Quanto maiores os decréscimos no IF, maiores serão os danos a integridade da clorofila *a*, pigmento chave na captação da energia para processo fotossintético. Neste estudo inclusive, esta relação foi verificada uma vez que a maior redução de clorofila *a* ocorreu justamente nos tratamentos em que o IF foi baixo. A relação entre diminuição de clorofila *a* e aumento de feofitinas é fundamentada no fato de que em condições adversas a clorofila é convertida em feofitina em decorrência da remoção de Mg^{+2} (BORRMANN, 2009)

Se por um lado plântulas de mangaba crescida sob alta irradiância (150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) tiveram danos à maquinaria fotossintética pelo excesso de energia, por outro lado, a estabilidade do aparato fotossintético de plântulas crescidas na irradiância mais baixa (12 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) verificada por meio das avaliações de pigmentos e de fluorescência, não foi suficiente para proporcionar maiores taxas fotossintéticas e índices de crescimento superiores aos demais tratamentos. A baixa densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, diminui o nível de excitação do FS II, influenciando a expressão dos genes envolvidos na morfologia foliar (SULTAN, 2010). A baixa irradiância também altera a concentração de carboidratos nos tecidos das plantas, o que influencia a expressão de genes que induzem a morfologia das brotações, a fotossíntese, o armazenamento de carbono, e conseqüentemente o crescimento (BALLARÉ, 2009; SULTAN, 2010). Os menores valores de área foliar observados nos extremos de irradiância, 12 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, corroboram com as menores taxas fotossintéticas observadas nessas irradiâncias.

Embora plantas sob condições limitantes de disponibilidade de luz invistam na expansão foliar para promover uma maior interceptação da energia luminosa (LARCHER, 2002), no entanto, esta resposta não foi observada na irradiância de 12 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Este resultado indica que esta irradiância está abaixo do ótimo para o desenvolvimento de plântulas de mangaba *in vitro*. Já nas plântulas cultivadas sob as irradiâncias de 25 e 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ocorreram os maiores valores de área foliar em

relação aos demais tratamentos. Em *Lippia filifolia*, cultivada em meio MS com adição de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, incrementos de irradiância acima de $40 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ promoveram o aumento da área foliar, enquanto na ausência de ANA no meio de cultivo, essas respostas não foram observadas (IAREMA, 2004), indicando que outros fatores ambientais e/ou endógenos, como fitohormônios, estão relacionados a expansão foliar.

A área foliar específica representa a razão entre a área foliar e o peso da folha. É uma variável altamente plástica e dependente das condições ambientais, principalmente a luz (DAHLGREN et al., 2006). Alguns estudos têm demonstrado que os menores valores dessa característica são encontrados, geralmente, em condições de alta luminosidade (MARKESTEIJN et al.; 2007, SARIJEVA et al., 2007). Maiores valores da AFE, encontrados para as folhas de sombra, demonstram um menor investimento na lignificação de tecidos como epiderme e cutícula. Assim espécies crescendo em condição de sombreamento investem menos na espessura e lignificação destes tecidos (ROSSATO et al., 2010). Os altos valores de AFE, em plantas sob baixa irradiância, assim como, os baixos valores em plântulas crescidas sob alta irradiância, observados neste estudo, indicam estratégias destas plântulas em otimizar a captação da energia luminosa.

O maior comprimento das plântulas nas menores irradiâncias é uma resposta típica de plantas crescidas em ambiente com restrição de luz. Segundo Sultan, (2010) a alongação do tronco da planta, associada com expansão de pecíolos e reduzida ramificação fazem parte de mecanismos da planta para se ajustarem a uma condição de baixa disponibilidade luminosa.

A massa seca do material vegetal tem sido uma das mais confiáveis características utilizadas para avaliar o crescimento e a multiplicação *in vitro* das plantas (AMÂNCIO et al., 1999; SANTOS, 2007). Os resultados da massa seca da parte aérea (MSPA) observadas neste estudo foram coerentes com as demais características avaliadas, inclusive com a taxa fotossintética. Os menores valores da MSPA e também da taxa fotossintética, área foliar, entre outros, foram observados justamente nos extremos de irradiância (12 e $150 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) utilizados nesse estudo. O manejo de luz, como aumento da oferta de densidade de fluxo de fótons pode se mostrar uma estratégia importante para o desempenho das plântulas *in vitro*. Neste trabalho as irradiâncias entre 50 e $75 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foram as mais favoráveis ao crescimento das

plântulas de mangaba. No entanto, o manejo da luz por si só, pode não promover ganhos significativos na multiplicação *in vitro*.

Segundo Lian et al. (2002), em estudo com *Limonium* 'Misty Blue' avaliado aos 28 dias de cultivo *in vitro*, observaram que apenas o aumento da irradiância de 50 para 100 e 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não proporcionaram incrementos na taxa fotossintética. No entanto, o enriquecimento de CO_2 na sala de crescimento para uma concentração de 1500 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, e a utilização de filtros porosos nos frascos, resultou em plântulas com taxa fotossintética superiores em mais de 100% nas plântulas crescidas na irradiância de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em relação àquelas crescidas sob irradiância de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O suprimento contínuo de CO_2 numa concentração de 300 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ em sistema de fluxo de ar direto no frasco de cultivo de plântulas de *Actinidia deliciosa* também gerou taxas fotossintéticas consideravelmente superiores em relação àquelas de ambiente sem fluxo de ar (ARIGITA et al., 2002).

Portanto, manejos que integrem disponibilização de luz, oferta adequada de CO_2 e controle de umidade relativa, podem otimizar as respostas de mangaba, bem como de outras espécies cultivadas *in vitro*.

As metodologias propostas no capítulo I mostraram exequíveis nas avaliações de cultivo *in vitro*, possibilitando avaliar de maneira coerente as respostas ecofisiológicas de plântulas de mangaba crescidas *in vitro* sob diferentes níveis de irradiâncias.

5. CONCLUSÕES

As plântulas de mangaba foram responsivas aos tratamentos com diferentes níveis de irradiância.

Plântulas crescidas em irradiâncias de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tiveram as melhores respostas de taxa fotossintética e os melhores índices de área foliar e de matéria seca da parte aérea. O efeito positivo desse ambiente espectral sobre o aparato fotossintético das plântulas *in vitro* foi confirmado pelas avaliações de fluorescência da clorofila *a* e do conteúdo de pigmentos cloroplastídicos.

As menores taxas fotossintéticas juntamente com o menor rendimento de matéria seca da parte aérea, entre outras características avaliadas, indicaram que os extremos de irradiância, 12 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não foram adequados para o cultivo *in vitro* de mangaba.

Os ajustes dos modelos de regressão indicam que irradiâncias entre 50 e $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ são as mais adequadas para o cultivo *in vitro* convencional de mangaba.

De modo geral, os resultados confirmam que o método ajustado no Capítulo I, para a medição da taxa fotossintética em plântulas *in vitro*, é eficaz, podendo ser utilizado para contribuir para a otimização das condições de crescimento de plântulas *in vitro*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, R. S. Fatores de estresse na germinação de sementes e na propagação *in vitro* de *Passiflora edulis* SIMS f. *flavicarpa* DEGENER. 2006. 166f. **Tese** (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2006.

AMÂNCIO, S.; REBORDÃO; J. P.; CHAVES, M., M. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: photosynthetic competence and carbon allocation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 58, p.31–37, 1999.

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

BALLARÉ, C. L.; Illuminated behaviour: phytochrome as a key regulator of light foraging and plant anti-herbivore defence. **Plant Cell & Environment**, 32, p.713-725, 2009.

BATAGIN, K. D. Análises anátomo-fisiológicas de folhas de pupunheira cultivadas *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo* visando otimizar o protocolo de aclimatização. 2008. 107p. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2008.

BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, 102, 425-432, 1995.

BILGER, W.; BJÖRKMAN, O. Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynthesis Research**, 25, p.173-185, 1990.

BJÖRKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, 170, p.489–504, 1987.

BORRMANN, D. Efeito do déficit hídrico em características químicas e bioquímicas da soja e na degradação da clorofila, com ênfase na formação de metabólitos incolores. 2009. 107f. **Tese** (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

CHRISTOV, I.; STEFANOV, D.; VELINOV, T.; GOLTSEV, V.; GEORGIEVA, K.; ABRACHEVA, P., GENOVA, Y.; CHRISTOV, N. Study on symptomless leaf infection in grapevine plants grown *in vitro* with grapevine leafroll associated virus 3. **Journal Plant of Physiology**, 164, p.1124-1133, 2007.

DAHLGREN, J. P.; ERIKSSON, O.; BOLMGREN, K.; STRINDELL, M.; EHRLÉN, J. Specific leaf area as a superior predictor of changes in field layer abundance during forest succession. **Journal of Vegetation Science**, 17, p.577-582, 2006.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Multiplicação fotoautotrófica de mirtilo através do uso de luz natural. **Revista Brasileira de Fruticultura**. [online], 30(2), p. 482-487, 2008.

DANKOV, K. G.; DOBRIKOVA, A. G.; UGHY, B.; BOGOS, B.; GOMBOS, Z. APOSTOLOVA, E. L. LHCII organization and thylakoid lipids affect the sensitivity of the photosynthetic apparatus to high-light treatment. **Plant Physiology and Biochemistry**, 30, p.1-7, 2011.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS III, W. W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 43, p. 599-626, 1992.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. **American Society for Horticultural Science**, 109, p.177–181, 1984.

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

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.-M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, 990, p.87-92, 1989.

IAREMA, L. *Lippia filifolia* Mart. (Verbenaceae) cultivada *in vitro*: Anatomia foliar, efeito de irradiâncias e de fitorreguladores. 2004. 85f. **Dissertação** (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2004.

JEON, M. W.; ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Effect of photon flux density on the morphology, photosynthesis, and growth of a CAM orchid, *Doritaenopsis* during post-micropropagation acclimatization. **Plant Growth Regulation**, 45, p.139–147, 2005.

JO, E. A.; TEWARI, R. K.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Effect of photoperiod and light intensity on *in vitro* propagation of *Alocasia amazonica*. **Plant Biotechnology Reports**, 2, p.207–212, 2008.

JOHNSON, M. P.; PÉREZ-BUENO, M. L.; ZIA, A.; HORTON, P.; RUBAN, A. V. The zeaxanthin-independent and zeaxanthin-dependent qE components of non-photochemical quenching involve common conformational changes within the photosystem II antenna in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, DOI 10.1104/p.109.129, 2008.

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

KIM, J. S.; YU, D. J.; KIM, T.; LEE, H. J.; Growth and photosynthetic characteristics of blueberry (*Vaccinium corymbosum* cv. Bluecrop) under various shade levels. **Scientia horticulturae**, 129, p.486-492, 2011.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. In vitro aerial environments and their effects on growth and development of plants. KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A.; **Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropopagation as a new micropropagation and transplant production system**. Springer. Netherlands. 2005. 33-43. 316 p.

KOZAI, T.; ZOBAYED, S. M. A. **Aclimatization**. In encyclopaedia of cell technology. Section A. Ed. **R Spier**. p.1-12, 2001.

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

KUBOTA, C. Concepts and background of photoautotrophic micropagation. **Molecular Breeding of Woody Plants**, p.325-334, 2001.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2002.

LEE, S. H.; TEWARI, R. K.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Plantlets. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 90, p.141–151, 2007.

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 Horticulturae**, 95, p.239–249, 2002.

LONG, S. P., HUMPHRIES, S.; FALKOWSKI, P. G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 45, p. 633-662, 1994.

MARKESTEIJN, L.; POORTER, L.; BONGERS, F. Light-dependent leaf trait variation in 43 tropical dry forest tree species. **American Journal of Botany** 94(4), p.515-525, 2007.

MOHAMED, G. H.; BINDER, W. D.; GILLES, L. Chlorophyll fluorescence: a review of its practical forestry applications and instrumentation. **Scandinavian Journal of Forage Research**, 10, p.383-410, 1995.

MURATA, N.; TAKAHASHI, S.; NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1767(6), p.414-421, 2007.

MURCHIE, E. H.; HORTON, P. Acclimation of photosynthesis to irradiance and spectral quality in British plant species: chlorophyll content, photosynthetic capacity and habitat preference. **Plant Cell & Environment**, 20, p.438–448, 1997.

NEWELL, C. In vitro soil-less (IVS) rooting medium, **Tese** (Doctor of Philosophy of Murdoch University), 2006.

NIYOGI, K. K.; SHIH, C.; CHOW, W. S.; POGSON, B. J.; DELLAPENNA, D.; BJÖRKMAN, O. Photoprotection in a zeaxanthin and lutein deficient double mutant of *Arabidopsis*. **Photosynthesis Research**, 67, p.139-45, 2001.

ORTÍZ, C. E. R.; Avaliação fisiológica de plantas de urucum *Bixa orellana* L. 2004. 100f. **Tese** (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2004.

PALHARES, D.; FRANCO, A. C.; ZAIDAN, L. B. P. Respostas fotossintéticas de plantas de Cerrado na estação seca e chuvosa. **Revista Brasileira de Biociências**. 8(2), p.213-220, 2010.

PANDEY, D. M.; KANG, K-H.; YEO, U-D. Effects of excessive photon on the photosynthetic pigments and violaxanthin de-epoxidase activity in the xanthophylls cycle of spinach leaf. **Plant Science**, 168, p.161–166, 2005.

PARK, Y-I.; CHOW, W. S.; ANDERSON, J. M.; HURRY, V. M. Differential susceptibility of photosystem II to light stress in light-acclimated pea leaves depends on

the capacity for photochemical and non-radiative dissipation of light. **Plant Science**, 115, p.137–149. 1996.

POSPÍŠILOVÁ, J.; SOLÁROVÁ, J.; ONDREEJ, M. The photosynthetic characteristics during the micropropagation of tobacco and potato plants. **Photosynthetica**, 22, p.205-213, 1988.

POWLES, S. B. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. **Annual Review of Plant Physiology**, 35, p.15-44, 1984.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatisation of micropropagated plants to the greenhouse and field. In “Micropropagation: Technology and application. (Eds PC Debergh, R.H. Zimmerman). **Kluwer Academia Publishers Dordrecht**. p. 77-94, 1991.

RONEN, R.; GALUN, M. Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. **Environmental and Experimental Botany**, 24(3), p. 239-245, 1984.

ROSSATTO, D. R.; TAKAHASHI, F. S. C.; SILVA, L. C. R.; FRANCO, A. C. Características funcionais de folhas de sol e sombra de espécies arbóreas em uma mata de galeria no Distrito Federal, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**. 24(3), p.640-647, 2010.

RUBAN, A. V. Plants in light. **Communicative & Integrative Biology**. 2(1), p.50-55; 2009.

SAEG 9.1. **Sistema para Análises Estatísticas - SAEG**. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 2007. Versão 9.1.

SANTOS, R. P. Respostas morfofisiológicas de videiras cultivadas sob diferentes condições *in vitro*. 2007. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.

SANTOS, R. P.; CRUZ, A. C. F.; IAREMA, L.; KUKI, K. N. ; OTONI, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, 55(4), p.356-364, 2008.

SARIJEVA, G.; KNAPP, M.; LICHTENTHALER, H. K. Differences in photosynthetic activity, chlorophyll and carotenoid levels, and in chlorophyll fluorescence parameters in green sun and shade leaves of *Gingko* and *Fagus*. **Journal of Plant Physiology**, 164, p.950-955, 2007.

SAVITCH, L. V.; MASSACCI, A.; GRAY, G. R.; HUNER, N. P. A. Acclimation to low temperature or high light mitigates sensitivity to photoinhibition: roles of the Calvin cycle and the Mehler reaction. **Australian Journal Plant Physiology**, 27 p.253–264, 2000.

SCHREIBER, U. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. **Photosynthesis Research**, 9, p.261–272, 1986.

SNEL, J. F. H.; VAN KOOTEN, O. The use of chlorophyll fluorescence and other noninvasive spectroscopic techniques in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, 25, p.146–332, 1990.

SULTAN, S. E. Plant developmental responses to the environment: eco-devo insights. **Current Opinion in Plant Biology**, 13, p.96-101, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

VENTURA, G. M. Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, em diferentes meios de cultura e irradiâncias. 2007. 122f. **Tese** (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.

VIEIRA NETO, R. D. Respostas de mudas de mangabeira a fontes e doses de fósforo em solo de baixada litorânea. 2010. 27f. **Dissertação** (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Sergipe. São Cristovão, 2010.

VIÑA, G. DE LA.; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S. P.; MITCHELL, V. L.; PARRY, M. A.; LAWLOR, D. W. Effects of CO₂ and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. **Plant Physiology & Biochemistry**, 37: p.587-595, 1999.

WALTERS, R. G.; SHEPHARD, F.; ROGERS, J. J. M.; ROLFE, S. A.; HORTON, P. Identification of mutants of *Arabidopsis* defective in acclimation of photosynthesis to the light environment. **Plant Physiology**, 131, p.472-481, 2003.

WALTERS, R. G. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. **Journal of Experimental Botany**, 56, p.435-447, 2005.

WELBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* e *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144, p.307-313, 1994.

YOON, Y. J.; MOBIN, M.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Impact of *in vitro* CO₂ enrichment and sugar deprivation on acclimatory responses of *Phalaenopsis* plantlets to *ex vitro* conditions. **Environmental and Experimental Botany**, 65, p.183-188, 2009.

CONCLUSÃO GERAL

O método ajustado para a medição da taxa fotossintética é eficaz para condições de crescimento de plântulas *in vitro*.

O conjunto analisador de gases no infravermelho adotado se mostrou sensível às respostas de assimilação de CO₂ em plântulas de hortelã-do-campo (*Hyptis marruboides* Epling) e de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) cultivadas *in vitro*

Plântulas de hortelã-do-campo e de mangaba cultivadas *in vitro*, possuem aparato fotossintético funcional e, além disso, respondem às variações das condições de medição, exibindo valores consideráveis de taxa de assimilação de CO₂ sob condições de irradiância de saturação.