The background of the entire page is a close-up photograph of the leaves of an Agave attenuata plant. The leaves are long, lanceolate, and have a distinct wavy or serrated margin. They are arranged in a fan-like pattern, radiating from a central point. The color of the leaves is a pale, silvery-green, and they have a smooth texture. The lighting is soft, highlighting the veins and the edges of the leaves.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

**ASPECTOS MORFO-FISIOLÓGICOS E METABÓLICOS  
DURANTE A FASE DE PRÉ-ACLIMATIZAÇÃO  
E ACLIMATIZAÇÃO DE  
*Agave attenuata* Salmy-Dyck**

**ELAINE BUCH**

Florianópolis, SC  
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS



**ASPECTOS MORFO-FISIOLÓGICOS E METABÓLICOS  
DURANTE A FASE DE PRÉ-ACLIAMATIZAÇÃO  
E ACLIAMATIZAÇÃO DE  
*Agave attenuata* Salmy-Dyck**

**ELAINE BUCH**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

**Co-orientador:** Dr. Gilmar Roberto Zaffarri

Florianópolis, SC.  
2005

**ASPECTOS MORFO-FISIOLOGICOS E METABÓLICOS  
DURANTE A FASE DE PRÉ-ACLIAMATIZAÇÃO  
E ACLIAMATIZAÇÃO DE  
*Agave attenuata* Salmy-Dyck**

**ELAINE BUCH**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra  
CCA/USFC

---

Dr. Gilmar Roberto Zaffari  
EPAGRI/SC

---

Prof. Dr. Enio Luiz Pedrotti  
CCA/UFSC

---

Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva  
CCA/UFSC

Florianópolis, novembro de 2005

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela sua força, pois sem sua presença, minha vida não teria amor, meu caminho não teria destino, e meus ideais não teriam sentido.

Ao **Dr. Gilmar Roberto Zaffari** pelo incentivo a ingressar no programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da UFSC e apoio moral e profissional para a realização deste estudo, muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra**, por aceitar gentilmente a contribuir com a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Ao **Dr. Henri Stuker** pela ajuda das análises estatísticas, sua amizade e paciência no qual fora importante para a concretização deste estudo.

Ao **Dr. Francisco Dechamps** pela colaboração nas curvas de todas as análises bioquímicas.

Ao **Lírio Dal Vesco**, hoje me faltam palavras para expressar minha eterna gratidão de sua amizade, pelo seu apoio, pelo senso de justiça que sem dúvida lhe dignifica muito mais como ser humano do que muitas pessoas. Muito obrigada por tudo, jamais esquecerei o seu respeito e carinho, **MEU MAIS SINCERO OBRIGADA.**

Ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV): **Luisa, Felipe, Kadine, Elaine Stolf** em especial à **Gabriela Claudia Cangahuala Inocente** nas realizações das análises de proteínas totais, carboidratos solúveis totais e amidos.

E principalmente a **Karine e Juliana Vieira** pela amizade e coleguismo, que fora importante, pois na vida infelizmente encontramos poucas pessoas que podemos considerar amigos e vocês são "**AMIGAS**" eu desejo o melhor, contem sempre comigo.

Agradeço aos colegas: **Maris Gaio, Maurício Lenzi, Tália Costa, Taíza**, pelo apoio moral, valeu.

Ao **Marcelo Borghezan** na realização das análises de clorofilas e área foliar, muito obrigada.

A professora **Dra. Mariza Santos** do departamento de botânica pela amizade, confiança, apoio e força moral e pelos ensinamentos para as análises de estômatos.

A professora **Dra. Rosete Pescador** pelo auxílio na realização das análises de aminoácidos totais.

Ao senhor **Gilberto Wenner** pelas caronas e por ceder o centro de treinamento para passar as inúmeras noites de trabalho na Epagri.

A dona **Naide** pela sua preocupação e lanches inesperados durante a madrugada.

Aos **guardas da Epagri** que foram grandes amigos durante as noites de trabalho.

Um obrigado a Epagri de Itajaí que permitiu a realização da parte experimental do trabalho em especial ao **Zaffari e Miura**.

Ao laboratório de bionotecnologia da Epagri, aos colegas de trabalho **Janice, a laboratorista Crhis, aos colegas Marina, Rafa (china)**.

Aos pesquisadores **Alexandre e Juarez Müller** pela sua amizade e respeito.

Ao Prof. **Dr. Marcelo Maraschin**, obrigado pela atenção no aperfeiçoamento do trabalho através da inclusão das análises de compostos fenólicos.

A **Berninha** pela sua amizade, obrigada pela prestatividade e carinho.

A minha avó **EMÍLIA**, que me apoiou em todos os momentos da minha vida, **MUITO, MUITO, OBRIGADA**.

E a minha mãe **NEUSA MARIA BUCH** que dedicou sua vida a nos criar e educar para que consigamos transformar nossos sonhos em realidade **MUITO OBRIGADA**.

Agradeço a **MIM** pela persistência de não desistir do meu crescimento profissional e pessoal e que devemos acreditar em nós mesmos antes de tudo, para que possamos concretizar nossos ideais.

Enfim, a todos que contribuíram de forma positiva para que este dia especial chegasse.

*“As plantas e suas flores são como as pessoas.  
Têm seus defeitos e virtudes.  
Respeitá-las e conviver com elas faz partes de nossas vidas”.*

(Hermes Moreira de Souza)

## **DEDICO**

Ao meu noivo **DANIEL OSÉIAS SEZERINO**, agradeço todo o seu amor, carinho, paciência, pelos momentos de descontração, paz de espírito e incentivo e principalmente respeito. Lembre-se sempre, você **É LUZ E ESPERANÇA**. Agradeço a Deus pela sua vida e por ter tido a benção de encontrá-lo, que Deus te ilumine do amanhecer ao por-do-sol, **TE AMO, MUITO**.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	3
<b>CAPÍTULO I: CRESCIMENTO DE <i>AGAVE ATTENUATA</i> SALMY-DYCK DURANTE A FASE DE PRÉ-ACLIMATIZAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO .....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
2.1 Local de Execução .....	10
2.2 Condição das Plântulas Durante a Fase de Pré-Aclimatização .....	10
2.3 Condição das Plântulas Durante a Fase de Aclimatização .....	11
2.4 Avaliações .....	11
2.5 Características Morfológicas .....	11
2.6 Análise Estatística .....	12
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>13</b>
3.1 Altura .....	13
3.2 Massa Fresca e Seca.....	18
3.3 Taxa de Sobrevivência.....	20
3.4 Taxa de Enraizamento .....	22
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>25</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO II: ASPECTOS MORFO-FISIOLÓGICOS DE <i>AGAVE ATTENUATA</i> SALMY-DYCK DURANTE A FASE DE PRÉ-ACLIMATIZAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>31</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>32</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>33</b>



<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
2.1 Local de Execução do Projeto.....	35
2.2 Condição das Plântulas Durante a Fase de Pré-Aclimatização .....	35
2.3 Condição das Plântulas Durante a Fase de Aclimatização .....	36
2.4 Avaliações .....	36
2.5 Avaliação da Área Foliar .....	36
2.6 Densidade Estomática .....	37
2.7 Densidade e Características Biométricas dos Estômatos .....	37
2.8 Dimensões das Células-Guarda e Ostíolo Estomático.....	38
2.9 Determinação dos Níveis de Ceras Totais .....	38
2.10 Determinação de Clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e Totais .....	39
2.11 Análise Estatística .....	40
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
3.1 Área Foliar.....	41
3.2 Densidade Estomática .....	44
3.3 Densidade e Características Biométricas dos Estômatos .....	47
3.4 Ceras totais .....	51
3.5 Clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e Totais .....	54
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>
<b>CAPÍTULO III: METABOLISMO DE AGAVE ATTENUATA SALMY-DYCK DURANTE DURANTE A FASE DE PRÉ-ACLIMATIZAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>66</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>67</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>70</b>
2.1 Local de Execução do Projeto.....	70
2.2 Condição das Plântulas Durante a Fase de Pré-Aclimatização .....	70
2.3 Condição das Plântulas Durante a Fase de Aclimatização .....	71
2.4 Avaliações .....	71
2.5 Determinação dos Níveis de Açúcares Totais.....	71
2.6 Determinação dos Níveis de Proteínas Totais .....	72
2.7 Determinação dos Níveis de Amidos .....	73
2.8 Determinação dos Níveis de Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) .....	73
2.9 Determinação dos Aminoácidos Totais .....	74
2.10 Determinação dos Níveis de Amônia (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ).....	75
2.11 Fenóis Totais.....	76
2.12 Análise Estatística .....	76

<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
3.1 Carboidratos Solúveis Totais.....	77
3.2 Proteínas e Aminoácidos Totais.....	81
3.3 Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) e Amônia (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ).....	85
3.4 Fenóis Totais.....	88
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>92</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>98</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA .....	Bovine Serum Albumine (Albumina Bovina)
DMSO .....	Dimetil-sulfóxido
MS .....	Murashige & Skoog, 1962
$\text{NH}_4^+$ .....	Amônio
$\text{NO}_3^-$ .....	Nitrato
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ .....	Nitrato de Amônio
NaOH .....	Hidróxido de Sódio
HCL .....	Ácido Clorídrico
$\text{H}_2\text{SO}_4$ .....	Ácido Sulfúrico
$\text{KNO}_3$ .....	Nitrato de Potássio
MCW .....	Metanol:Clorofórmio:Água
SDS .....	Dodecil Sulfato de sódio
CBB .....	Azul brilhante de Coomassie
AT-O .....	Azul de Toluidina
MF .....	matéria fresca
MS .....	matéria seca
% .....	Percentagem média
°C .....	Graus centígrados
rpm .....	rotações por minutos
$\text{g.L}^{-1}$ .....	gramas por litro
$\text{mg.L}^{-1}$ .....	miligrama por litro
mL .....	mililitros
$\mu\text{L}$ .....	microlitros
$\mu\text{M}$ .....	micromoles
$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$ .....	micromol por metro quadrado por segundo
PMSP .....	phenylmethilsulfonyl fluoride
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	Sulfato de amônia
$\text{Na}_2\text{HPO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ .....	Fosfato de sódio monobásico

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Meios de cultura utilizados durante a fase de pré-aclimatização <i>in vitro</i> em explantes de <i>Agave attenuata</i> Salmy-Dyck .....	10
<b>Tabela 2:</b>	Altura de plântulas de <i>Agave attenuata</i> Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%).....	16
<b>Tabela 3:</b>	Produção de biomassa (Massa Fresca e Seca) de plântulas de <i>Agave attenuata</i> Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%). .....	19
<b>Tabela 4:</b>	Meios de cultura utilizados durante a fase de pré-aclimatização <i>in vitro</i> em explantes de <i>Agave attenuata</i> Salmy-Dyck .....	36
<b>Tabela 5:</b>	Área foliar e Densidade Estomática de plântulas de <i>Agave attenuata</i> Salmy-Dyck micropropagada em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2 %). .....	42
<b>Tabela 6:</b>	Funcionalidade Estomática: comprimento da célula guarda (CCG), comprimento do ostíolo estomático (COE), largura da célula guarda (LCG), largura do ostíolo estomático (LOE) de plântulas de <i>Agave attenuata</i> Salmy-Dyck micropropagadas em meio de cultura MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%) .....	49
<b>Tabela 7:</b>	Ceras epicuticulares de plântulas de <i>Agave attenuata</i> Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%) .....	53
<b>Tabela 8:</b>	Clorofila <i>a,b</i> e totais de plântulas de <i>Agave attenuata</i> Salmy Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%) .....	56
<b>Tabela 9:</b>	Meios de cultura utilizados durante a fase de pré-aclimatização <i>in vitro</i> em explantes de <i>Agave attenuata</i> Salmy-Dyck .....	71
<b>Tabela 10:</b>	Açúcares Solúveis Totais e Amido em plântulas de <i>Agave attenuata</i> Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%).....	79
<b>Tabela 11:</b>	Proteínas e Aminoácidos Totais de plântulas de <i>Agave attenuata</i> Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%) .....	83
<b>Tabela 12:</b>	Níveis de Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) e Amônia (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) de plântulas de <i>Agave attenuata</i> Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%) .....	87
<b>Tabela 13:</b>	Fenóis Totais em plântulas de plântulas <i>Agave attenuata</i> Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS com 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%) .....	90

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** *Agave attenuata* Salmy-Dyck aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em resposta aos tratamentos: (a) T1 - meio MS (50%) sem sacarose, (b) T2 – meio MS (100%) sem sacarose, (c) T3 - meio MS (50%) com 1% de sacarose, (d) T4 – meio MS (100%) com 1% de sacarose, (e) T5 - meio MS (50%) com 2% de sacarose, (f) T6 - meio MS (100%) com 2% de sacarose ..... 15
- Figura 2:** Altura de plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%), após 20 dias de aclimatização. As setas indicam morte dos explantes ..... 17
- Figura 3:** Taxa de sobrevivência de plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%), após 20 dias de aclimatização. As setas indicam morte dos explantes ..... 20
- Figura 4:** Taxa de enraizamento de plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%), após 20 dias de aclimatização. As setas indicam morte dos explantes ..... 23
- Figura 5:** Densidade estomática de plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck ao final da aclimatização, sob os tratamentos: (A) T5 - meio MS 50% com sacarose 2%, (B) T6 - meio basal MS 100% com sacarose 2%..... 45
- Figura 6:** Funcionalidade estomática de plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck : (A) - meio MS (50%) sem sacarose (fase *in vitro*), (B) - meio MS (100%) sem sacarose (fase *in vitro*), (C)- meio MS (100%) com sacarose (2%) (fase *in vitro*), e (D) fase final da aclimatização plantas oriundas do meio MS 100% com 2% de sacarose. Observar a forma elíptica nos estômatos ..... 50

## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 a 550.000 (Dias, 1996). Por sua extensão geográfica, o país apresenta uma amplitude muito grande de clima e solos, o que decisivamente favorece a implantação de uma floricultura diversificada, representada tanto por espécies tradicionalmente cultivadas, como por sua flora natural extremamente variada e ainda pouco explorada comercialmente (CASTRO & TUCCI, 1983).

A floricultura no Brasil não é uma atividade nova, pois há viveiros quase seculares. A novidade, entretanto é a dinâmica nacional em torno dessa atividade, com crescente exigência na profissionalização do setor (KÂMPF, 1997). A produção de flores ainda é uma atividade econômica em expansão por parte de agricultores que centralizam o mercado ornamental como uma econômica importante em função dos produtores envolvidos e pela produção comercializada (ARRUDA et al., 1996).

A produção de flores no mercado nacional vem crescendo na ordem de 20% ao ano, podendo ser considerada como um dos mais promissores setores da nossa economia agrícola (BONGERS, 2002). A horticultura ornamental se caracteriza atualmente por possibilitar um fluxo de emprego, gerando renda a pequenos e médios produtores, bem como de recursos como à incorporação de inovações tecnológicas, a abertura de mercado e a integração de processos produtivos para atender a demanda (AKI & PEROSA, 2002).

A exemplo do que já aconteceu nos países do primeiro mundo, o cultivo de flores passa por momentos de mudanças em toda a sua cadeia produtiva (AKI, 2000). De um modo geral, a produção de flores em todo o país ainda segue os padrões tradicionais com baixos índices de capitalização e tecnologia. No entanto, caminhamos para uma nova etapa, onde a tecnificação e a profissionalização são condições básicas para a participação num mercado globalizado e altamente competitivo (BONGERS, 2002). Competitividade é aqui entendida como a capacidade sustentável de sobreviver, e de preferência crescer nos mercados concorrentes ou em novos mercados (PEROSA, 2002).

Em um mercado exigente e altamente competitivo, os produtores se deparam com uma necessidade de profissionalizar-se. Assim, técnicas de cultura de

tecidos vegetais compreendem ferramentas importantes para o melhoramento massal de genótipos de interesse. Além de proporcionar uma elevada taxa de multiplicação, estas técnicas possibilitam a rápida propagação de material vegetal e sua manutenção para produção em qualquer época do ano (FORDHAM et al., 1982).

A propagação de plantas de agaves pelo cultivo *in vitro* tem sido descrita por diversos autores Nikam (1997), Santacruz-Ruvalcaba et al. (1999); Kartosentono et al. (2002). No entanto, a sobrevivência das plantas após a transferência para a aclimatização é normalmente um problema (DESJARDINS, 1995). Pois, plantas provenientes de sistemas de micropropagação desenvolvem-se sob condições controladas de crescimento, tornando-se heterotróficas com baixa ou nenhuma atividade fotossintética (VAN HUYLENBROECK & DEBERGH, 1996). Este problema geralmente origina-se de uma falta de controle de perda hídrica, devido a uma alta umidade relativa encontrada *in vitro* (PREECE & SUTTER, 1991), e de uma baixa atividade fotossintética (POŠPÍŠILOVÁ et al., 1992), diminuindo a eficiência da propagação e aumentando os custos de produção por métodos de micropropagação.

Estudos sobre processos de aclimatização em *Agave attenuata* Salmy-Dyck ainda são incipientes e pouco esclarecedores. Neste sentido, um estudo sobre as características morfo-fisiológicas e bioquímicas desta espécie permitirá uma avaliação sobre a utilização das fontes de nitrogênio e carbono na produção de biomassa fresca, a sobrevivência de plantas obtidas *in vitro*, assim como um acompanhamento no comportamento fotoautotrófico, densidade e funcionalidade estomática das folhas (LIMA DA SILVA & DOAZAN, 1995), concentração de clorofila *a*, *b* e totais (RESTANGO et al., 1995; DESJARDINS, 1995), determinações no conteúdo de ceras totais, (ROBERTS et al., 1990) e possíveis alterações na concentração de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e aminoácidos totais (BROADLY, 2000; CORRUIZI & LAST, 2000), proteínas totais (BRADFORD, 1976), e a formação de fenóis totais (MARIGO & BOUDET, 1979; BOLWELL et al., 1985; MATO et al., 1988).

Este trabalho visa contribuir para um processo de aclimatização mais eficiente, otimizando a produção de mudas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck originadas de sistemas de micropropagação. Dependendo da consolidação e desenvolvimento da tecnologia na cultura de células vegetais, essas técnicas poderão se tornar verdadeiras fontes de oportunidades para Santa Catarina desenvolver sustentabilidade de mudas no elo da cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais, em relação aos demais pólos produtivos já existentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKI, AUGUSTO. Gestão de oportunidades no mercado de flores e plantas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 6, n.1/2, p.15 - 17, 2000.
- AKI, AUGUSTO.; PEROSA, J. M. Y. Aspectos da produção e consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 8, n.1/2, p.13 - 23, 2002.
- ARRUDA, S. T.; OLIVETTE, M. P. A.; CASTRO, C. E. F. Diagnóstico da floricultura no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 2, n. 2, p.1 - 18, 1996.
- BOLWELL, G.; ROBBINS, M.; DIXON, R. Metabolic changes in elicitor-treated bean cells. Enzymic responses associated with rapid changes in cell wall components. **Europ. J. Biochemistry**, v.148, p. 571 - 578, 1985.
- BONGERS, F. J. G. A distribuição de flores e plantas ornamentais e o sistema eletrônico integrado de comercialização. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 8, n.1/2, p. 93-102, 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p, 248 - 254, 1976.
- BROADLY, M. R.; ESCOBAR-GUTIÉRREZ, A. J.; BURNS, A. & BURNS, I. G. What are the effects of nitrogen deficiency on growth components of lettuce? **New Phytology**, v.147, p. 519 - 526, 2000.
- CASTRO, C. E. F.; TUCCI, M. L. Floricultura: a hora e a vez da pesquisa. **Revista casa da Agricultura**, Campinas, v. 3, p.18 - 25, 1983.
- CORUZZI, G. & LAST, R. Aminoacids. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W. & JONES, R. (Eds.) **Biochemsmistry & Molecular Biology of Plants**, American Society of plant Physiologists, 2000.
- DESJARDINS, Y. Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plants and their effect on acclimatization. In: CARRE, F. & CHAGVARDIEFF, P. (Eds.) **Ecophysiology and Photosynthetic in vitro cultures**, Cadarache, CEA, p. 145 - 160, 1995.
- DIAS, B. F. S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**, Campinas: André Tosello, p. 10, 1996.
- FORDHAM, I.; STIMART, D. P.; ZIMMERMAN, R. H. Axillary and adventitious shoot proliferation on *Exbury azaleas in vitro*. **HortScience**, v.17, p. 738 - 739, 1982.
- KAMPF, A. N. A floricultura brasileira em números. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n.1, p.1 - 7, 1997.
- KARTOSENTONO, S.; INDRAYANTO, G. & ZAINI, N. C. The uptake of copper ions by cell suspension cultures of *Agave amaniensis*, and its effect on the growth, amino acids and hecogenin content. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 68, p. 287 – 292, 2002.
- LIMA-DA-SILVA, A. & DOAZAN, J. P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à dès porte-greffes de Vigne *in vitro*. **J. Int. Science. Vigne Vin**, v. 29, p. 1 - 9, 1995.
- MARIGO, G. & BOUDET, A. Effect of an increase in the level of phenolic compounds on the auxin content and growt of *Lycopersicum esculatum*. **Z. Pflanzenphysiology**, v. 92, p. 33 - 38, 1979.



MATO, M.; RUA, M.; FERRO, E. Changes in levels of peroxidases and phenolics during root formation in vitis cultured *in vitro*. **Plant Physiology**. v.72, p. 84 - 88, 1988.

NIKAM, T. D. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 225 – 228, 1997.

PEROSA, Y. M. J. Participação brasileira no mercado internacional de flores e plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.8, n.1/2, p.1 - 15, 2002.

POSPÍŠILOVÁ, J.; SOLOROVA, J.; CATSKY, J. The use of vesicular-arbuscular mycorrhizal in Boston fern production: I. Effect of peat-based mixes. **HortScience**, v. 25, p. 183 - 189. 1992.

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

RESTANGO, M.; SCUBERT, A.; GRIBAUDO, I. Rubisco activity in Micropropagated Plantest. In: CARRE, F. & CHAGVARDIEFF, P. (Eds.) **Ecophysiology and Photosynthetic *in vitro* cultures**, Cadarache, CEA, p. 205 - 206, 1995.

ROBERTS, A. V.; SMITH, E. F.; MOTTLEY, J. The preparation on micropropagated plantles for transfer to soil without acclimatization. In: POLLARD, J. W.; WALTER, J. (Eds.) **Methods in molecular Biology, Plant Cell and Tissue Culture**. HUMANA PRESS. Clinton, New Jersey, USA, v. 6, p. 227 - 236, 1990.

SANTACRUZ-RUVALCABA, F.; GUTIÉRREZ-PULIDO, H. & RODRIGUEZ-GARAY, B. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 56, p. 163 – 167, 1999.

VAN HUYLENBROECK, J. M. & DEBERG, P. C. Physiology aspects in acclimatization of micropropagated plantles. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v. 2, n.3, p.136 - 141,1996.

## **Capítulo I**

# **Crescimento de *Agave attenuata* Salmy-Dyck Durante a Fase de Pré-Aclimatização e Aclimatização**

## RESUMO

*Agave attenuata* Salmy-Dyck é uma planta ornamental originária do México e a maior parte das suas mudas é propagada vegetativamente por brotos. Técnicas de micropropagação permitem a captura de ganhos genéticos e a obtenção rápida de um grande número de mudas com alta sanidade e em menor tempo. A cultura *in vitro* desta espécie utiliza o meio de cultura MS Murashige & Skoog (1962), suplementado com vários outros componentes. A composição do meio de cultura, principalmente as fontes e concentrações de N e C afetam as respostas morfogênicas obtidas. Assim, no presente trabalho estudou-se os efeitos do meio de cultura MS a 50 e 100% e de diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%) sobre algumas características das plântulas desta espécie nas fases de pré-aclimatização, visando aumentar as taxas de sobrevivência na fase de aclimatização. A análise das características de altura, produção de biomassa (massa fresca e seca), taxa de sobrevivência e enraizamento mostraram que as plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck foram dependentes das concentrações de nutrientes inorgânicos do meio MS e das concentrações de sacarose. Os melhores resultados foram obtidos em resposta ao meio MS a 100% suplementado com 2% de sacarose.

**Palavras-chave:** sacarose, nutrientes, dinâmica de crescimento, matéria seca, enraizamento.

## ABSTRACT

*Agave attenuata* is a plant largely employed in the ornamental originary from Mexico and most part of their plantlets are being mainly vegetatively propagated by shoots. Micropropagation techniques allow the capture and fixation of genetic gains as well as the fast production of a large number of stocks with high sanitary standards in short time. The tissue culture of this species relies on the use of MS Murashige & Skoog (1962), supplemented with other components. The composition of the culture medium mainly the sources and levels of C and N affects the *in vitro* morphogenic responses. In the present work it was studied the effects of the full and half-strength MS culture medium and different levels of sucrose (0, 1 e 2%) on some characteristics of plantlets in the phases of pre-acclimatization in order to improve the survival rates in the acclimatization phase. The analysis of the characteristics of height, biomass production (fresh and dry mass), survival rate, and rooting revealed that *Agave attenuata* Salmy-Dyck plantlets were dependent of the inorganic nutrient concentrations of MS culture medium and levels of sucrose. The best results were obtained in response to the full-strength MS culture medium supplemented with 2% sucrose.

**Key-words:** sucrose, sucrose, nutrients, rooting, fresh and dry mass.

## 1 INTRODUÇÃO

*Agavea attenuata* Salmy-Dyck, originária do México, é conhecida popularmente por agave-dragão ou tromba-de-elefante e pertence à família das Amaryllidaceae. É uma planta perene, semi-lenhosa, suas folhas são largas e lanceoladas, de cor verde acizentadas, cerosas, suculentas e espessas, formando uma roseta densa, com inflorescência ocasional de forma cônica-cilíndrica e recurvada (LORENZI, 2001).

Esta planta tem uso ornamental em canteiros e jardins, havendo uma grande demanda no mercado por parte dos produtores envolvidos na sua comercialização. Suas plantas são normalmente propagadas vegetativamente por brotos. Entretanto, esta técnica apresenta uma série de desvantagens, tendo em vista que sua propagação é lenta e de uma difícil adaptação climática.

A cultura *in vitro* torna-se uma ferramenta importante para satisfazer as necessidades de material de propagação livre de doenças, para a formação de matrizeiros, ou mesmo para e para a produção em larga escala em menor tempo, atendendo desta forma a demanda dos produtores de flores e das floriculturas (BANERAS, 1997). No entanto, poucos trabalhos foram encontrados referentes à micropropagação desta espécie. Para a micropropagação das plantas de agaves em geral tem-se utilizado o meio de cultura Murashige & Skoog (1962), que é composto de macronutrientes e micronutrientes, vitaminas, Fe-EDTA, mioinositol e sacarose, além do ágar como agente gelificador (NIKAM, 1997; SANTACRUZ-RUVALCABA et al., 1999; KARTOSENTONO et al., 2002;).

Dentre estes compostos, a sacarose é a principal fonte de carboidrato e energia nos meios de cultura *in vitro*. Embora alguns estudos demonstrarem que a sacarose no meio de cultura pode inibir a fotossíntese *in vitro* (LEES et al., 1991), tem sido sugerido que o suprimento de sacarose e outros sacarídeos podem alterar o crescimento das plantas através da atividade de algumas enzimas do metabolismo do carbono e nitrogênio (HUBER et al., 1992; KOCH, 1996).

Alguns autores, como Jones (1992); Stitt & Krapp (1999); Hsião & Jackson (1999); Dyckmans et al. (2000); Srinivasa-Rao et al. (2000), observaram, que um acréscimo na concentração de sacarose nos meios de cultura promoveu altas taxas de sobrevivência, maior assimilação no nitrato, incrementos da biomassa, formação

de raízes e ajuste osmótico para a resistência ao estresse hídrico após as fases *in vitro*, otimizando a atividade do aparato fotossintético. No entanto, para autores como Koroch et al. (1997), à pré-aclimatização com diferentes fontes de sacarose não afeta somente o mecanismo fisiológico das plantas, mas influencia as proporções dos diferentes nutrientes presentes no meio de cultura. Pois, segundo Ingestad (1979), a absorção de cada nutriente influencia e é influenciada pelos demais. Deste modo, podemos sugerir que às alterações nas concentrações de sacarose e força nutricional do meio de cultura podem influenciar no metabolismo do carbono e nitrogênio, que são fatores limitantes nos mecanismo de adaptação fisiológica (KOROCH et al., 1997).

Apesar de todas estas evidências que a composição que o meio de cultura é um fator limitante nos processos fisiológicos, há poucos estudos sobre as diferentes alterações na composição da sacarose a partir do meio de cultura MS em relação aos mecanismos de adaptação fisiológica para superar o déficit hídrico pós-transplante, a fim de maximizar a sobrevivência das plantas micropropagadas (VAN HUYLENBROECK & DEBERGH, 1996).

O presente trabalho objetivou comparar as diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%) adicionadas ao meio de cultura MS a 50 e 100% nas fases de pré-aclimatização *in vitro* em plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck, a fim de otimizar as taxas de sobrevivências e o vigor na fase *ex vitro*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de Execução

As etapas laboratoriais das fases de pré-aclimatização, aclimatização e análises de altura, massa fresca e seca, taxas de sobrevivência e enraizamento das plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck em respostas aos diferentes meios de culturas *in vitro* e etapas de aclimatização foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia - Estação Experimental de Itajaí da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – Epagri-Itajaí.

### 2.2 Condição das Plântulas Durante a Fase de Pré-Aclimatização

Para a implantação do experimento, os explantes foram obtidos de plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck produzidos na fase de multiplicação *in vitro*. O meio de cultura utilizado na fase de multiplicação foi o MS Murashige e Skoog (1962), adicionado de  $0,08 \text{ mg/L}^{-1}$  de ANA,  $0,1 \text{ mg/L}^{-1}$  IBA,  $1 \text{ mg/L}^{-1}$  de KIN, 10% de água de côco,  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e gelificado com 0,6% de ágar. Após 60 dias na fase de multiplicação, foi reduzido a parte aérea dos explantes, utilizando-se somente a parte basal do caule com 2 cm de comprimento. Em seguida, estes explantes foram transferidos para frascos de 100 mL contendo 20 mL de meio de cultura contemplando os seis tratamentos do experimento (Tabela 1).

**Tabela 1:** Meios de cultura utilizados durante a fase de pré-aclimatização *in vitro* em explantes de *Agave attenuata* Salmy-Dyck.

Murashige & Skoog (1962) (%)	Sacarose (%)
50	0
	1
	2
100	0
	1
	2

O experimento foi conduzido no sistema fatorial em blocos inteiramente cusualizado e as parcelas foram constituídas por 73 frascos com 4 plântulas por frasco. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a temperatura  $25^{\pm} 2^{\circ}\text{C}$ , com umidade relativa de aproximadamente 60%, intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas, durante 60 dias.

### **2.3 Condição das Plântulas Durante a Fase de Aclimatização**

Plântulas originadas da fase de pré-aclimatização *in vitro* submetidas aos diferentes tratamentos foram transferidas para bandejas de isopor contendo 200 células, tendo como substrato casca de arroz calcinada. As bandejas foram dispostas em telado de sombrite, com 50% de redução da luminosidade.

### **2.4 Avaliações**

Foram realizadas três avaliações: á primeira 60 dias após a fase de pré-aclimatização (sendo considerada o tempo 0 na fase da aclimatização), a segunda aos 70 dias após a implantação dos tratamentos *in vitro* (10 dias após a fase da aclimatização) e a terceira aos 80 dias após a implantação dos tratamentos na fase *in vitro* (20 dias após a fase da aclimatização).

### **2.5 Característica Morfológica**

Para as medições da altura das plântulas foi realizada com a utilização de régua graduada (mm). A massa fresca e seca das plântulas foi determinada utilizando plantas inteiras escolhidas ao acaso. Após a lavagem as plântulas foram secas em papel toalha sendo em seguida pesadas em balança analítica Gehaka modelo AG 200. Após, a parte aérea foi acondicionada em sacos de papel em



mantida em estufa a 65°C, por 24 horas. Em seguida o material foi novamente pesado na mesma balança analítica para determinação da massa seca.

Plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck obtidas nas fases de pré-aclimatização e aclimatização foram avaliadas quanto à altura (cm), massa fresca e seca (mg), taxa de sobrevivência (%), taxa de enraizamento (%).

## **2.6 Análise Estatística**

Para os parâmetros analisados foram utilizadas três repetições com três amostras cada amostra corresponde a uma planta. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e a comparação das médias foi realizada pelo teste SNK, em nível de 5% de probabilidade, conforme recomendações de Steel & Torrie (1980).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Altura

Os maiores valores para altura ocorreram na fase de pré-aclimatização 60 dias *in vitro* para todos os tratamentos analisados (Figura 1), enquanto que na fase *ex vitro* a dinâmica do crescimento foi lenta (Tabela 2). Este crescimento lento pode estar relacionado ao pequeno intervalo de tempo em que foram realizadas as avaliações na fase *ex vitro*, ao final do décimo e vigésimo dia da fase de aclimatização. De acordo com Aldrufeu (1987), plântulas provenientes do cultivo *in vitro* geralmente apresentam um atraso no crescimento quando são transferidas para casa de vegetação. Pereira et al., (2000) citam que essa parada no crescimento quando as plantas são aclimatizadas pode ser devido às condições adversas que se encontram no momento da transferência *ex vitro*, como alta umidade relativa nos frascos de cultura, e pelo alto índice de estômatos e raízes não funcionais.

A avaliação da dinâmica de crescimento (altura) nas fases de pré-aclimatização e aclimatização permite avaliar o metabolismo celular e a capacidade de adaptação das plantas ao déficit hídrico (YORDANOV, 2000). Segundo Marschner (1986), as maiores taxas de crescimentos *in vitro* das plântulas nos períodos iniciais do desenvolvimento se devem à maior velocidade de absorção dos nutrientes pelas plântulas nesse período, quando o meio de cultura está mais favorável ao transporte de troca de íons.

Em culturas *in vitro* as condições do ambiente são determinadas e controladas, portanto, o meio de cultura é um dos fatores que mais influencia o desenvolvimento das plântulas, determinando também o seu estado nutricional. A presença, a concentração e as inter-relações entre os nutrientes determinam a expressão do máximo crescimento vegetativo. Esses fatores variam conforme a espécie e o meio em que se encontram. (CAPALDI, 2002),

Outro fator que pode estar relacionado à inibição do crescimento na fase de aclimatização é o metabolismo ácido das crassuláceas (MAC). Este inclui as agaváceas, que fecham os estômatos durante o dia e os abrem durante a noite, quando a perda de água é menor, para absorverem CO<sub>2</sub> que é transformado em ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos formados durante a noite se decompõem no dia seguinte liberando CO<sub>2</sub> que aí

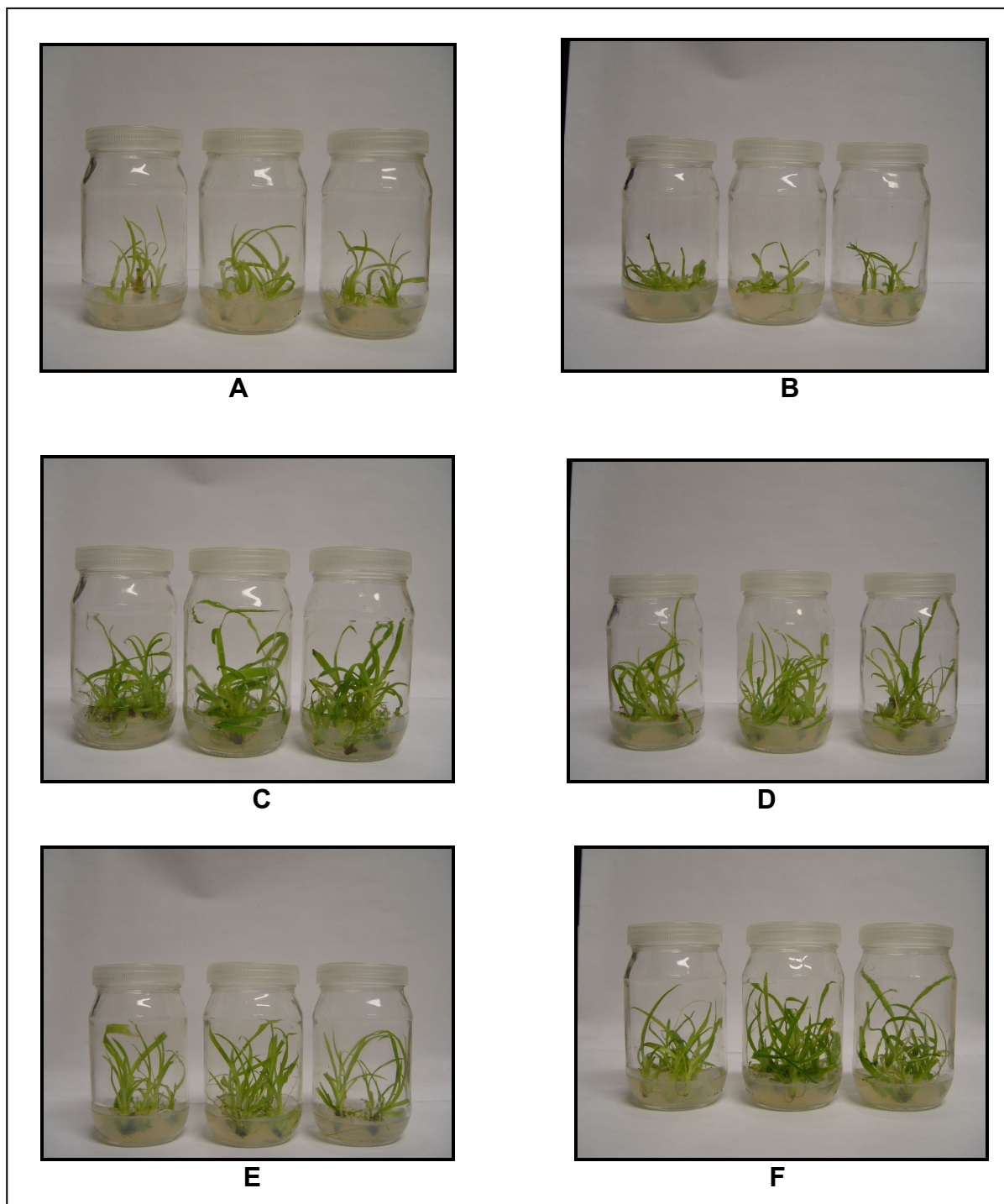
é assimilado pelo ciclo de Calvin. Este processo promove uma baixa assimilação de CO<sub>2</sub> que conseqüentemente afetará o crescimento desta espécie (SCHROEDER et al., 2001) (Tabela 2).

Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença significativa entre as concentrações nutricionais do meio de cultura MS a 50 e 100% durante a fase *in vitro* (Tabela 2). Deste modo observamos que as menores concentrações de nitrogênio fornecidas as plântulas durante a fase *in vitro* não afetaram o seu desenvolvimento quando comparados com plantas cultivadas com o dobro de nutrientes. Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Capaldi (2002), em plântulas de *Cryptomeria japonica*.

Segundo Aurisano et al. (1995a), o crescimento e regeneração *in vitro* são fenômenos complexos e podem estar sendo influenciados por fatores ambientais e genéticos. Assim, no presente trabalho, durante os sessenta dias de cultivo *in vitro* não foram renovados os constituintes nutricionais, o que pode ter promovido uma depleção de nutrientes. Os fatores ambientais podem estar relacionados ao tempo de cultivo e os fatores genéticos estão envolvidos na complexidade da variação bioquímica e fisiológica por parte da plantas MAC em relação à aquisição de carbono para a absorção de nutrientes (CUSHMAN, 2001).

É importante ressaltar que a concentração nutricional no meio de cultura não afetou a dinâmica de crescimento somente na fase *in vitro*, pois após o décimo e vigésimo dia da fase de aclimatização, observou-se que plântulas oriundas de meios de cultura com MS 100% promoveram um maior incremento na altura (Tabela 2).

Assim, sugere-se que os fatores de crescimento variam conforme a espécie cultivada e o ambiente em que se encontram (CAPALDI, 2002). Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os resultados em culturas *in vitro* de panículas de *Sorghum bicolor*, nas quais a composição nutricional não afetou o desenvolvimento *in vitro*, porém, refletiu negativamente nas fases de aclimatização. Deste modo conclui-se que composições de meios de cultura com diferentes concentrações de nitrogênio afetam significativamente a intensidade de proliferação dos explantes (TORIBIO et al., 1989).



**Figura 1:** *Agave attenuata* Salmy-Dyck aos 60 dias de cultura *in vitro*, em resposta aos tratamentos: (a) T1 - meio MS (50%) sem sacarose, (b) T2 - meio MS (100%) sem sacarose, (c) T3 - meio MS (50%) com 1% de sacarose, (d) T4 - meio MS (100%) com 1% de sacarose, (e) T5 - meio MS (50%) com 2% de sacarose, (f) T6 - meio MS (100%) com 2% de sacarose.

O efeito nutricional do MS a 100% nas plantas se dá ao fato que as fontes de nitrogênio e aminoácidos em geral mostram-se eficientes em várias espécies (TUPY et al., 1983). Pois o nitrogênio serve não somente como fonte primária para o

crescimento de muitas células eucarióticas mais promove a comunicação entre células e tecidos dentro dos organismos multicelulares (YOUNG et al., 1999). No entanto o grau de resposta nas plantas é muito variável, dependendo da espécie, nutrição mineral, enriquecimento de CO<sub>2</sub> e influências sinérgicas de outros tipos de estresses que a plântula pode sofrer (POORTER & PÉREZ-SOBA, 2001). Em todas as espécies o efeito do estresse diminui a atividade fotossintética, associada às alterações do metabolismo do carbono e nitrogênio (CORNIC & MASSACI, 1996).

**Tabela 2:** Altura de plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50 e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%).

Tratamentos		Altura (cm)		
		Tempo de aclimatização (dias)		
		0	10	20
Sacarose	MS			
%				
0	50	3,55 A b	.....	.....
1		7,59 A a	7,65 B b	7,72 B b
2		8,21 A a	8,44 B a	8,62 B a
0	100	3,19 A b	.....	.....
1		8,89 A a	9,45 A b	9,89 A b
2		9,83 A a	10,56 A a	11,01 A a
CV%		90,27	5,51	5,08

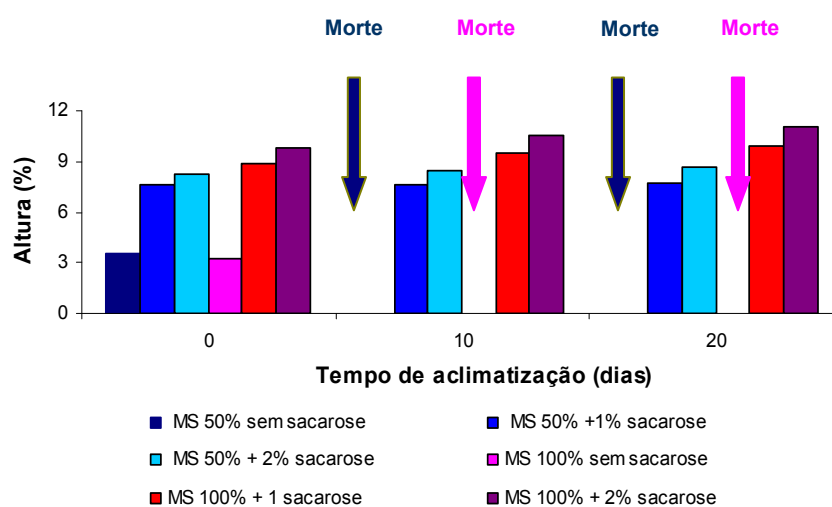
Letras maiúsculas comparam médias de MS para cada concentração de sacarose. Letras minúsculas comparam médias das concentrações de sacarose em cada MS. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ).

Para a altura durante a fase *in vitro* as concentrações de sacarose 1% e 2% não influenciaram estatisticamente entre si, porém a presença de sacarose no meio de cultura refletiu no crescimento *in vitro* quando comparada aos tratamentos sem sacarose (Tabela 2).

A influência da sacarose no crescimento *in vitro* está relacionada à expressão de genes da ciclina (RIOU-KHAMLICH et al., 2000), que promovem a proliferação celular em diferentes regiões meristemáticas (PRITCHARD et al., 1999). A sacarose e a glicose induzem o ajuste osmótico (SRINIVASA-RAO et al., 2000), além de proporcionarem às plantas uma maior adaptação metabólica através de moléculas sinalizadoras que evitam o estresse hídrico (JONES, 1992).

Após o décimo e vigésimo dia da fase de aclimatização observou-se que as plântulas sofreram uma influência residual da concentração de sacarose 2%

independente da concentração do meio MS utilizado na fase *in vitro*. Deste modo, resultando em aumento significativo na altura das plântulas em estudo. Estes resultados se acentuam no meio de cultura MS a 100% (Tabela 2). O crescimento *ex vitro* fotoautotrófico de plântulas de tabaco foi melhorado significativamente em resposta à sacarose no meio de cultivo (KADLECEK et al., 1998). A influência da sacarose no crescimento *ex vitro* tem sido atribuída ao aumento do potencial osmótico da célula, deste modo, aumentando o turgor celular promovendo crescimento (DELUCIA et al., 1985).



**Figura 2:** Altura de plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%), após 20 dias de aclimatização. As setas indicam mortes dos explantes.

No presente trabalho, a altura das plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck foi lenta, principalmente nas fases de aclimatização. Os resultados mostraram que o meio MS a 100% com sacarose 2% promoveu resultado significativamente superior para a altura em relação aos demais tratamentos (Figura 2). Deste modo, pode-se concluir que a concentração nutricional do meio de cultura em conjunto com a concentração de carbono disponível são os principais fatores limitantes para o crescimento desta planta.

### 3.2 Massa Fresca e Seca

A sacarose 2% independente da concentração do meio de cultura MS, possibilitou um incremento em massa fresca e seca ao final da fase de pré-aclimatização. O meio MS 100% acentuou ainda mais o incremento de massa fresca e seca (Tabela 3).

Estes resultados corroboram com os obtidos por Solárová et al. (1989), Tichá et al., (1998), que observaram um incremento de massa seca em plântulas de tabaco em meios de cultura acrescidos com 2% de sacarose. Resultados semelhantes a estes também foram obtidos em plântulas de videiras (FILA et al., 1998), morango (DESJARDINS, 1995), e banana (NAVARRO et al., 1994). Segundo Wainwright & Scrace, (1989), a concentrações de 2% a 4% de sacarose no meio de cultura podem maximizar a atividade nutricional através da assimilação de carbono para a Rubisco. Deste modo, sugere-se que o desenvolvimento do aparelho fotossintético destas plântulas seja dependente da concentração de sacarose no meio de cultura (POSPÍŠILOVÁ et al., 1987).

O efeito do meio MS 100% na produção de biomassa *in vitro* pode estar correlacionado ao aumento da área foliar (Capítulo II). Segundo Kaiser & Huber, (2001) as fontes de nitrogênio influenciam o crescimento e diferenciação celular. Tendo em vista que um aumento na concentração nutricional e fontes de carbono influenciam positivamente o incremento da área da folha, mostrando que o metabolismo do carbono e do nitrogênio são dependentes um do outro.

Já na fase *ex vitro* observou-se que as plântulas provenientes do meio de cultura suplementados com 2% de sacarose continuaram a promover um acréscimo significativo na massa fresca e seca ao final do décimo e vigésimo dia da aclimatização. E que a concentração de 2% sacarose no meio de cultura acentuou o efeito nutricional do meio MS 100% (Tabela 3).

Os resultados obtidos nos tratamentos com o meio MS 100% sugerem a existência de um equilíbrio entre a taxa de absorção de nutrientes e a conversão de massa vegetal fresca e seca, já que as condições ambientais e a necessidade específica dos nutrientes para cada espécie podem estar influenciando seu crescimento (INGESTAD et al., 1995). E que tanto, a assimilação do carbono como do nitrogênio representa um ponto central para o crescimento de plantas e outros

organismos (SILVEIRA et al., 2001).

No presente trabalho constatou-se que os tratamentos com meio de cultura MS 100% em conjunto com a sacarose 2% promoveram um aumento na dinâmica do crescimento, altura e área foliar, (Capítulo II), tanto na fase *in vitro* como *ex vitro*.

**Tabela 3:** Produção de biomassa (Massa Fresca e Seca) de *Agave attenuata* Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50 e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%).

Tratamentos		Massa fresca	Massa seca
Sacarose	MS	(mg)	
%			
<b>60 dias após pré-aclimatização <i>in vitro</i></b>			
<b>Avaliação 1</b>			
0		159,83 A b	4,83 A b
1	50	136,33 B b	6,63 B b
2		219,16 B a	8,63 B a
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			
0		148,67 A b	4,57 A c
1	100	185,50 A b	8,80 A b
2		266,33 A a	11,85 A a
CV%		25,76	25,21
<b>10 dias após aclimatização</b>			
<b>Avaliação 2</b>			
1		265,16 A b	16,00 A b
2	50	317,50 B a	18,33 B b
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			
1		271,50 A b	14,02 A b
2	100	511,33 A a	30,00 A a
CV%		20,03	20,03
<b>20 dias após aclimatização</b>			
<b>Avaliação 3</b>			
1		211,16 A a	9,16 A a
2	50	249,00 B a	12,16 B a
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			
1		210,33 A b	12,33 A b
2	100	591,50 A a	35,16 A a
CV%		14,5	19,36

Letras maiúsculas comparam médias de MS para cada concentração de sacarose. Letras minúsculas comparam médias das concentrações de sacarose em cada meio MS. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ).

Levando em consideração os resultados obtidos em relação às características da dinâmica de crescimento da espécie em estudo, pode-se verificar que a sacarose 2% adicionada ao meio MS 100% propiciou resultados superiores para altura, massa fresca e seca. Tendo em vista que o carbono e nitrogênio são

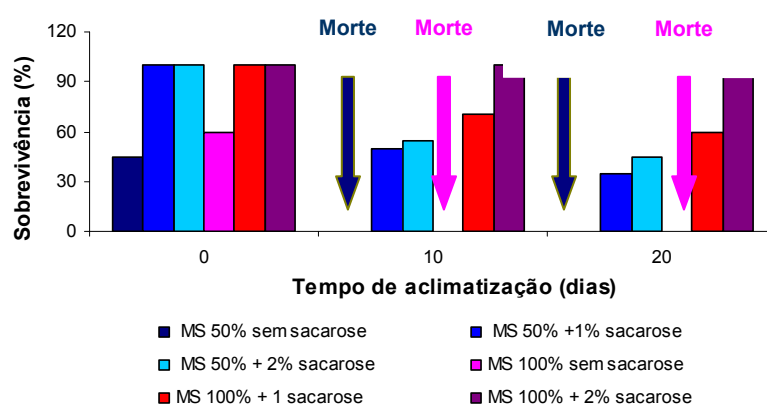


fatores limitantes para otimizar o crescimento fotoautotrófico. Deste modo, fica evidente que a micropropagação *in vitro* com concentração de sacarose 2% no meio MS 100% influenciou positivamente na aclimatização dessa espécie. Não houve interação entre as concentrações de sacarose (0, 1 e 2%) com a concentração do meio MS 50 e 100% para a massa fresca e seca.

### 3.3 Taxa de Sobrevivência

As plântulas provenientes dos meios de cultura com sacarose 1% e 2% independente da concentração do meio de cultura MS, apresentaram uma taxa de sobrevivência de 100% após os sessenta dias *in vitro* (fase de pré-aclimatização). Enquanto que as plântulas mantidas em meio de cultura MS com 50% e 100% na ausência de sacarose apresentaram uma taxa de sobrevivência de 45% e 60% (Figura 3).

Após os três primeiros dias de transferência para a fase de aclimatização, as plântulas provenientes dos meios de cultura sem sacarose mostraram uma taxa de mortalidade de 100% (Figura 3). Resultados semelhantes a estes foram encontrados com a espécie *Actinidia deliciosa*, onde a eliminação da sacarose no meio de cultura resultou na mortalidade de 60% nas plântulas micropropagadas (ARIGITA et al., 2002).



**Figura 3:** Taxa de sobrevivência de plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%), após 20 dias de aclimatização. As setas indicam morte dos explantes.

O decréscimo nas taxas de sobrevivência pode estar relacionado à taxa de transpiração e condutância estomática, que é relativamente alta em meios com a ausência de sacarose (POSPÍŠILOVÁ et al., 1987). Pois, a sacarose no meio de cultura serve não somente como fonte de energia, mas também como um agente osmótico. Este ajuste osmótico ocorre devido à hidrólise da sacarose em frutose e glicose que pode ocorrer durante a autoclavagem do meio de cultura, talvez pela ação da invertase localizada na parede celular (GEORGE & SHIRINGTON, 1984).

No presente trabalho constatou-se uma inibição na produção de biomassa bem como, atrofia na altura e nas folhas das plântulas cultivadas com ausência de sacarose, as quais, além disso, mostraram-se vitrificadas. Folhas vitrificadas podem estar relacionadas à ineficiência do aparato fotossintético (CAPPELADES et al., 1991; DESJARDINS, 1995), afetando a acumulação de massa fresca, o que conseqüentemente afetará a sobrevivência e adaptação das plantas cultivadas *in vitro* após sua transferência para condições *ex vitro*. Estes resultados demonstram que as plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck não fixaram carbono suficiente para sustentar seu crescimento na ausência de sacarose.

As plântulas oriundas do meio de cultura MS basal a 100% apresentaram as maiores taxas de sobrevivência. Estes resultados se acentuaram com a concentração de sacarose 2% no meio de cultura (Figura 3). À medida que se diminuiu a concentração do meio MS e a concentração de sacarose, observou-se menor incremento na massa fresca e seca (Tabela 3) e na taxa de sobrevivência (Figura 3) durante as fases de aclimatização.

Estas respostas estão de acordo com o que é citado por Marín & Gella (1988). Esses autores observaram que esse decréscimo na produção de biomassa e na taxa de sobrevivência ocorreu em torno dos 14 dias após o início da aclimatização de mudas produzidas *in vitro* e atribuíram esse fenômeno ao estresse hídrico das plantas, que é causado pela baixa eficiência na troca do metabolismo heterotrófico para o mixotrófico.

A sacarose 2% presente no meio de cultura MS basal 100% promoveu um melhor desempenho metabólico e morfo-fisiológico que refletiu na taxa de sobrevivência durante a fase de aclimatização. Kumar et al. (2001), observaram um aumento significativo nas taxas de sobrevivência durante as fases de aclimatização em plântulas de mandarin cultivadas *in vitro* em resposta à sacarose no meio de cultivo. Segundo George & Sherrington (1984), este efeito positivo nas taxas de

sobrevivência na fase de aclimatização está correlacionada positivamente com um aumento nas fontes de carbono e nutrientes durante a fase *in vitro*. Enquanto que a baixa taxa de sobrevivência em resposta ao meio de cultura MS a 50% pode estar relacionada a alterações no metabolismo do C e N, que podem afetar negativamente o desenvolvimento das ceras epicuticulares e o funcionamento do aparelho estomático durante os processos de micropropagação (Capítulo II).

### 3.4 Taxa de Enraizamento

Plântulas micropropagadas sem sacarose não sobreviveram após os três primeiros dias de transferência *ex vitro* devido à ausência de raízes *in vitro* (ZIMMERMAN, 1983). No presente trabalho, uma das prováveis causas da não sobrevivência das plântulas, pode estar relacionado com a ausência de enraizamento provenientes dos meios de cultura sem sacarose (Figura 4). Embora Debergh & Maene (1981); Borkowska (2001) defendam a idéia que as raízes produzidas *in vitro* não apresentam funcionalidade, é possível que estas possam servir apenas de sustentação e reserva de nutrientes até que novas raízes sejam formadas, durante a fase de aclimatização.

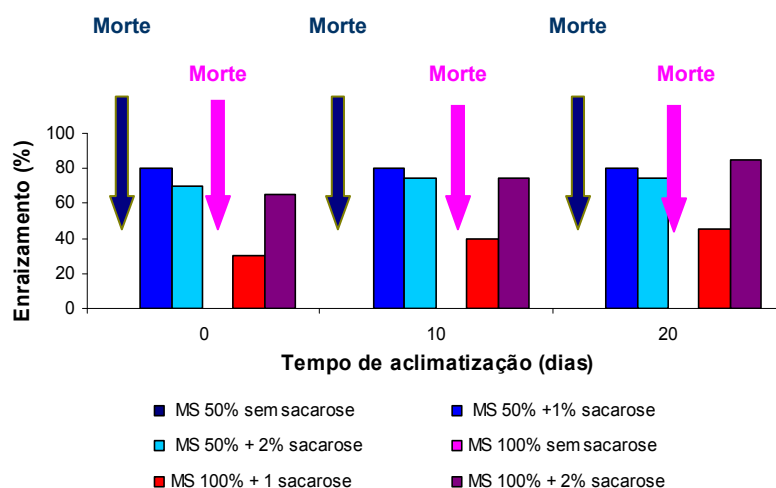
O meio MS basal com 50% resultou em uma alta taxa de enraizamento *in vitro* independente da concentração de sacarose. Sendo que o meio MS 100% com 2% de sacarose resultou em taxas médias de 65% de enraizamento, enquanto que a concentração de 1% de sacarose a média na taxa de enraizamento foi de 30% (Figura 4).

A alta taxa de enraizamento *in vitro* no meio MS basal a 50% pode estar relacionado ao acúmulo dos carboidratos solúveis (amido) nas fases de micropropagação (Capítulo III), uma vez que o meio MS basal a 50% esteve associado aos maiores teores de amido. Segundo Alhama et al. (1998), sob suprimentos limitantes de nitrogênio o amido tende a se acumular nas plantas. Este amido acumulado é apontado como indicador das reservas de carboidratos para o desenvolvimento de novos órgãos, incluindo às brotações e raízes (MARTIN & SMITH, 1995).

Segundo Van Der Werf (1996), a disponibilidade de N exerce uma forte

influência na alocação de biomassa para raiz e parte aérea. Plântulas de *Allium porrum* quando transferidas para meio com menores teores de N aumentaram rapidamente a taxa de enraizamento (VAN DER WERF & NAGEL, 1996).

De acordo com George (1996), as plântulas que desenvolvem raízes *in vitro* apresentam maior habilidade em estabilizar a perda hídrica durante a fase de aclimatização. No entanto, existem alguns obstáculos para isolar e caracterizar os fatores que controlam os fenômenos que estão envolvidos no processo de formação de raízes, em virtude da sua complexidade e da grande interação existente entre eles (ASSIS & TEXEIRA, 1998).



**Figura 4:** Taxa de enraizamento das plântulas de *Agave attenuata* micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%), após 20 dias de aclimatização. As setas indicam morte dos explantes.

No presente trabalho os resultados obtidos demonstraram que as plântulas produzidas do meio MS a 50% enraizaram somente na fase *in vitro*, não formando raízes na fase de aclimatização (Figura 4).

Segundo MacClenlland (1990), as raízes formadas *in vitro* são pouco funcionais por não apresentarem pêlos radiculares e apresentarem deficiente conexão vascular com parte aérea das plantas, resultando numa restrita transferência de água e nutrientes para a parte aérea afetando a formação de raízes durante a aclimatização. Estes resultados podem estar relacionados com a queda drástica na taxa de sobrevivência em plântulas oriundas do meio MS a 50%. Em

contrapartida, a concentração de 2% de sacarose no meio MS a 100%, além de promover enraizamento *in vitro* manteve a característica de desenvolver raízes durante a fase da aclimatização. A taxa de enraizamento foi de 75% ao final do décimo dia e de 85% no final do vigésimo dia da fase da aclimatização (Figura 4).

Este fato pode estar relacionado com o aumento do amido nestes mesmos tratamentos (Capítulo III). Outros fatores que podem ter influenciado no desenvolvimento de raízes neste tratamento foi o aumento de clorofilas totais (Capítulo II), que influenciam diretamente na atividade fotossintética (RIVAL et al., 1997), aumentando significativamente a área foliar (SHORT et al., 1984; DENG & DONNELLY, 1983), e promovendo um aumento na densidade estomática (Capítulo II). O estômato é uma estrutura epidérmica que regula a difusão do CO<sub>2</sub> para o mecanismo fotossintético assim como às trocas gasosas e hídricas entre a folha e a atmosfera para a transpiração e sobrevivência das plantas nas etapas de aclimatização (BROWNLEE, 2001). Ferris & Taylor (1994), demonstraram que o CO<sub>2</sub> possui efeito importante na divisão e diferenciação meristemática, promovendo a formação de raízes durante os primeiros estágios de crescimento em plantas de *L. corniculatus*.

O pré-condicionamento pela adição de sacarose influenciou no enraizamento de mudas de *Potentilla fruticosa* e *Ficus lyrata* após a transferência *ex vitro* (WAINWRIGHT & SCRACE, 1989). O enraizamento inicial de mudas de maçãs diminuiu proporcionalmente com o decréscimo dos níveis de sacarose (LANE, 1978). No crescimento das plantas a altas concentrações de sacarose, água e nutrientes (ROGERS et al., 1991) afetam a proliferação de raízes, aumentando o turgor celular (HSIÃO & JACKSON, 1999), e a taxa de sobrevivência na fase da aclimatização em coníferas (FERRIE et al., 1995).

## 4 CONCLUSÕES

Embora a dinâmica do crescimento (altura, massa fresca e seca) na fase de aclimatização tenha variado muito pouco no decorrer do tempo, foi possível constatar que houve diferenças significativas entre as concentrações de sacarose e o meio basal MS tanto quanto a fase da pré-aclimatização como da aclimatização fase *ex-vitro*. As fases *in vitro* e *ex vitro* foram influenciadas negativamente pela ausência de sacarose nos meios MS a 50% e 100% para a altura, massa fresca e seca como também para taxa de sobrevivência e enraizamento. Assim, *Agave attenuata* Salmy-Dyck mostra-se dependente da sacarose no meio de cultura para maximizar o desenvolvimento e a sobrevivência durante as fases da aclimatização.

Foi possível atestar a importância da sacarose 2% para o mecanismo fotossintético das plantas micropropagadas. Assim, a ausência ou a presença de sacarose em menores concentrações resulta em uma baixa adaptação das plantas na fase de aclimatização. Outro fator negativo para a espécie em estudo foi a redução nutricional do meio de cultura MS. Pois um decréscimo nas concentrações nitrogenadas durante a fase de micropropagação pode afetar a absorção do carbono promovendo uma baixa adaptação ao estresse hídrico durante a fase de aclimatização. Deste modo, para a micropropagação de *Agave attenuata* Salmy-Dyck recomenda-se a utilização do meio MS a 100% suplementado com 2% de sacarose.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRUFEU, A. Rooting and acclimation of *Pelargonium zonale* plantlets. **Acta Horticulturae**, v. 221, p. 361-366, 1987.

ALHAMA, J.; LOPES-RUIZ, A.; DIEZ, J.; GARCIA-FERNANDEZ, J. M. Nitrogen availability on intracellular amino acids and ammonium pools in the green alga *monophidium braunii*. **Journal of Plant Physiology**, v. 153, p. 529 - 533, 1998.

ARIGITA, L.; CONZÁLES, A.; TAMÉS, R. S. Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.115, p. 166 - 173, 2002.

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

AURISANO, N.; BERTANI, A.; REGIANNI, R. Anaerobic accumulation of 4-aminobutyrate in rice seedlings: causes and significance. **Phytochemistry**, v. 38, p.1147-1150, 1995a.

BANERAS, J. C. Tecnologia em Floricultura Tropical. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 5 - 9, 1997.

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

BROWNLEE, C. The long and short of stomatal density signals. **Trends Plant Science**, v. 6, p. 441-442, 2001.

CAPALDI, F. R. **Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio em explantes de *Cryptomeria japonica* D. DON “Elegans” Cultivadas *in vitro*: Análise Bioquímica e Relações entre reguladores vegetais**. Tese de Doutorado, Piracicaba, São Paulo, p. 1 - 61, 2002.

CAPELLADES, M.; LEMEUS, R.; DEBERGH, P. Effect of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis of Rose cultivated *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 25, p. 21 - 26, 1991.

CORNIC, C.; MASSACCI, A.; Leaf photosynthesis under drought stress. In: BAKER, N. R. (Eds.). **Photosynthesis and the environment**, Kluwer Acad. Publi., Dordrecht, Boston, London, p. 347-366, 1996.

CUSHMAN, J. C. Crassulacean Acid Metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1430 - 1449, 2001.

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

DELUCIA, E. H.; SASEK, T. W.; STRAIN, B. R. Photosynthetic inhibition after long-term exposure to elevated levels of atmospheric carbon dioxide. **Photosynthetica Res**, v. 7, p. 175 - 184, 1985.

DENG, R. DONNELLY, J. *In vitro* hardening of red *raspberry* through CO<sub>2</sub> enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. **Canadian Journal Plant Science**, v. 73, p. 1105 - 1113, 1993.

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

DYCKMANS, J.; FLESSA, H.; POLLE, A.; BEESE, F. The effects of elevated [CO<sub>2</sub>] on uptake and allocation of C13 and N15 in beech (*Fagus sylvatica* L) during leafing. **Plant Biology**, v. 2. p. 113-120, 2000.

FERRIE, R. P. The biochemistry of conifer embryo development: amino acids, polyamines and storage proteins. In: JAIN, S.; GUPTA, P & NEWTON, R. (Eds.) **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. p.1, p. 317 - 336, 1995.

FERRIS, R. & TAYLOR, G. Stomatal characteristics of four native herbs following exposure to elevated CO<sub>2</sub>. **Annals of Botany**, v. 73, p. 447- 453, 1994.

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

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Cultured**. In: Pratices. 2<sup>a</sup> (ed). England: Exergetics, p.1361, 1996.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant Propagation by Tissue Culture: Handbook and Directory of Commercial Laboratories**, Exegetics Ltd. Eversley. Basingstoke, 1984.

HSIÃO, T. C.; JACKSON, R. B. Interactive effects of water stress and elevated CO<sub>2</sub> on growth photosynthesis, and water use efficiency. In: LUO, Y.; MOONEY, H. A. (Eds). **Carbon Dioxide and Environmental Stress**, Academic Press, Sam Diego, p. 3 - 31, 1999.

HUBER, S. C.; HUBER, J. C. A. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. **Plant Physiology**, v. 99, p. 1275 - 1278, 1992.

INGESTAD. T. Nitrogen stress in birch seedlings. II, N, K, P, Ca and Mg nutrition. **Plant Physiology**, v. 45, p. 149 - 157, 1979.

INGESTAD, T.; AGREM, G.I. Plant nutrition and growth: basis principles. **Plant and Soil**, v. 168/169, p.15 - 20, 1995.

JONES, H. G. **Plants and Microclimate**. (Eds.) BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford, England, p. 33 - 82, 1992.

KADLECEK, P.; TICHÁ, I.; CAPKOVÁ, V.; SCHAFER, C.; Acclimatization of micropropagated tabaco plantlets. In: GARAB, G. (Eds.): **Photosynthesis: Mechanisms and Effects**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston- London, v. 5, p. 3853.-3856,1998.

KAISER, W. M.; HUBER, S .C. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. **Jounal Experimantal Botany**, v. 52, p.1980 - 1989, 2001.

KARTOSENTONO, S.; INDRAYANTO, G. & ZAINI, N. C. The uptake of copper ions by cell suspension cultures of *Agave amaniensis*, and its effect on the growth, amino acids and hecogenin content. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p. 287–292, 2002.

KOCH, K. E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Ann. Revi. Plant. Mol. Biol**, v. 47, p. 509 - 540, 1996.

KOROCH, A. R.; JULIANI, J. R. H. H.; JULIANI, H. R. & TRIPPI, V. S. Micropopagation and acclimatization of *Hedeoma multiflorum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 48, p. 213 - 217. 1997.

KUMAR, K., DHATT, A. S. AND GILL, M. I. S., *In vitro* plant regeneration in kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour × *C. deliciosa* Tenora). **Indian Journal Horticulture**, v.58, p. 299 - 302, 2001.



- LANE, W. D. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. **Plant Sci. Lett.** v. 13, p. 281 - 285, 1978.
- LEES, R. P.; EVANS, E. H.; NICHOLAS, J. R. Photosynthesis in *Clematis*, "The President", during growth *in vitro* and subsequent *in vivo* acclimatization, **Journal Experimental Botany**, v. 42, p. 605 - 610, 1991.
- LORENZI, H.; SOUZA, M. H. **Plantas Ornamentais no Brasil arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3ª (Eds.), p.139, 2001.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London:Academic press, p 674, 1986.
- MARÍN, J. A.; GELLA, R. Is desiccation the cause of the poor survival rate the acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L. **Acta Horticulture**, Wageningen, n. 239, p. 105 -112, 1988.
- MARTIN, C.; SMITH, A. M. Starch biosynthesis. **Plant Cell**, v.7, p. 971 - 985, 1995.
- McCLENLLAND, M. T. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 23, p. 115-123, 1990.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, v. 5, p. 473 - 497, 1962.
- NAVARRO, C.; TEISSON, C.; CÔTE, F.; GANRY, J. Effects of light intensity and CO<sub>2</sub> concentration on growth of banana plants (*Musa AAA*, cultivar, *Petite naine*), *in vitro* and subsequent growth following acclimatization. **Scientia Horticulture**, v. 60, p. 41, 1994.
- NIKAM, T. D. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 225 - 228, 1997.
- POORTER, H.; PÉREZ-SOBA, M. The growth response of plants to elevated CO<sub>2</sub> under non-optimal environmental conditions. **Oecologia**, v. 129, p. 1 - 20, 2001.
- POSPÍŠILOVÁ, J. SOLAROVÁ, J. ČATSKÝ, J. Photosynthesis and growth of plantlets *in vitro* in dependence on CO<sub>2</sub> concentration. **Plant Physiology**, v. 29, p. 415 - 421, 1987.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Desfolhamento e baixa temperatura em plantas micropropagadas de macieira como forma de superar a parada do crescimento durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12 (2), p. 135 -145, 2000.
- PRITCHARD, S.C.; ROGERS, H. H.; PRIOR, S. A.; PETERSON, C. M. Elevated CO<sub>2</sub> and plant structure a review. **Global Change Biological**, v. 5, p. 807-837, 1999.
- RIOU-KHAMLICH, C.; MENGES, M.; HEALY, J. M. S.; MURRAY, J. A. H. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. **Molecular Cell Biology**, v. 20, p.4513 -4521, 2000.
- RIVAL, A.; BEULÉ, T.; LAVERGNE, D.; NATO, A.; HAVAUX, M.; PAURD, M. Development of photosynthetic characteristics in oil palm during *in vitro* micropropagation. **Journal Plant Physiology**. v.150, p. 520 - 527, 1997.
- ROGERS, R. B.; KNIGHT, S. L. & SMITH, M. A. L. Effects of growing media and aerial environments in the acclimatization of *in vitro* miniature rose plantlets. **Journal Environment Horticulturae**, v. 9, n. 4, p. 181 - 184, 1991.
- SANTACRUZ-RUVALCABA, F.; GUTIÉRREZ-PULIDO, H. & RODRIGUEZ-GARAY, B. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, p. 163 - 167, 1999.

- SHORT, K. C.; WARDLE, K.; GROUT, B. W.; SIMPKINS, I. *In vitro* physiology and acclimation of aseptically cultured plantlets. In: NOVÁK, F. J.; HAVEL, L.; DOLEZEL, J. (Eds.) **Plant Tissue and Cell Culture Application to crop Improvement**. Institute Experimental of Botany, Czechoslov. Acad. Sci. Prague, p. 475- 486, 1984.
- SCHROEDER, J. I.; ALLEN, G.; HUGOUVIEUX, V.; KWAK, J. M. & WANER, D. Guard cell signal transduction. **Annual Review Plant Physiology**, v. 52, p. 627 - 658, 2001.
- SILVEIRA, J. A. G., MATOS, I. C. S.; CECCATO, V. M. VIÉGAS, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Nitrate reductase activity, distribution and response to nitrate in two contrasting *Phaseolus* espécies inoculated With *Rhizobium* spp. **Environment Experimental Botany**, v. 46, p. 37 - 46, 2001.
- SOLÁROVÁ, J. Photosynthesis of plant regenerants. Diurnal variation in CO<sub>2</sub> concentration in cultivation vessels resulting from plantles photosynthetic activity. **Photosynthetica**, v. 23, p. 100 - 107, 1989.
- SRINIVASA-RAO, N. K.; BHATT, R. M.; SADASCHIVA, A. T. Tolerance to water stress in tomato cultivars. **Photosynthetica**, v, 38, p. 465 - 467, 2000.
- STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics- A biometrical Approach**. 2<sup>a</sup> (ed). New York, Macgraw - Hill, p. 633, 1980.
- STITT, M.; KRAPP A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. **Plant Cell Environment**, v. 22, p. 583 - 621, 1999.
- TICHÁ, I.; CÁP, F.; PASCOVSKÁ, D.; HOFMAM, P.; HAISEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SHAFER, C. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grow *in vitro*. **Physiology Plantarum**, v. 102, p. 155 - 162, 1998.
- TORIBIO, M.; PARDOS, J. A. Scots pine (*Pinus silvestris* L.). In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnonology in agriculture and forestry 5: tress II**, Belin: Sprienger Verlag, v. 5, cap.2, p. 479 - 506. 1989.
- TUPY, J.; HRABETOVA, E & CAPKOVA, V. **Plant Sci. Lett**, v. 30, p. 91 - 98. 1983.
- VAN DER WERF, A. Growth analysis and photoassimilate partitioning. IN: ZAMSKI, E. & SHAFFER, A. A (Eds.) **Photoassimilats distribution in plants and crops: source-sink relationships**. Marcel Dekker, Nova lorque, EUA. p. 1- 20, 1996.
- VAN DER WERF, A.; NAGEL, O. W. Carbon allocation to shoots and roots in relation to nitrogem supply is mediated by cytokinins and sucrose. **Plant and Soil**, v. 185, p. 21 - 32, 1996.
- VAN HUYLENBROECK, J. M. & DEBERG, P. C. Physiology aspects in acclimatization of micropropagated plantles. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v.2, n.3, p.136 - 141, 1996.
- WAINWRIGHT, H. & SCRACE, J. Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on *in vivo* establishment. **Science Horticulture**, v. 38, p.261 – 267, 1989.
- YORDANOV, V, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought, acclimatization, and stress tolerance. **Photosynthetica**, v. 38, n.1, p.171-186; 2000.
- YOUNG, B. G.; JACK, D. L, SMITH, D. W. & SAIER, Jr. M. H. The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochesmisty Biosophysical Acta*, v.1415, p.306 - 322. 1999.
- ZIMMERMAM, R, H.; Factors affecting *in vitro* propagation of apple cuttings. *Acta Horticulture*. v. 131, p. 171- 178, 1983.

## **Capítulo II**

# **Aspectos Morfo-Fisiológicos de *Agave attenuata* Salmy-Dyck Durante a Fase de Pré-Aclimatização e Aclimatização**

## RESUMO

*Agavea attenuata* Salmy-Dyck apresenta aspectos morfo-fisiológicos que minimizam as perdas hídricas. Porém, estas características não são suficientes para garantir uma alta sobrevivência durante as fases de aclimatização de plântulas micropropagadas. Nesta fase ocorrem mudanças na morfologia e anatomia das folhas, na epiderme e diferenciação do mesófilo, número e estrutura dos estômatos e cloroplastos. Baseando-se na hipótese que a composição do meio de cultura *in vitro* afeta a sobrevivência na fase da aclimatização, o presente trabalho objetivou estudar o efeito do meio de cultura MS a 50% e 100%, suplementado a diferentes concentrações de sacarose sobre algumas características morfo-fisiológicas durante as fases *in vitro* e *ex-vitro*. Foram avaliadas as características de área foliar, densidade e funcionalidade estomática, ceras totais, concentração de clorofilas *a,b* e totais das folhas. As diferentes concentrações de sacarose e nutrientes no meio de cultura influenciam no desenvolvimento e nas características morfo-fisiológicas da espécie em estudo. O meio de cultura MS a 50% ou 100% quando sem sacarose afetou negativamente a fotossíntese das plântulas. O meio MS a 100% com 2% de sacarose resultou em um aumento na área foliar, na densidade estomática, na morfologia dos estômatos que apresentaram formato elíptico, maior concentração de ceras epicuticulares e clorofilas *a,b* e totais, principalmente na fase de aclimatização.

**Palavras-chave:** sacarose, nutrientes, estômatos, micropropagação, ceras, clorofilas.

## ABSTRACT

*Agavea attenuate Salmy-Dyck* presents morpho-physiological features that prevent hydric stress. Those features however, are not correlated with a high rate of survival in the acclimatization phase of micropropagated plants. In this phase occur changes in the morphology and anatomy of leaves, in the epidermis and mesophyll, and in the number and structure of stomata and chloroplasts. Based on the hypothesis that the composition of culture medium affects the plantlet survival in the acclimatization phase, the present work aimed at to study the effect of full and half-strength MS culture medium supplemented with different levels of sucrose on some aspects morpho-physiological in the pre-acclimatization and acclimatization phases of micropropagated plantlets *Agave attenuata* Salmy-Dyck. The evaluated parameters were associated to the characteristics of leaf area, density and functionality of stomata, total waxes, and content of chlorophylls *a,b*, and total. The different levels of sucrose and nutrients of MS culture medium affected the development and morpho-physiological features. The half or full-strength MS medium free of sucrose negatively affected the photosynthesis of plantlets. Sucrose 2% supplemented to full strength MS enhanced the leaf area, increased the stomata density, the content of epicuticular waxes, chlorophylls *a,b* and total, and affected the stomata morphology which were elliptic in shape, mainly in the acclimatization phase.

**Key-words:** sucrose, nutrients, micropropagation, stomata, wax, chlorophylls.

## 1 INTRODUÇÃO

*Agavea attenuata* Salmy-Dyck apresenta metabolismo MAC - Metabolismo das Crassuláceas. Plantas MAC se relacionam á vários aspectos morfológicos e anatômicos que minimizam as perdas hídricas, incluindo a presença de cutícula grossa, diminuição na área foliar e o tamanho do estômato, além de possuir células e vacúolos grandes que aumentam a capacidade de armazenar água (LEEGOOD, 1993; CUSHMAN, 2001). Porém, todo este aspecto morfológico e anatômico não é suficiente para uma alta sobrevivência após a fase da aclimatização de plântulas micropropagadas. Após a transferência para a fase da aclimatização, ocorrem mudanças na morfologia e anatomia foliar, bem como em toda a epiderme, diferenciação do mesófilo da folha, número e estrutura dos estômatos e cloroplastos (POSPÍŠILOVÁ et al., 1999).

Segundo SHANGGUAN et al. (1999); SRINIVASA-RAO et al. (2000), a área foliar e os estômatos são considerados os principais responsáveis pelo decréscimo na atividade fotossintética. Em conjunto a esses fatores pode-se mencionar a inibição da formação de cera epicuticular na superfície das folhas (BRAINERD et al., 1981; FUCHIGAMI et al., 1981), que por sua vez, leva a uma excessiva transpiração das plantas quando transferidas para ambientes com baixa umidade relativa.

Sistemas de micropropagação são ferramentas biotecnológicas para obtenção de mudas em grande escala (FILA et al., 1998). No entanto, há poucos estudos sobre o controle ambiental *in vitro* para maximizar a taxa de sobrevivência de *Agave attenuata* Salmy-Dyck nas etapas de aclimatização. Há hipóteses de que altas concentrações de carboidratos e nutrientes no meio de cultura podem aumentar a área foliar das plântulas (ZARRABEITIA et al., 1997), promovendo um aumento na densidade estomática (SALISBURY & ROSS, 1992), concentração de ceras totais (PAOLETTI et al., 1998), e clorofilas totais (GUIDI et al., 1997), otimizando as etapas de aclimatização. Portanto, a área foliar, densidade e funcionalidade estomática, ceras totais e clorofilas *a*, *b* e totais podem estar associados com alterações do metabolismo do carbono e nitrogênio (CORNIC & MASSACI, 1996).

No presente trabalho partiu-se da hipótese de que as alterações nas composições químicas do meio de cultura *in vitro* podem maximizar a taxa de

sobrevivência. E que as diferentes concentrações de sacarose e nutrientes presentes no meio de cultura podem afetar as características morfofisiológicas durante as fases da pré-aclimatização e aclimatização de *Agave attenuata* Salmy-Dyck. Assim, o presente trabalho tem como objetivo comparar as diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%) no meio de cultura MS Murashige & Skoog (1962) a 50% e 100% de sua concentração sobre as características morfofisiológicas, como a área foliar, densidade e funcionalidade estomática das folhas, comprimento da célula guarda e do ostíolo estomático, largura da célula guarda e do ostíolo estomático, ceras totais, bem como concentração de clorofilas *a,b* e totais de *Agave attenuata* Salmy-Dyck nas fases *in vitro* e *ex vitro*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de Execução do Projeto

As etapas laboratoriais de pré-aclimatização e aclimatização e as determinações da área foliar, análises bioquímicas de ceras totais e clorofilas *a*, *b* e totais das plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck em respostas aos diferentes meios de culturas *in vitro* e etapas de aclimatização foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia - Estação Experimental de Itajaí da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – Epagri-Itajaí.

As avaliações da densidade e características biométricas dos estômatos, dimensões das células-guarda e ostíolo estomático, e densidade estomática em resposta as mudanças ambientais das condições heterotróficas para as fotoautróficas foram realizadas no laboratório de Anatomia Vegetal da UFSC.

### 2.2 Condição das Plântulas Durante a Fase de Pré-Aclimatização

Os explantes foram obtidos de plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck produzidos na fase de multiplicação *in vitro*. O meio de cultura utilizado na fase de multiplicação foi o MS Murashige & Skoog (1962), adicionado de 0,08 mg/L<sup>-1</sup> de ANA, 0,1 mg/L<sup>-1</sup> IBA, 1 mg/L<sup>-1</sup> de KIN, 10% de água de côco, 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e gelificado com 0,6% de ágar. Após 60 dias na fase de multiplicação, foi reduzido a parte aérea dos explantes, utilizando-se somente a parte basal do caule com 2 cm de comprimento. Em seguida, estes explantes foram transferidos para frascos de 100 ml contendo 20 ml de meio de cultura contemplando os seis tratamentos do experimento (Tabela 4).

O experimento foi conduzido no sistema fatorial em blocos inteiramente casualizado e as parcelas constituídas por 73 frascos com 4 plântulas por frasco. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura 25±2° C, umidade relativa do ar de aproximadamente 60%, intensidade luminosa 40 µmol.m<sup>-2</sup>.S<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas, durante 60 dias.



**Tabela 4:** Meios de cultura utilizados durante a fase de pré-aclimatização *in vitro* em explantes de *Agave attenuata* Salmy-Dyck.

<b>Murashige e Skoog (1962) (%)</b>	<b>Sacarose (%)</b>
50	0
	1
	2
100	0
	1
	2

### 2.3 Condição das Plântulas Durante a Fase de Aclimatização

Plântulas originadas da fase de pré-aclimatização *in vitro* submetidas aos diferentes tratamentos foram transferidas para bandejas de isopor contendo 200 células, tendo como substrato casca de arroz calcinada. As bandejas foram dispostas em telado de sombrite, com 50% de redução da luminosidade.

### 2.4 Avaliações

Foram realizadas três avaliações, sendo a primeira 60 dias após a fase de pré-aclimatização (sendo considerada o tempo 0 na aclimatização). A segunda foi realizada 70 dias após a implantação dos tratamentos *in vitro* (10 dias após a fase da aclimatização), e a terceira aos 80 dias após a implantação do experimento (20 dias após a fase da aclimatização).

### 2.5 Avaliação da Área Foliar

Para a análise de área foliar, as folhas foram escaneadas e as imagens foram avaliadas com o auxílio do software IDRISI Versão 2.0

## 2.6 Densidade Estomática

Para determinar o número de estômatos por área foram feitas observações em microscópio óptico em vista frontal da epiderme, considerando-se apenas as zonas intercostais na face adaxial. A contagem de estômatos foi realizada em campo microscópico, visualizado em 400x. A área do campo foi 157632,92 mm, sendo determinada utilizando-se a fórmula  $a = 2 \pi R^2$  (a = área; R = raio), onde o raio do campo microscópio foi de 224  $\mu\text{m}$ , e medida com auxílio de lâmina micrometrada. Foram utilizadas quatro lâminas para as visualizações, para cada lâmina foram feitas leituras em cinco campos diferentes e em cada campo foi contado 1 estômato, totalizando 5 estômatos contados por lâmina. Os dados obtidos foram apresentados em número de estômatos por  $\text{mm}^2$ .

## 2.7 Densidade e Características Biométricas dos Estômatos

A avaliação da densidade estomática (número de estômatos por  $\text{mm}^2$  de superfície foliar) e das características biométricas dos estômatos foi realizada em folhas de plântulas das quais se extraiu a clorofila pela metodologia descrita para a análise do conteúdo de clorofilas (Capítulo III).

Após extração da clorofila foram realizadas as visualizações dos estômatos somente na parte mediana das folhas. A fixação e conservação das amostras foram concluídas em etanol 70°GL, posteriormente coradas com safranina (BERLYN & MIKSCHE, 1976 – citado por KRAUS & ARDUIN, 1997) e desidratada em série etílica gradual. A seguir foram montadas entre lâminas e lamínulas com Bálsamo do Canadá sintético (JOHANSEN, 1940).

As observações foram realizadas em Microscópio Óptico (MO), marca Zeiss-Jena, modelo Loboal 4. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico Leica MPS 30 DMLS.

## 2.8 Dimensões das Células-Guarda e Ostíolo Estomático

A determinação das dimensões das células-guarda foi realizada considerando o comprimento (eixo longitudinal, entre os dois pólos da célula) e largura (eixo transversal, na porção média da célula), quando em vista frontal da superfície epidérmica. Para a determinação das dimensões do ostíolo estomático também foi considerado o eixo longitudinal e transversal, quando em vista frontal da superfície epidérmica.

Para as medições, as imagens foram projetadas, com auxílio de câmara clara acoplada ao microscópio óptico, sobre o papel e aferida com escala micrométrica, de modo a apresentar os resultados em micrômetros. Foram utilizadas quatro lâminas para as visualizações; para cada lâmina foram feitas leituras em cinco campos diferentes e em cada campo foi medido 1 estômato, totalizando 5 estômatos medidos por lâmina. Os dados foram apresentados em  $\mu\text{m}$ .

O número mínimo amostral foi calculado pela equação  $n=(t^2 \cdot s^2) \cdot d^{-2}$ , onde “t” é dado pela tabela de Student (considerando  $n^{-1}$ , com significância de 0,05), “s” é o desvio padrão e “d” é igual a E/100. Média, onde E=20 para 20% de probabilidade (SOKAL & ROHLF, 1969).

As médias obtidas para cada um dos seis tratamentos foram comparadas por análise de variância (análise multifatorial) e teste SNK (ao nível de significância de 5%), através do programa computacional Statgraphics (1993).

## 2.9 Determinação dos Níveis de Ceras Totais

Para a determinação de ceras totais foi utilizada a metodologia descrita por Roberts et al., (1990). Foi utilizada matéria fresca de plântulas oriundas de sistemas de micropropagação, bem como das fases de aclimatização.

Para se obter a curva padrão extraiu-se a parte aérea de plantas mantidas em casa de vegetação. Em seguida imergiu-se as mesmas em 50 mL solução de clorofórmio 100% durante 1,30 segundos. Esta solução foi filtrada e logo após o tubo foi previamente pesado em balança analítica e em seguida adicionou-se 25 mL da

solução filtrada que foi evaporada até secura total em banho-maria 100° C. Os 25 mL restantes desta solução filtrada foram distribuídos em béqueres com 0,1 mL; 1 mL; 2 mL; 5 mL e 10 mL entre os quais foram evaporados em banho-maria até secura total a 100°C. Depois pesou-se novamente o tubo com a cera extraída que fora identificado e previamente pesado pela diferença de peso (25 mL=X mg de cera). Anotou-se o valor deste tubo com o peso anterior do tubo sem a cera e adicionou-se solução ácida de  $K_2Cr_2O_7$  (5 mL). Em seguida as amostras foram mantidas em banho-maria, a 100°C, por 30 minutos e logo após foram esfriadas e adicionada água deionizada (12 mL). Procedeu-se então à leitura em espectrofotômetro (UV – visível) Sento, modelo 700 plus, com a absorvância 590 nm.

Segundo os procedimentos descritos neste protocolo para quantificar as ceras totais foi necessário primeiramente medir 1 cm<sup>2</sup> da área da folha e em seguida imergiu-se em 10 mL de clorofórmio 100%, durante 1,30 segundos. Logo após filtrou-se a solução de clorofórmio para remover as partículas; evaporou-se o filtrado em banho-maria a 100°C até secura total; adicionou-se solução ácida de  $K_2Cr_2O_7$  (5 mL) e aqueceu-se em banho-maria a 100°C, durante 30 minutos. Em seguida foi adicionada água deionizada (12 mL) e esperou-se 5 minutos para desenvolver cor, a partir desses extratos às amostras foram analisadas em espectrofotômetro (UV – visível) Sento, modelo 700 plus, com a absorvância 590 nm.

## **2.10 Determinação de Clorofilas a,b e Totais**

A determinação do conteúdo de clorofilas *a*, *b* e totais em plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck foi realizada através de coletas de amostras de 100 mg de massa fresca, conforme metodologia utilizada por Hiscox & Israelstam (1979). As amostras foram adicionadas de 7 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) sem maceração, por 30 minutos a 65%. Em seguida as amostras foram submetidas ao processo de filtragem simples em papel filtro tendo seu volume completado para 10 mL com DMSO. Desses extratos 2 mL foram analisados em espectrofotômetro (UV – visível) Sento, modelo 700 plus, para os valores de absorvância entre 645 e 663 nm. Os valores obtidos foram submetidos à fórmula de Arnon (1949), conforme descrito por

Hiscox & Israelstam (1979):

$$\text{mg/cm}^3 \text{ clorofila a} = (0,0127 \times D663) - (0,00269 \times D645)$$

$$\text{mg/cm}^3 \text{ clorofila b} = (0,0229 \times D645) - (0,00468 \times D663)$$

## 2.11 Análise Estatística

Para área foliar, ceras totais, clorofilas *a*, *b* e totais foram utilizadas três repetições com três amostras. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA); a comparação das médias foi realizada pelo teste SNK, em nível de 5% de probabilidade, conforme recomendações de Steel & Torrie (1980).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Área Foliar

Houve uma inibição da área foliar em plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck cultivadas no meio MS a 50% desde a fase da pré-aclimatização até o final das fases da aclimatização em relação ao meio de cultura MS com 100% (Tabela 5). Essa inibição pode estar associada a um rápido esgotamento do meio de cultura e das condições favoráveis de crescimento da espécie, já que as condições ambientais e a necessidade específica de nutrientes para cada espécie podem estar influenciando seu crescimento (INGESTAD et al., 1995).

Não foram detectadas diferenças significativas entre diferentes concentrações do meio basal MS 50% e 100% na ausência de sacarose, porém a sua ausência afetou negativamente o incremento da área foliar (Tabela 5). Segundo Lima et al. (2000), as características genéticas e as condições internas das células podem ser afetadas pela aquisição e distribuição das fontes de carboidratos, os quais são essenciais para o crescimento e desenvolvimento da área foliar.

As diferentes concentrações de sacarose não diferiram estatisticamente entre si para a área foliar na fase de pré-aclimatização independente da concentração do meio de cultura MS. No entanto, houve um incremento da área foliar na presença de sacarose 1% e 2% tanto para o meio de cultura MS com concentração 50% e 100% em relação aos tratamentos sem sacarose (Tabela 5). Assim, sugere-se que a sacarose não seja somente uma fonte de carboidrato, mas que esteja envolvida no controle de expressão de genes que regulam o crescimento dos órgãos (SHEEN, 1994). O papel da sacarose no desenvolvimento foliar ainda é pouco conhecido, havendo evidências de que ela se relacione com o controle do ciclo celular (RIOU-KHAMLICHI et al., 2000).

Sabe-se que o suprimento de nitrogênio afeta não somente o desenvolvimento da planta, mas também altera a área foliar e as taxas fotossintéticas, tanto nas fases de pré-aclimatização como nas fases da aclimatização (WONG et al., 1985).

**Tabela 5:** Área foliar e Densidade dos Estômatos de plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck micropropagada em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2 %).

Tratamentos		Área foliar	Densidade dos estômatos
Sacarose %	MS	(cm <sup>2</sup> )	(mm <sup>2</sup> )
<b>60 dias após pré-aclimatização <i>in vitro</i></b>			
<b>Avaliação 1</b>			
0		1,69 A b	24,74 A b
1	50	1,94 B a	60,58 A a
2		2,13 B a	54,87 A a
<hr/>			
0		1,90 A b	38,70 A b
1	100	4,72 A a	33,31 A b
2		5,15 A a	70,10 A a
CV%		52,04	22,84
<b>10 dias após aclimatização</b>			
<b>Avaliação 2</b>			
1		2,20 B b	46,63 A a
2	50	4,43 B a	40,92 A a
<hr/>			
1		4,90 A b	44,70 A a
2	100	7,03 A a	44,72 A a
CV%		28,33	16,65
<b>20 dias após aclimatização</b>			
<b>Avaliação 3</b>			
1		2,74 B b	45,04 A a
2	50	5,12 B a	41,24 B a
<hr/>			
1		5,32 A b	48,85 A b
2	100	8,80 A a	75,17 A a
CV%		29,06	15,58

Letras maiúsculas comparam médias de MS para cada concentração de sacarose. Letras minúsculas comparam médias das concentrações de sacarose em cada MS. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ).

Podemos observar um efeito residual significativo da sacarose 2% no meio MS 100% durante as fases da aclimatização em relação à área foliar. Já o meio basal MS a 100% possibilitou em incremento significativo da área foliar em todas as fases da aclimatização independente da concentração da sacarose (Tabela 5).

Tichá et al., (1998) também observou um aumento significativo na área foliar de plântulas cultivadas em meios com sacarose 2% tanto para as fases da pré-aclimatização como da aclimatização *ex vitro*. Para Sinclair & Horie (1989) há uma alta correlação entre o suprimento das fontes de carbono e nitrogenadas durante a micropropagação das plântulas de *Oryza sativa* L. e *Zea mays* L. em relação ao crescimento na fase da aclimatização.

Masle (2000), afirmou que a divisão e a expansão celular podem ser aumentadas pelo suprimento de sacarose e possivelmente pela expressão diferencial de genes. Além disso, está bem estabelecido que os hormônios estão envolvidos no controle de eventos tais como divisão e alongação celular e síntese de proteínas. As citocininas regulam a divisão celular, diferenciação e genes da ciclina (D'AGOSTINO & KIEBER, 1999), e alongação celular (RAYLE et al, 1982). Plântulas cultivadas com altas concentrações de nitrogênio e carbono aumentaram a área foliar em 43% em relação a plantas com baixa concentração de nitrogênio e carbono. Estes resultados podem estar relacionados com o aumento endógeno de citocininas na área foliar (YONG et al., 2000).

Ainda de acordo com Masle (2000), altas concentrações de carbono afetam a expansão e divisão celular na área foliar. Este aumento na divisão celular e na expansão celular pode somente ocorrer quando as fontes de C e N não são limitantes (LEUGENE et al., 1994). A atividade fotossintética das plantas é influenciada pela limitação de nitrogênio e carbono que refletem nos níveis endógenos de citocininas (ARP, 1991; STITT, 1991).

O efeito significativo da presença da sacarose nos meios de cultura *in vitro* reflete positivamente na acumulação de fontes de carboidratos nas folhas nas fases de aclimatização (MAREK et al., 1995). Até que novas folhas sejam formadas após a transferência *ex vitro* os carboidratos acumulados serão as principais fontes de energia para o crescimento das plantas (GALZY & COMPAN, 1992). Mas o estímulo do crescimento, em resposta a elevadas concentrações de sacarose no meio de cultivo, provavelmente diminui com o tempo por causa da baixa regulação fotossintética e modificações de alocação de biomassa ou pela fenologia da planta (URBAN, 2003).

Grout & Millan (1985), observaram que a diminuição nas concentrações de sacarose durante a fase *in vitro* pode ser uma estratégia pouco adequada visto que esta redução pode afetar o número de folhas formadas com reflexos negativos na fase de aclimatização. Segundo Buddendorf–Joostem & Woltering (1994), a sacarose nas fases *in vitro* pode promover um aumento na atividade fotossintética que influenciará no crescimento *ex vitro*. O crescimento foliar através do alongamento celular é sensível ao estresse hídrico (HSIÃO & JACKSON, 1999). Por essa razão as plantas que crescem em condições elevadas de CO<sub>2</sub> possuem alta taxa de sobrevivência (AMTHOR, 1991).



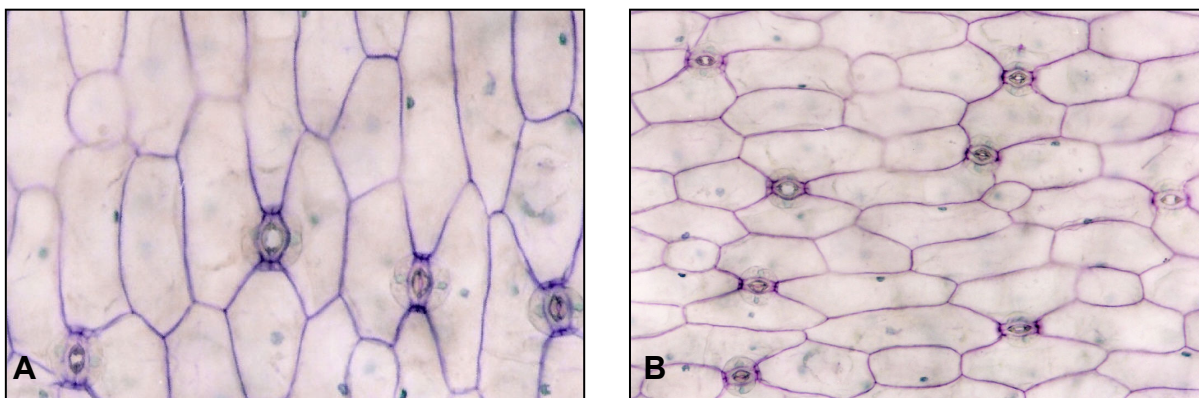
Não houve interação entre as concentrações de sacarose (0, 1 e 2%) e concentrações do meio MS 50% e 100%. Neste aspecto, ocorreu apenas efeito simples dos fatores.

### 3.2 Densidade Estomática

As folhas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck apresentam características anfiestomáticas, caracterizadas pela presença de estômatos em ambas as fases (abaxial e adaxial), ocorrendo variação na distribuição estomática sobre as duas faces. No entanto, no presente trabalho observou-se que às folhas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck apresentaram maior densidade estomática na fase adaxial. Devido a este fator, a densidade e funcionalidade estomática das folhas, comprimento da célula guarda e do ostíolo estomático, largura da célula guarda e ostíolo estomático, foram realizadas somente na face adaxial (Figura 5).

A distribuição e densidade estomática na superfície foliar possuem importantes implicações nas trocas gasosas (ANDERSON & BRISKE, 1990). A distribuição e densidade dos estômatos podem ser modificadas por vários fatores ambientais afetando a epiderme, crescimento e expansão celular, número e a forma dos tricomas (BAKKER, 1991). Nas fases *in vitro* esta característica pode estar relacionada com a alta umidade relativa (NICOLOSO et al., 2001), bem como às diferentes concentrações exógenas de carbono e nutrientes do meio de cultura (FUCHIGAMI et al., 1981; UPRETY et al., 2002), e ao metabolismo MAC - Metabolismo das Crassuláceas (LEEGOOD, 1993). Plantas MAC possuem vários mecanismos adaptativos para maximizar a entrada de CO<sub>2</sub>, quando a luz e a sacarose são fatores limitantes (KRAMER, 1969; CUSHMAN, 2001). Observou-se um aumento na densidade estomática ao final da aclimatização em plântulas oriundas de tratamentos com 2% de sacarose independente da concentração do meio MS (Figura 5).

As diferentes concentrações nutricionais do meio MS 50% e 100% não afetaram a densidade dos estômatos durante a fase da pré-aclimatização até o final do décimo dia da aclimatização. Porém ao final do vigésimo dia da aclimatização, houve um aumento significativo na densidade estomática em plantas oriundas do meio MS a 100% principalmente na presença de sacarose 2% (Tabela 5).



**Figura 5:** Densidade estomática de plântulas de *Agave attenuata* Salmy Dyck ao final do vigésimo dia da aclimatização, sob os tratamentos: (A) T5 - meio basal MS 50% com sacarose 2%, (B) T6 - meio basal MS 100% com sacarose 2%.

Este aumento sugere que a redução nutricional refletiu negativamente na densidade estomática ao longo do tempo. Segundo Dale (1988), o mecanismo de diferenciação estomática é influenciado por eventos biofísicos e bioquímicos que regulam a divisão e a expansão celular no desenvolvimento das folhas. Fatores como luminosidade, altitude, disponibilidade hídrica, concentração nutricional e fontes de carboidratos podem causar mudanças na densidade estomática (SCHOCH et al., 1980). Aumento na concentração de nitrogênio no aparato fotossintético promove um aumento na concentração do CO<sub>2</sub> no espaço intracelular e no sítio de carboxilação. Esta associação benéfica promove um aumento na expansão celular e isto implica no aumento no número de estômatos e células epidérmicas (BEERLING et al., 1992).

Assim, relacionado ao presente trabalho pode-se sugerir que a expansão da área foliar foi influenciada positivamente pela sacarose 2% no meio de cultura basal MS 100%. Isto porque houve uma variação na densidade estomática em resposta as diferentes concentrações de sacarose no meio MS 100% ao final do vigésimo dia da fase de aclimatização (Tabela 5).

Para os tratamentos com a ausência de sacarose, independente da concentração do meio MS utilizado, os resultados mostraram uma influência negativa no número de estômatos da área foliar durante as fases *in vitro* (Tabela 5).

A ausência de sacarose no meio de cultura pode resultar em estômatos deformados, largos e salientes e estas alterações morfológicas podem impedir o fechamento estomático (PREECE & SUTTER, 1991). No presente trabalho observou-se a presença de folhas vitrificadas nos meios MS sem sacarose. Esta

vitricificação está relacionada à falta de carboidratos nos meios de culturas (CAPPELADES et al, 1991). Folhas vitrificadas geralmente apresentam estômatos grandes e salientes, com forma assimétrica e deformadas e ostíolos completamente abertos devido à falta de elasticidade das células guardas (VINÃ et al., 2001), aspecto este observado no presente trabalho (Figura 6), o que pode promover perdas excessivas de água nas fases da aclimatização (BRAINERD & FUCHIGAMI, 1981).

Não houve efeito residual significativo das diferentes concentrações de sacarose 1% e 2% durante os dez primeiros dias da aclimatização para a densidade estomática (Tabela 5). Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Sachs et al. (1993), onde as diferentes concentrações de carboidratos não afetaram a densidade dos estômatos em folhas de *P. media*. No entanto, Atkinson et al. (1997), diagnosticou um aumento na densidade estomática em plântulas de *Quercus robur L.* em função do aumento da disponibilidade de carboidratos no meio de cultura.

Após o final do vigésimo dia da aclimatização a concentração de sacarose 2% promoveu um efeito significativo na densidade estomática nas plantas oriundas do meio MS 100% (Tabela 5). Resultados semelhantes foram relatados por Meidner & Mansfield (1968), os quais verificaram que a exposição elevada de CO<sub>2</sub> aumentou a densidade estomática na superfície foliar adaxial e abaxial de *S. minor* e *L. corniculatus*, sugerindo que o CO<sub>2</sub> possui efeito na divisão e diferenciação meristemática durante os primeiros estágios de crescimento nestas espécies (FERRIS & TAYLOR, 1994).

Há indícios de que os estômatos se iniciem diretamente da divisão celular do protoderme tornando-se um meristema secundário formando as células guarda mãe (PALEVITZ, 1981). Para Woodward (1987), o aumento na densidade estomática em resposta as altas concentrações de CO<sub>2</sub> não está negativamente correlacionado com o tamanho da folha, mas positivamente correlacionado com o número de células epidérmicas por mm<sup>2</sup>. Deste modo as variáveis que governam o tamanho de área foliar, não necessariamente governam a divisão celular epidérmica, mas influenciam no crescimento celular epidérmico, podendo afetar a densidade dos estômatos.

Segundo Ferris & Taylor (1994), a densidade dos estômatos pode ser controlada pela quantidade de substâncias diretamente relacionadas à capacidade

de carboxilação do mesófilo e à concentração interna do CO<sub>2</sub> nas folhas. A maioria das plantas diminui a densidade estomática na fase de aclimatização, a exemplo de *Liquidambar styracifolium*, *Vaccinium corymbosum* e *Nicotiana tabacum* (TICHÁ et al., 1999). No entanto, plantas de *Rhododendron* spp. aumentaram a densidade estomática após o transplante *ex vitro* (WALDENMAIER & SCHMIDT, 1990).

Alguns tratamentos propiciaram decréscimo na densidade estomática, exceto no meio MS 100% com sacarose 2% para o qual ocorreu aumento na densidade estomática (Tabela 5).

Este decréscimo na densidade estomática pode estar relacionado às condições ambientais dos meios de cultura com deficiência nutricional e fontes de carbono. O aumento significativo na densidade estomática em plântulas oriundas de meios com a adição de sacarose 2% no MS 100% durante as fases de aclimatização, possivelmente relaciona-se com a associação benéfica das fontes de carboidratos e nitrogênio. Tendo em vista que o metabolismo desta planta é MAC, aumentos na densidade estomática podem estar correlacionados a uma adaptação fisiológica para absorver mais CO<sub>2</sub> para o interior da planta durante a noite, que será convertido em ácidos orgânicos para o metabolismo fotossintético (SCHROEDER et al., 2001). Esta difusão do CO<sub>2</sub> para o mecanismo fotossintético e as trocas gasosas e hídricas entre a folha e a atmosfera pode ser influenciada pelo tamanho do ostíolo estomático afetando a sobrevivência das plantas nas etapas de aclimatização (BROWNLEE, 2001).

### **3.3 Densidade e Características Biométricas dos Estômatos**

O meio MS 100% promoveu um efeito nutricional significativo para o comprimento da célula guarda na ausência de sacarose e na presença de sacarose 1% durante a fase da pré-aclimatização (Tabela 6).

A ausência de sacarose, independente da concentração do meio de cultura MS, não resultou em diferenças significativas entre si para a largura do ostíolo estomático (Tabela 6). Para o comprimento do ostíolo estomático e largura da célula guarda não houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações nutricionais dos meios de cultura. Não foi diagnosticado efeito nutricional em todos

os tratamentos para as variáveis comprimento do ostíolo estomático e largura da célula guarda durante todas as fases da aclimatização (Tabela 6). Entretanto, ao final da fase da aclimatização, observou-se um decréscimo no comprimento do ostíolo estomático e largura do ostíolo estomático em plântulas provenientes do meio MS 100% na presença de sacarose 2%. Observou-se ainda que no meio MS 100%, quanto maior a concentração de sacarose menor foi o comprimento do ostíolo estomático. E a largura da célula guarda durante a fase de pré-aclimatização (Tabela 6).

As células guardas dos estômatos funcionam como válvulas hidráulicas. As variações no seu volume são responsáveis pelo controle do grau de abertura dos ostíolos. O grau de abertura, por sua vez, influencia decisivamente a difusão do CO<sub>2</sub> para o interior dos espaços aéreos foliares e a perda de água na forma de vapor para a atmosfera (WARD et al., 1995). As células guardas possuem um importante papel no mecanismo dos movimentos estomáticos. A propriedade de movimento das paredes é em grande parte determinada pela orientação das microfibrilas de celulose e pela alta elasticidade da parede (PALEVITZ, 1981). Todo este mecanismo é influenciado pela concentração de sacarose no meio de cultura, que promove um ajuste osmótico nas células guardas (TALLMAN & ZEIGER, 1988), evitando perdas excessivas de água na fase da aclimatização (BRAINERD & FUCHIGAMI, 1981).

As análises microscópicas (Figuras 6) mostraram que os estômatos de *Agave attenuata* Salmy-Dyck durante a fase *in vitro* apresentaram-se totalmente abertos e com formas arredonadas. Segundo Blanke & Belcher (1989), os estômatos *in vitro* são grandes e arredondados (Figura 6); a forma geralmente é influenciada pela idade da planta. Brainerd & Fuchigami (1981), também verificaram que os estômatos de plântulas de maçãs permaneceram completamente abertos *in vitro*. Isto seria uma das causas que contribuem para o estresse hídrico pós-transplante, que geralmente ocorre devido às lentas respostas estomáticas em plantas providas de cultura de tecidos (SUTTER & LANGHANS, 1979).

Após a fase da aclimatização observou-se que plantas oriundas do meio com 2% de sacarose independente da concentração do meio MS apresentaram estômatos com formato menos alongado, de forma elíptica e com densidade crescente a partir da fase final da aclimatização (Figura 6). Estas seriam características desejáveis para estômatos, uma vez que se relacionam com a minimização de perdas excessivas de água pelas folhas (ABRANS et al., 1992).

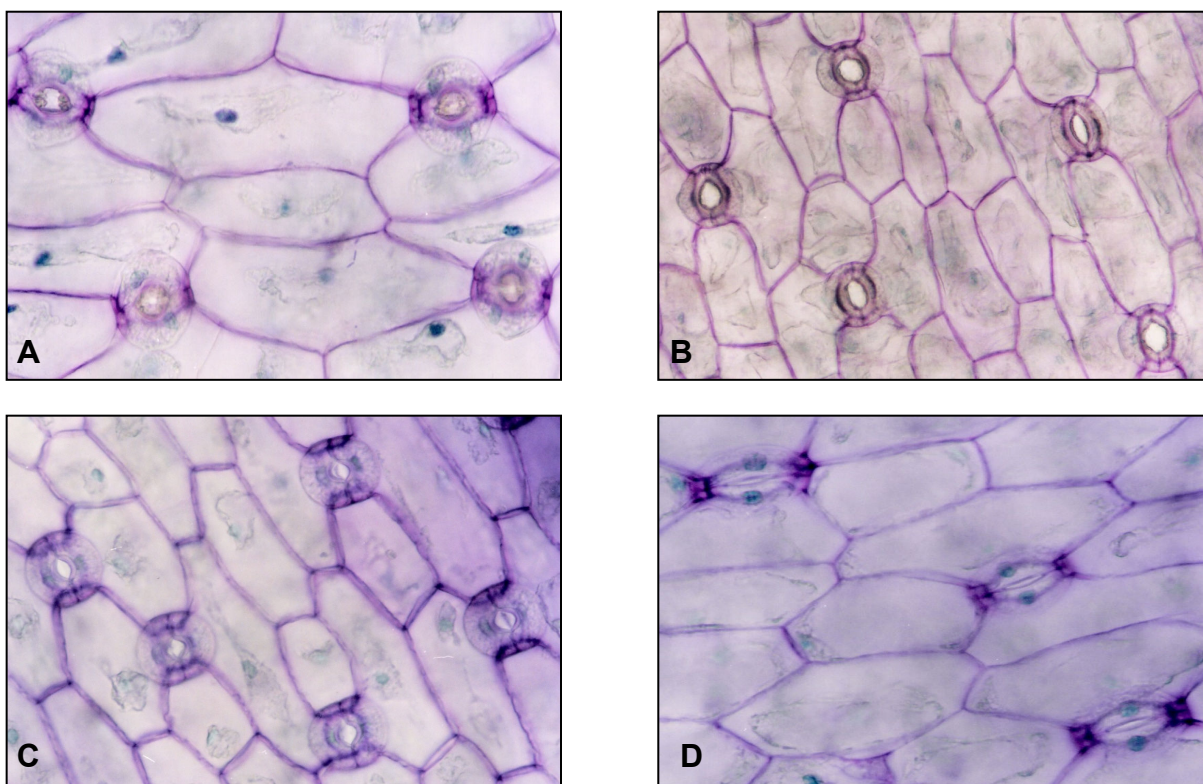
Plantas de *Rhododendron* spp tiveram o comprimento do ostíolo estomático reduzido depois do transplante *ex vitro* (WALDENMAIER & SCHMIDT, 1990). Plantas *in vitro* de *Prunus cerasus*, *Vacinum corymbosum* possuíam estômatos com forma arredondada e quando transferidas para a fase de aclimatização formaram estômatos elípticos (MARÍN & GELLA, 1988). Assim, as plantas respondem ao estresse hídrico mudando não somente a sua fisiologia, mas também a anatomia e morfologia (LICHTENTHALER et al., 1983).

**Tabela 6:** Funcionalidade estomática: comprimento da célula guarda (CCG), comprimento do ostíolo estomático (COE), largura da célula guarda (LCG), largura do ostíolo estomático (LOE) de plântulas de *Agave attenuata* Salm-Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%).

Tratamentos		CCG	COE	LCG	LOE
Sacarose %	MS	(µm)			
<b>60 dias após pré-aclimatização <i>in vitro</i></b>					
<b>Avaliação 1</b>					
0		29,52 B a	12,29 A a	9,52 A a	7,90 A a
1	50	29,54 B a	10,90 A a	8,93 A b	5,14 B b
2		30,48 A a	10,67 A a	8,29 A b	4,43 B b
0		34,47 A a	14,90 A a	8,38 A a	7,88 A a
1	100	31,43 A b	11,46 A b	8,24 A a	6,24 B b
2		30,95 A b	11,05 A b	9,00 A a	3,62 B c
CV%		12,71	24,35	15,94	22,75
<b>10 dias após aclimatização</b>					
<b>Avaliação 2</b>					
1		28,24 A b	11,90 A b	7,90 A a	7,70 A a
2	50	29,95 A a	12,90 A a	6,62 A b	6,62 A b
1		28,95 A b	11,47 A b	7,86 A a	7,86 A a
2	100	31,05 A a	12,67 A a	6,09 A b	5,33 A b
CV%		16,16	15	22,75	22,75
<b>20 dias após aclimatização</b>					
<b>Avaliação 3</b>					
1		27,29 A a	11,95 A b	8,19 A a	4,09 A a
2	50	27,00 A a	13,71 A a	6,48 A b	4,38 A a
1		28,14 A a	12,62 A a	8,43 A a	4,28 A a
2	100	28,62 A a	9,14 B b	7,57 A b	3,67 B b
CV%		11,86	21,06	16,26	22,83

Letras maiúsculas comparam médias de MS para cada concentração de sacarose. Letras minúsculas comparam médias das concentrações de sacarose em cada MS. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ).

O aumento da concentração nutricional teve influência somente no comprimento da célula guarda durante a fase *in vitro*. Ao final da aclimatização, observou-se que as concentrações de sacarose 2% influenciaram com maior intensidade no fechamento estomático para as variáveis: comprimento do ostíolo estomático, largura da célula guarda e largura do ostíolo estomático (Tabela 6). As fontes de carboidratos presentes nos meios de cultura têm sido descritas como soluto osmótico alternativo para a abertura e fechamento estomático (TALLMAN & ZEIGER, 1988). O ajuste osmótico é um dos fenômenos fisiológicos mais eficientes envolvidos na resistência hídrica de plantas (SRINIVASA-RAO et al., 2000).



**Figura 6:** Funcionalidade estomática de plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck : (A) - meio MS (50%) sem sacarose (fase *in vitro*), (B) - meio MS (100%) sem sacarose (fase *in vitro*), (C)- meio MS (100%) com sacarose (2%) (fase *in vitro*), e (D) fase final da aclimatização plantas oriundas do meio MS 100% com 2% de sacarose. Observar a forma elíptica nos estômatos.

Em condições de deficiência de  $K^+$ , os carboidratos contribuem para a osmorregulação nas células guardas (POFFENROTH et al., 1992). Entretanto, esta deficiência de  $K^+$  pode resultar em uma resposta lenta no acúmulo de açúcares nas células guardas que afetam a abertura e o fechamento dos estômatos (HSIÃO & LÄUCHLI, 1986). O estado nutricional de  $K^+$  nas plantas influencia os açúcares e outros solutos a contribuir para o potencial osmótico e turgor da expansão celular

(SCHNYDER et al., 1988). O  $K^+$  está presente nas células guarda da membrana plasmática e é inibido pelo aumento de cálcio no citosol (LEMTIRI-CHLIEH et al., 2000).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que alterações nos constituintes nutricionais do meio de cultura são fatores determinantes para a densidade estomática e características biométricas dos estômatos afetando o mecanismo funcional estomático. Deste modo recomenda-se à utilização da concentração de sacarose de 2% no meio MS a 100%, tendo em vista que este tratamento apresentou características desejáveis, ou seja, maior número de estômatos com formato elíptico variando muito pouco na forma. Essas características são essenciais para otimizar a sobrevivência e a capacidade fotossintética durante as fases da aclimatização.

### 3.4 Ceras Totais

Outro fator limitante na sobrevivência das plantas na etapa de aclimatização é a formação de cera epicuticular na superfície das folhas (BRAINERD & FUCHIGAMI, 1981; FUCHIGAMI et al., 1981).

O conteúdo de ceras epicuticulares nas folhas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck mostrou que não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações do meio de cultura MS 50% e 100% durante a fase *in vitro*. Os resultados também demonstraram que as diferentes concentrações de sacarose 1% e 2% também não promoveram diferenças significativas para este parâmetro, muito embora meios sem sacarose resultaram em teores menores de ceras em relação aos demais tratamentos com sacarose (Tabela 7).

O decréscimo no conteúdo de ceras epicuticulares em folhas oriundas de meios de cultura com ausência de sacarose está relacionado á alta umidade relativa *in vitro*. A alta umidade relativa encontrada nas fases de micropropagação afeta a estrutura interna, a morfologia da planta, bem como os processos bioquímicos e fisiológicos. A inibição na formação de ceras pode levar a uma excessiva transpiração da planta quando transplantada para ambientes com baixa umidade



relativa. Este fato associado à respiração estomática pode ocasionar um estresse hídrico levando a planta à morte, quando transplantada a campo (GROUT & ASTON, 1977).

Com a ausência da cera epicuticular o controle de água pelos estômatos não é suficiente para manter o turgor, prevenindo a desidratação da planta através das folhas (GRNCAREVIC & RADLER, 1967). Segundo Wardle et al. (1979), sacarose e ágar em altas concentrações no meio de cultura podem agir como agentes osmóticos podendo minimizar a umidade relativa nos recipientes de cultura. Short et al. (1987), observou uma diminuição da umidade relativa em resposta à presença exógena de sacarose nas fases *in vitro*, resultando em aumento na formação de ceras epicuticulares e no funcionamento estomático em folhas de crisântemo.

Assim, pode-se concluir que, no presente trabalho, ausência de sacarose promoveu um aumento na umidade relativa nos recipientes de cultura, o que pode ter afetado a formação de ceras epicuticulares em plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck, provenientes destes meios de culturas.

Na fase de pré-aclimatização a quantidade de ceras nas folhas foi menor em relação ao vigésimo dia da aclimatização. Observou-se um decréscimo na formação de ceras em todos os tratamentos ao final do décimo dia da fase *ex-vitro* e um posterior aumento na formação das ceras epicuticulares ao final do vigésimo dia da aclimatização (Tabela 7).

Wetzstein & Sommer (1982), encontraram uma concentração baixa de ceras epicuticulares em folhas de plântulas *in vitro* de *Liquidambar styraciflua*. No entanto, após a transferência para a fase *ex vitro* ocorreu um aumento significativo na concentração de ceras epicuticulares o que, por sua vez, aumentou a sobrevivência das mudas transplantadas. Sutter (1988), obteve resultados semelhantes com plântulas de *Malus domestica*. Este comportamento está relacionado à fase de transição mixotrófica para autotrófica, que é caracterizado pelo retardo no desenvolvimento das ceras epicuticulares e no funcionamento do aparelho estomático. Estes fatores afetam os processos de micropropagação causam alta taxa de transpiração cuticular das plântulas nas condições *ex vitro* (SANTAMARIA et al., 1995).

Durante a fase de aclimatização observou-se que quanto maior a concentração de sacarose no meio basal MS 100%, maior o conteúdo de ceras na folhas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck (Tabela 7). A habilidade para regenerar ceras

epicuticulares depende da espécie investigada e do estágio de desenvolvimento da folha. Infelizmente pouco se conhece sobre a biossíntese de ceras nos diferentes estágios de desenvolvimento das folhas (NEINHUIS et al., 2001).

**Tabela 7:** Ceras epicuticulares de plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%).

Tratamentos		Ceras totais (mg massa fresca/cm <sup>2</sup> )		
Sacarose %	MS	Tempo de aclimatização (dias)		
		0	10	20
0		0,71 A b	.....	.....
1	50	0,92 A a	0,40 A a	1,20 A a
2		1,24 A a	0,50 B a	1,30 B a
0		0,75 A b	.....	.....
1	100	1,04 A a	0,46 A b	1,45 A b
2		1,34 A a	0,60 A a	1,80 A a
CV%		22,65	21,21	18,26

Letras maiúsculas comparam médias de MS para cada concentração de sacarose. Letras minúsculas comparam médias das concentrações de sacarose em cada MS. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ).

Há hipóteses de que as composições químicas do meio de cultura afetam a concentração das ceras nas plantas (GRNCAREVIC & RADLER, 1967). Altas concentrações de sacarose no meio de cultura podem aumentar a deposição de ceras em algumas espécies arbustivas em crescimento (PAOLETTI et al., 1998). Estas respostas podem proceder em um decréscimo na taxa de transpiração por unidade de área foliar (POSPIŠILOVÁ & CATSKÝ, 1999). Segundo Grout & Aston (1977), as anormalidades morfo-fisiológicas (ceras epicuticulares) também podem ser afetada pelas concentrações nutricionais.

A formação de ceras em algumas plantas como *Passiflora microstipula* e *Convallaria majallis* está relacionada à expansão foliar (NEINHUIS & BARTHLOTT, 1997). Segundo Neinhuis et al. (2001), muitas espécies são capazes de produzir ceras durante a expansão das folhas. Alguns autores defendem a hipótese que deposição de ceras epicuticulares está correlacionada á expansão celular foliar e à densidade estomática.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a formação de ceras nas folhas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck pode realmente estar envolvida com a expansão da área foliar, tendo em vista que o tratamento com 2% de

sacarose no meio MS 100%, promoveu a maior área foliar, densidade estomática e um melhor ajuste estomático durante as fases de pré-aclimatização e aclimatização.

### 3.5 Clorofila *a*, *b* e Totais

As clorofilas estão ligadas à eficiência fotossintética das plantas e, conseqüentemente, ao crescimento e adaptabilidade a diversos ambientes. As clorofilas encontram-se organizadas nas membranas dos cloroplastos. As moléculas dos pigmentos, nas membranas dos tilacóides, estão estruturadas de modo a otimizar a absorção de luz e a transferência da energia de excitação eletrônica para o centro da reação da fotossíntese (YOUNG, 1991). Plantas micropropagadas apresentam fotomixotrofia caracterizado por um baixo conteúdo de clorofilas, o que afeta a atividade fotossintética e o crescimento (GROUT & MILLAM, 1985).

Embora a maioria das plantas tenha os teores de clorofilas reduzidos em condições de limitação de suprimento de N durante a fase *in vitro* (HALPERIN & WETHEREL, 1965), as plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck provenientes do meio MS a 50% de sua concentração tiveram níveis de clorofila total sem diferença significativa dos valores observados em resposta ao meio MS a 100% (Tabela 8). Isto sugere que essa espécie é mais sensível ao carbono do que ao nitrogênio no tocante as concentrações de clorofilas *a*, *b* e total durante a fase heterotrófica.

As diferentes concentrações de sacarose não afetaram esse parâmetro independente da concentração do meio de cultura MS. Porém, o acúmulo de clorofilas *a*, *b* e total foi afetado negativamente em meios sem sacarose. Assim, a presença da sacarose no meio de cultura foi um fator limitante na transição da fase mixotrófica para a autotrófica (Tabela 8).

Após o décimo dia da aclimatização não se observaram diferenças para este parâmetro em resposta as concentrações do meio MS. No entanto, ao final do vigésimo dia plântulas oriundas do meio MS a 50%, apresentaram menores concentrações de clorofilas *b* e total (Tabela 8).

Após o transplante para fase de aclimatização a maior parte das mudas provenientes do meio MS a 50% de sua concentração, demonstrou queda nas concentrações de clorofilas *a*, *b* e total com exceção às mudas oriundas do meio MS

a 100%, as quais aumentaram a concentração de clorofilas a, b e total ao final desta mesma fase de aclimatização (Tabela 8).

Em plantas aclimatizadas de *Spathiphyllum floribundum* e *Solanum tuberosum*, o conteúdo de clorofilas a,b e total diminuiu de forma transiente durante as primeiras semanas após o transplante *ex vitro* (SYNKOVÁ, 1997). No presente trabalho, o conteúdo de clorofilas a e total aumentou na fase final da aclimatização em plantas oriundas do meio MS a 100% com 2% de sacarose. Assim, esses resultados corroboram as afirmações de Halperin & Wetherel (1965), que o efeito da composição do meio de cultura, com as diferentes fontes de carboidratos Verma & Dougall (1977), afetam a relação dos constituintes bioquímicos vegetal durante a fase da aclimatização.

Na ausência de sacarose o suprimento hídrico pode ser limitado devido à baixa condutividade das raízes (FILA et al., 1998). O aumento nas concentrações de CO<sub>2</sub> pode minimizar o estresse hídrico das plantas nas fases de aclimatização, promovendo a fotossíntese da planta e o crescimento *ex vitro* (BUDDENDORF-JOOSTEN & WOLTERING, 1994).

Como mostrado no presente trabalho, a sacarose mostrou ser um fator determinante na concentração de clorofilas das folhas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck tanto na fase pré-aclimatização quanto na aclimatização (Tabela 8).

De acordo com Tichá et al. (1998), a adição de açúcares ao meio de cultura parece ter um papel ambíguo. Ao mesmo tempo pode influenciar no decréscimo das concentrações de clorofilas de algumas espécies ou pode apresentar uma ação benéfica no acúmulo de clorofilas para outras espécies (FIGUEIRA & JANICK, 1994). Também observou que a sacarose presente no meio de cultura promoveu um crescimento, beneficiando o desenvolvimento do aparelho fotossintético em algumas espécies de plantas (KOSAI, 1991).

Na fase de aclimatização as plantas estão suscetíveis a fotoinibição, a qual pode ser minimizada com o uso da sacarose no meio de cultura durante a fase de pré-aclimatização. Plantas de *Nicotiana tabacum* diminuíram a susceptibilidade para a fotoinibição com a elevação de sacarose nas fases de pré-aclimatização (VAN HUYLENBROEK et al., 1997). Resultados semelhantes foram observados no presente trabalho onde as plântulas oriundas do meio MS a 100% com 2% de sacarose foram menos susceptíveis a fotoinibição na fase final da aclimatização (Tabela 8).

Observou-se no presente trabalho, que plântulas provenientes de meio MS a 50% independente da concentração de sacarose, apresentam decréscimo nas concentrações de clorofila total ao final da aclimatização (Tabela 8).

A redução de clorofilas em meios com baixos níveis de fontes nitrogenadas pode ser atribuída a essa deficiência, o que pode ter afetado a quantidade de pigmentos fotossintéticos, componentes transportadores de elétrons e as enzimas de assimilação de carbono, como a Rubisco (NAKANO et al., 1997).

**Tabela 8:** Clorofila *a*, *b* e total de plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%).

Tratamentos		Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofilas totais
Sacarose %	MS	µg/mg massa fresca/mL <sup>-1</sup>		
<b>60 dias após pré-aclimatização <i>in vitro</i></b>				
<b>Avaliação 1</b>				
0		1,64 B b	1,01 C b	2,65 C b
1	50	2,14 B a	1,85 B a	3,99 B a
2		2,98 A a	2,3 A a	5,28 A a
0		1,78 B b	1,07 C b	2,85 B b
1	100	2,48 B a	1,63 B a	4,11 B a
2		3,22 A a	1,88 A a	5,10 A a
CV%		17,427	18,709	11,831
<b>10 dias após aclimatização</b>				
<b>Avaliação 2</b>				
1		2,60 A a	1,54 A a	4,14 A a
2	50	2,52 A a	1,67 A a	4,19 A a
1		2,28 A a	1,60 A a	3,88 A b
2	100	2,64 A a	1,77 A a	4,41 A a
CV%		20,88	22,324	14,138
<b>20 dias após aclimatização</b>				
<b>Avaliação 3</b>				
1		2,28 A a	1,32 B a	3,60 B a
2	50	2,36 A a	1,60 A a	3,97 B a
1		2,45 A b	1,77 A a	4,22 A b
2	100	4,10 A a	3,09 A a	7,19 A a
CV%		12,117	47,34	19,628

Letras maiúsculas comparam médias de MS para cada concentração de sacarose. Letras minúsculas comparam médias das concentrações de sacarose em cada MS. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos revelaram que as diferentes condições nutricionais influenciaram a adaptação fisiológica na espécie em estudo durante a fase da pré-aclimatização. Deste modo, a concentração de sacarose no meio de cultura parece ter um papel fundamental na fotomixotrofia das plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck. O acúmulo de clorofilas *a*, *b* e total foi beneficiado pela adição de sacarose 2% ao meio MS a 100%. Este mesmo tratamento promoveu maior área foliar, maior densidade estomática com estômatos apresentando formato elíptico e maior concentração de ceras epicuticulares, fatores esses importantes para caracterizar uma adequada adaptação morfo-fisiológica em condições de estresse hídrico.

## 4 CONCLUSÕES

A literatura analisada mostra a complexidade e flexibilidade do metabolismo celular durante a fase da aclimatização de plantas micropropagadas, embora as plantas MAC estejam associadas com aspectos anatômicos e morfológicos que minimizam as perdas hídricas. As plântulas micropropagadas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck mostraram-se sensíveis em seu desenvolvimento e metabolismo em relação às concentrações de carboidratos e nutrientes.

O mecanismo fotossintético de plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck tornou-se ineficiente na ausência de sacarose no meio de cultura. O aumento da área foliar pode estar positivamente correlacionado ao aumento da densidade estomática, concentração de ceras epicuticulares e aumento de clorofilas totais.

Os resultados obtidos demonstram nitidamente a ligação dependente do metabolismo da sacarose com o do nitrogênio. Também, a capacidade adaptativa das plantas está associada com o ambiente em que se encontra, ou seja, as condições impostas na fase *in vitro* refletem na mudança da atividade fisiológica, no metabolismo fotossintético e nos níveis metabólicos.

Os resultados obtidos demonstram que alguns parâmetros tais como área foliar, densidade estomática, funcionalidade estomática, ceras epicuticulares e clorofilas *a*, *b* e total mostraram-se dependentes da condição nutricional ao final da aclimatização. As plantas provenientes de meios MS a 50% mostram-se susceptíveis a fotoinibição e isto pode estar associado à baixa densidade e regulação no fechamento estomático, bem como baixa concentração de ceras e clorofilas por parte de plantas cultivadas nestes meios.

Deste modo, fica evidente que a deficiência nutricional reflete negativamente ao longo da aclimatização, caracterizando uma ineficiência fisiológica adaptativa durante a fase da aclimatização. Diante desses aspectos, recomenda-se na fase da micropropagação a concentração de 2% de sacarose no meio MS 100%, a fim de induzir respostas adaptativas em relação ao estresse hídrico de *Agave attenuata* Salmy-Dyck.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARNON, D. I. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p.1-15, 1949.

AMTHOR, J. S. Respiration in future, higher CO<sup>2</sup> world: opinion. **Plant Cell Environment**, v. 14, p. 13-20, 1991.

ANDERSON, V.J.; BRISKE, D, D. Stomatal distribution, density and conductance of three perennial grasses native to the southern true prairie of Texas. **Am. Midl. Nat.**, v.123, p.152 - 159, 1990.

ARP, W. J. Effects of source-sink relations on photosynthetic acclimation to elevated CO<sub>2</sub>. **Plant Cell Environment**, v. 14, p. 869 - 875, 1991.

ATKINSON, C. J.; TAYLOR, J. M.; WILKINS, D.; BESFORD, R. T. Effects of elevated carbon dioxide on chloroplast components, gas exchanges and growth of oak and cherry. **Tree Physiology**, v. 17, p. 319 - 325, 1997.

BAKKER, J. C. Effects of humidity on stomatal density and relation to leaf conductance. **Science Horticulture**, v. 48, p. 205 - 212, 1991.

BEERLING, D. J.; CHALONER, W. G. Stomatal density as an indicator of atmospheric CO<sub>2</sub> concentration. **The Holocene**, v. 2, p.71 - 78, 1992.

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

BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, S. KWIATKOWSKI, C.S. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. **HortScience**, v. 16, p, 73-175, 1981.

BROWNLEE, C. The long and short of stomatal density signals. **Trends Plant Science**, v. 6, p. 441 - 442, 2001.

BUDDENDORF-JOOSTEN, J. M. C.; WOLTERING, E. J. Components of the gaseous environment and their effects on plants growth and development *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, v, 15, p. 1 -16, 1994.

CORNIC, C.; MASSACI, A.; Leaf photosynthesis under drought stress. In: BAKER, N. R. (Eds.). **Photosynthesis and the environment**. Kluwer Acad. Publi., Dordrecht, Boston, London, p. 347 -366, 1996.

CUSHMAN, J. C. Crassulacean Acid Metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. **Plant Physiology**, v. 127, p 1430 - 1449, 2001.

D'AGOSTINO, I, B.; KIEBER, J. J. Molecular mechanisms of cytokinin action. **Curr. Opin. Plant Biol**, v. 2, p. 359 - 364, 1999.

DALE, J. E. The control of leaf expansion. **Ann.Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.** v. 39, p. 267-295, 1988.

FERRIS, R. & TAYLOR, G. Stomatal characteristics of four. native herbs following exposure to elevated CO<sub>2</sub>. **Annals of Botany**, v. 73, p. 447- 453, 1994.



- FIGUEIRA, A. & JANICK, J. Optimizing carbon dioxide and light levels during *in vitro* culture of *Treobroma cacao*. **Jornal American Society Horticultural Science**, v. 119, p. 865 - 871, 1994
- FILA, G.; GHASHGHAIE, J.; HOARAU, J.; CORNIC, G. Photoynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatisation. **Physiology Plantae**, v. 102, p. 411 - 418, 1998.
- FUCHIGAMI, L. H.; CHENG, T. Y.; SOELDNER, A. Abaxial Transpiration and water loss in aseptically cultured Plum, **Journal American Society, Horticulture**, v. 106, p. 519 - 522, 1981.
- GALZY, R.; COMPAM, D. Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v. 33, p. 239 - 244, 1992.
- GRNCAREVIC, M.; RADLER, R. The effect of wax components on cuticular transpiration-model experiments. **Planta**, v. p. 23-7, 1967.
- GROUT, B. W. W. & MILLAN, S. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. **Annals of Botany**, v. 55. p.121 - 131, 1985.
- GROUT, B. W. W. ASTON, M. J. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. **Hort. Res.** v.17, p. 1 - 7, 1977.
- GUIDI, L, FOREFICE, G.; PARDOSSI, A.; MALORGIO, F.; TOGNONI, F. & SOLDATINE, G. F. Growth and photosynthesis of *Lycopersicon esculentum* .L plants as affected by nitrogen deficiency. **Biology Plant**, v. 40, p. 235 - 244, 1997.
- HALPERIN, T.; WETHEREL, D. R. Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. **Nature**, v. 205, p. 519 - 520, 1965.
- HISCOX, J. D. & ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal Botanic**, v. 57, p.1332 - 1334, 1979.
- HSIÃO, T. C.; JACKSON, R. B. Interactive effects of water stress and elevated CO<sub>2</sub> on growth photosynthesis, and water use efficiency. In: LUO, Y.; MOONEY, H. A. (Eds.). **Carbon Dioxide and Environmental Stress**, Academic Press, Sam Diego, p. 3 - 31, 1999.
- HSIÃO, T. C.; LÄUCHLI, A. Role of potassium in plant-water relations. **Advances in Plant Nutrition**, v. 2, p. 281-312, 1986.
- INGESTAD, T.; AGREM, G.I. Plant nutrition and growth: basis principles. **Plant and Soil**, v. 168/169, p.15-20, 1995.
- JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York, McGraw Hill Book Company, Inc. p. 523, 1940.
- KOSAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. IN: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.) **Micropropagation, Technology and Application**. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht-Boston- London, p. 447 - 467, 1991.
- KRAMER, P. J. **Plante and soil water relationship morden synthesis**. New York, Mc Graw Hill, p. 538, 1969.
- KRAUS, J. E & ARDUIN, M. **Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal**. Seropédia, R. J, Editora Universidade Rural, p. 94, 1997.
- LEEGOOD, R. C. Carbon dioxide concentrating mechanisms. In: LEE, P. J.; LEEGOOD, R.C, (Eds.) **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. John Wiley & Sons, Chichester, UK, p. 47 - 42. 1993.

LEMTIRI-CHLIEH, F.; MACROBBIE, E. A. C.; BREARLEY, C. A. Inositol hexabisphosphate is a physiological signal regulation the  $K^+$  inward rectifying conductance in guards cells. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.97, 8687-8694, 2000.

LEUGENE, P.; BENIER, G.; REQUIER, M. C.; KINET, J. M. Cytokinins in phloem and xylem saps of *Sinapis alba* during floral induction. **Plant Phys.** v. 90, p. 522 - 528, 1994.

LICHTENTHALER, H, K.; WELBURN, H. R. Detreminations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in differents solvents. **Biochm. Soc. Transac.**, v. 11, p, 591 - 592, 1983.

LIMA, J. D.; DAMATTA, F. M.; MOSQUIM, P. R. Growth attributes, xylem sap composition, and photosynthesis in commom bean as affected by nitrogen and phosphorus deficiency. **J. Plant Nutr.** v. 23. p. 937-947, 2000.

MARÍN, J. A.; GELLA, R. Is dessecation the cause of the poor survival rate the acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L. **Acta Hortic.**, Wageningen, n. 239, p. 105 -112, 1988.

MAREK, M. V., KALINA, J.; MATOUŠKOVÁ, M; Response of photosynthetic carbon assimilation of Norway spruce exposed to long-term elevation of  $CO_2$  concentration. **Photosynthetia**, p. 31, 209 - 220, 1995.

MASLE, J. The effects of elevated ( $CO_2$ ) on cell division rates, growth patterns and blade anatomy in young wheat plants are modulated by factors related to leaf position, vernalization and genotype. **Plant Physiology**, v. 122, p. 1399 -1416, 2000.

MEIDNER, H.; MANSFIELD, T. A. **Physiology of stomata**. New York: McCRAW hill, 1968.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology** , v. 5, p. 473 - 497, 1962.

NAKANO, H. MAKINO, A.; MAE, T. The effect of elevated partial presures of  $CO_2$  on the relationship bettwem photosynthetic capacity and N content in rice leaves. **Plant Physiology**, v. 115, p. 91 - 198, 1997.

NEINHUIS, C.; BARTHLOTT, W. Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. **Annal of Botany.** v. 79, p. 667 - 677, 1997.

NEINHUIS, C.; KOCH, K.; BARTHLOTT, W. Movement and regeneration of epicuticular waxes through plant cuticles. **Planta.** v 213, p. 427 - 434, 2001.

NICOLOSO, F. T; SARTORI, J. S.; ARAÚJO, W. L. D.; LUCIO, A. D. C. Citocininas no crescimento e desenvolvimento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Perdesen). Disponível em: [www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/posters/01/posterpdf/01062.pdf](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01062.pdf). Acesso em 12 de setembro de 2005.

PALEVITZ, B. A. The structure and development of stomatal cells. In: JARVIS, P. D. MANSFIELD, T. A. (Eds.) **Stomatal physiology**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 1 - 23, 1981.

PAOLETTI, E.; NOURRISSON, G.; GARREC, J.P.; RASCHI, A. Modifications of the leaf surface structures of *Quercus ilex* L. in open naturally  $CO_2$  enriched environments. **Plant Cell Environment**, v. 21, p.1071 - 1075, 1998.

POFFENROTH, M.; GREEN, D.B.; TALLMAN, G. Sugar concentrations in guards cells of *Vicia faba* illuminated with red or blue light. **Plant Physiology**, v. 98, p. 1469 - 1471, 1992.

POSPÍŠILOVÁ, J.; CATSKÝ, J: Development of water stress under increase atmospheric  $CO_2$  concentration. **Photosynthetica**, v. 42, p. 1 - 24, 1999.

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

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

RAYLE, D. L.; ROSS, C. W.; ROBINSON, N. Estimation of osmotic parameters accompanying zeatina-induced growth of detached cucumber cotyledons. **Plant Physiology**, v. 70, p. 634 - 1636, 1982.

RIOU-KHAMLICHI, C.; MENGES M.; HEALY J. M. S, MURRAY J. A. H .Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. **Molecular Cell Biology**, v. 20, p. 4513 - 4521, 2000.

ROBERTS, A. V.; SMITH, E. F.; MOTTLEY, J. The preparation on micropropagated plantlets for transfer to soil without acclimatization. In: POLLARD, J. W.; WALTER, J. **Methods in molecular Biology, Plant Cell and Tissue Culture**. (Eds.) HUMANA PRESS. Clinton, New Jersey, USA, v. 6, p. 227 - 236, 1990.

SACHS, T.; NOVOPLANSKY, N.; KAGAN, M. L. Variable development and cellular patterning in the epidermis of *Ruscus hypoglossum*. **Annals of Botany**, v. 71, p. 237 - 243, 1993.

SCHNYDER, H.; NELSON, C.J.; SPOLLEN, W.G. Diurnal growth of tall fescue leaf blades. II. Dry matter partitioning and carbohydrate metabolism in the elongation zone and adjacent expanded tissue. **Plant Physiology**, v. 86, p. 1077 -1083, 1988.

SALISBURY, F.B.; ROSS. C. W.; **Plant Physiology**, 4<sup>a</sup> (ed). Wadsworth Publishing Company, Belmont, 1992.

SANTAMARIA, J. M.; HERRERA.; J.L.; ROBERT, M. L. Stomatal physiology of a micropropagated CAM plant; *Agave requilana* Weber. **Plant Growth Regulation**, v. 16, p. 211 -214, 1995.

SCHOCH, P. G.; ZINSOU, C. SIBI, M. Dependence of the stomatal index on environmental factors during stomatal differentiation in leaves of *Vigna sinensis* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 31, p. 1211 - 1216, 1980.

SCHROEDER, J. I.; ALLEN, G.; HUGOUVIEUX, V.; KWAK, J. M. & WANER, D. Guard cell signal transduction. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**, v. 52, p. 627- 658, 2001.

SHANGGUAN, Z.; SHAO, M.; DYCKMANS, J. Interaction of osmotic adjustment and photosynthesis in winter wheat under soil drought. **Journal Plant Physiology**, v.154, 753 - 758, 1999.

SHEEN, J. Feedback control of gene expression. **Photosynth. Res**, v. 39, p. 438, 1994.

SHORT, K.C.; WARBURTON, J. & ROBERTS, A. V. *In vitro* hardening of cultured cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. **Acta Horticulture**, v. 212, p. 329 - 334, 1987.

SINCLAIR, T. R. & HORIE, T. Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation use efficiency: a review. **Crop Sci**, v. 29, p. 90-98, 1989.

SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. **Biometry**. San Francisco, Freeman and Company, p.776, 1969.

SRINIVASA-RAO, N. K.; BHATT, R. M.; SADASCHIVA, A. T. Tolerance to water stress in tomato cultivars. **Photosynthetica**, v, 38, p. 465-467, 2000.

**STATGRAPHICS STATISTICAL GRAPHICS SYSTEM**. USA, Ed. Statistical Graphics Corporation Copyright Version 7, 1993.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics- A biometrical Approach**. 2 ed. New York, Macgraw - Hill, p. 633,1980.

- STITT, M. Rising CO<sub>2</sub> levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. **Plants Cell Environ**, v. 14, p. 741-762, 1991.
- SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal American Society Horticulture Science**, v. 113, p. 234-238, 1988.
- SUTTER, E.; LANGHANS, R. W. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. **Journal American Society Horticulture Science**, v. 104, p. 493 - 496, 1979.
- SYNKOVÁ, H. Sucrose affects the photosynthetic apparatus and the acclimation of transgenic tobacco to *ex vitro* culture. **Photosynthetica**, v. 33, p. 403 - 412, 1997.
- TALLMAN, G.; ZEIGER, E. Light quality and osmoregulation in *Vicia* guard cells. Evidence for involvements of three metabolic pathways. **Plant Physiology**, v. 88, p. 887 - 895, 1988.
- TICHÁ, I.; ČÁP, F.; PASCOVSKÁ, D.; HOFMAM, P.; HASEL, D.; ČAPKOVÁ, V.; ŠAFER, C. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. **Physiology Plantarum**, v. 102, p. 155 -162, 1998.
- TICHÁ, I.; RADOCHÁ, B.; KADLECEK, P. Stomatal morphology during acclimatization of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions.- **Biology Planta**, v. 42, p. 469 -474, 1999.
- UPRETY, N, DWIVEDI, V.; JAIN. & MOHAN, R. Effect of elevated carbon dioxide concentration on the stomatal parameters of rice cultivars. **Photosynthetica**, v. 40 n. 2, p. 315 - 319, 2002.
- URBAN, O. Physiological impacts of elevated CO<sub>2</sub> concentration ranging from molecular to whole plant responses. **Photosynthetica**, v. 41, n.1, p. 9 - 20, 2003.
- VAN HUYLENBROEK, J. M.; PIQRAS, A.; DEBERGH, P. C. Effects of light intensity on photosynthesis and toxic O<sub>2</sub> scavenging enzymes during acclimatization of micropropagated *Calanthe*. **Phyton**. v. 37 n. 3, p. 283 - 290, 1997.
- VERMA, D. C.; DOUGALL, D. K. Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. **Plant Physiology**, v. 59, p.81 - 85, 1977.
- VINÁ, G de la; MUÑOZ, B. ALFARO, F. P. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 65, p. 229, 2001
- WALDENMAIER, S.; SCHIMIDT, G. Histologische Unterschiede zwischen *in vitro*- und *ex-vitro*- Blättern beider Abhärtung von *Rhododendron*, **Gartenbauwissenschaft**, v. 55, p. 49 - 54, 1990.
- WARD, J. M.; PEI, Z. M.; SCHOROEDER, J. L. Role of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. **The Plant Cell**, v. 7, p. 833 - 844, 1995.
- WARDLE, K.; QUILAN, A.; SIMPKINS, I. Abscisic acid and the regulation of water loss in plantlets of *Brassica oleracea* L. var. botrytis regenerated through apical meristem culture. **Annals of Botany**, v. 43, p. 745 - 752, 1979.
- WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H. Leaf anatomy of tissue cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamelidaceae) during acclimatization. **American Journal Botany**, v. 69, p. 1579 - 1586, 1982.
- WONG, S.C.; COWAN, R. I. & FARQUHAR, G. D. Leaf conductance in relation to rate of CO<sub>2</sub> assimilation. I. Influence of nitrogen nutrition, phosphorus nutrition, photon flux density, and ambient partial pressure of CO<sub>2</sub> during ontogeny. **Plant Physiology**. v, 78, p.821 - 825, 1985.
- WOODWARD, F. I. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO<sub>2</sub> from pre-industrial levels. **Nature**, v. 327, p. 617 - 618, 1987.

YONG, J. W. H.; WONG, C. S. LETHAM, STUART. D.; HOCART, C. H.; FARQUHAR, G. D. Effects of elevated [CO<sub>2</sub>] and nitrogen nutrition on cytokinins in the xylem sap and leaves of cotton. **Plant Physiology**, v. 124, p. 767 - 779, 2000.

YOUNG, A. J. The protoprotective role of carotenoids in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 83, p. 702 -708, 1991.

ZARRABEITIA, A.; LEJARCEGUI, X.; VERAMENDI, J.; & MINGO-CASTEL, A. M. Influence of nitrogen supply on micropropagation and subsequent microtuberization of four potato cultivars. **Journal American Potato**, v. 74, p. 369 - 378, 1997.

## **Capítulo III**

# **Metabolismo de *Agave attenuata* Salmy-Dyck Durante a Fase de Pré-Aclimatização e Aclimatização**

## RESUMO

As plantas apresentam alta plasticidade de adaptação nos diferentes ambientes em resposta às mudanças nas condições nutricionais, especialmente associadas ao carbono e nitrogênio. Em sistemas *in vitro*, esta plasticidade do metabolismo é particularmente importante para reduzir o estresse hídrico das plântulas na fase de aclimatização e envolve uma sinalização entre raiz e parte aérea. O presente trabalho teve como objetivo estudar o metabolismo fisiológico de plântulas de *Agave attenuata* Salmy Dyck na fase de pré-aclimatização e aclimatização, cultivadas em meio de cultura MS 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%), determinando o conteúdo de carboidratos, amidos, proteínas, fenóis totais, aminoácidos,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ . A micropropagação das plântulas na fase de pré-aclimatização *in vitro* em meio de cultura MS com 50% promoveu um acúmulo de carboidratos solúveis totais,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  induzindo uma inibição do crescimento e um menor desenvolvimento morfo-fisiológico e dos estômatos, bem como menores teores de clorofilas e ceras totais. Plântulas micropropagadas em meio de cultura MS com 100% suplementado com 2% sacarose mostraram uma adequada mobilização de carboidratos solúveis totais, proteínas totais e aminoácidos totais para o metabolismo do carbono e nitrogênio, melhorando desempenho fisiológico das plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck. Os resultados sugerem que a concentração de sacarose 2% no meio MS 100% maximiza a eficiência fotoquímica resultando no desenvolvimento de plântulas com uma adequada regulação metabólica.

**Palavras-chave:** *in vitro*, nutrientes, sacarose, amido, proteínas, aminoácidos, fenóis totais,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ .

## ABSTRACT

Plants present high adaptive plasticity in the different environment in response to changes to nutritional conditions, especially those associated to C and N. In *in vitro* systems this plasticity in the metabolism is particularly important in order to reduce the hydric stress of plantlets in the acclimatization phase and involves a signalization route between root and aerial part. The present work aimed at to study the physiological metabolism of *Agave attenuate* Salmy Dyck plantlet in pre and post-acclimatization in response to the MS half- and full strength and different level of sucrose by means of the following parameters: total soluble carbohydrates, starch, total protein, amino acids, total phenols,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$ . Plantlets at pre-acclimatization stage, cultured in MS half-strength medium showed enhanced levels of total soluble carbohydrates,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  resulting in a growth inhibition and impaired development morpho-physiological, including stomata features as well as reducing the levels of chlorophylls and total waxes. Plantlet cultured in full-strength MS medium supplemented with 2% sucrose showed a suitable mobilization of total soluble carbohydrates, amino acids and protein for the C and N metabolism improving the general quality of plantlets *Agave attenuata* Salmy-Dyck. The results suggest that the level of 2% sucrose supplemented to the full-strength MS medium optimizes the photochemical efficiency resulting in the plantlet development with a correct metabolic regulation.

**Kew-words:** *in vitro*, nutrients, sucrose, total soluble carbohydrates, starch, total protein, amino acids, total phenols,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$ .



## 1 INTRODUÇÃO

A pré-aclimatização de plântulas *in vitro* é dependente da composição do meio de cultura (SUSSEX & FREI 1968), em especial das fontes de carboidratos (VERMA & DOUGALL, 1977) e de diferentes fontes de nitrogênio (HALPERIN & WETHEREL, 1965). A composição e concentração do meio de micropropagação podem alterar as rotas bioquímicas e fisiológicas das células vegetativas, possibilitando, assim, o controle das perdas hídricas e maximizando a sobrevivência na fase da aclimatização.

Os aminoácidos são substâncias importantes no metabolismo do nitrogênio, representando o produto inicial da assimilação primária dele, na síntese de proteínas, atuando também como sua forma de transporte para as regiões autotróficas e heterotróficas da planta (ORTIZ-LOPEZ et al., 2000). Os aminoácidos se relacionam com funções do metabolismo, podendo atuar como precursores de hormônios vegetais e de compostos envolvidos na defesa de plantas. Sua síntese pode controlar vários aspectos ligados ao crescimento e ao desenvolvimento de plantas (BUCHANAN et al., 2000).

Diferenças nas concentrações de aminoácidos endógenos têm-se mostrado efetivas na síntese de proteínas durante os processos morfogênicos (WETHERELL & DOUGAL, 1976). A síntese de proteínas é caracterizada pela alta e rápida capacidade de adaptação molecular, funcional e fisiológica, em relação ao meio de cultura (LARCHER, 2000). Na sua ausência, o crescimento e a manutenção dos órgãos cessam e isso representa um fator limitante à taxa de crescimento das plantas. Essa síntese requer uma demanda por aminoácidos, um alto suprimento em energia e nutrientes, especialmente de nitrogênio. Entretanto, essa ligação entre a síntese de proteínas e o fornecimento de nitrogênio não é direta, devido ao nitrato e aos aminoácidos armazenados nos vacúolos (PORTER et al., 1991).

Pesquisas demonstraram que as alterações na sinalização entre raiz e parte aérea não envolvem somente uma mobilização e re-circulação de proteínas, aminoácidos e hormônios, mas também de sinais derivados do  $\text{NO}_3^-$  que estão relacionados com a ativação da expressão de vários genes. O  $\text{NO}_3^-$  é responsável por induzir a expressão de genes transportadores de alta e baixa afinidade por  $\text{NO}_3^-$  (LEJAY et al, 1999), genes da nitrato redutase e nitrito redutase (MIGGE et al, 1997),

e os genes responsáveis pela síntese das enzimas necessárias à assimilação do amônio via GS/COGAT (glutamina sintetase e glutamato sintase) (SCHEIBLE et al., 1997a). Sabe-se que a expressão de genes responsáveis pela sinalização entre a raiz e a parte aérea é afetada pelo fornecimento de nutrientes, carbono e pelo estresse hídrico (JONHSON & THORNLEY, 1987).

Outros componentes relacionados com a sinalização celular de plantas são os ácidos fenólicos, intermediários do metabolismo do fenilpropanoíde (CVIKROVÁ et al., 1996), precursores da lignina (LEWIS & YAMAMOTO, 1990) e fitoalexinas (KESSMANN et al., 1990). A concentração de fenóis está positivamente relacionada com a relação C/N e negativamente correlacionada com o nitrogênio (BRYANT et al., 1983). Os fenóis podem ser sintetizados nas plantas durante o desenvolvimento dos tecidos (HARBORNE, 1982), ou em resposta a injúrias físicas, infecção de patógenos ou estresses (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992). Os fenóis estão envolvidos na regulação de crescimento das plantas (MARIGO & BOUDET, 1979), diferenciação celular e organogêneses (BEUADOIN-EAGAN & THORPE, 1984).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da variação das concentrações de sacarose (0, 1 e 2) e da concentração do meio de cultura MS a 50% e 100% no metabolismo de plântulas micropropagadas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck, visando fornecer subsídios para o processo de aclimatização destas plântulas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de Execução do Projeto

As etapas laboratoriais *in vitro* e *ex vitro* e as análises bioquímicas de proteínas totais, carboidratos solúveis totais, amidos totais, nitrato, amônia das plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck em resposta aos diferentes meios de cultivos *in vitro* e etapas de aclimatização foram realizadas no laboratório de Pesquisa em Biotecnologia - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – Epagri-Itajaí. As análises bioquímicas de aminoácidos e fenóis totais da pré-aclimatização e da aclimatização foram realizadas na Universidade Federal de Santa Catarina - Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) - Centro de Ciências Agrária - Departamento de Fitotecnia.

### 2.2 Condição das Plântulas Durante a Fase de Pré-Aclimatização

Os explantes de *Agave attenuata* Salmy-Dyck foram oriundos de culturas *in vitro* na fase de multiplicação. O meio de cultura utilizado nesta etapa foi o MS adicionado  $0.08 \text{ mg/L}^{-1}$  de ANA,  $0.1 \text{ mg/L}^{-1}$  de IBA,  $1 \text{ mg/L}^{-1}$  de KIN, 10% de água de côco, 2% de sacarose e gelificado com 0,6% de ágar. Após 60 dias foi seccionada a parte aérea das plântulas, utilizando somente a parte inferior dos brotos com 2 cm de comprimento. Em seguida, estes explantes foram transferidos para frascos de 100 ml contendo 20 mL de meio de cultura contemplando os seis tratamentos do experimento (Tabela 9).

O experimento foi conduzido no sistema fatorial em blocos inteiramente casualizados, e as parcelas constituídas por 73 frascos com 4 plântulas por frasco. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a temperatura  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ , com umidade relativa do ar de 60%, intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas, durante 60 dias.

**Tabela 9:** Meios de cultura utilizados durante a fase de pré-aclimatização *in vitro* em explantes de *Agave attenuata* Salmy-Dyck.

<b>Murashige &amp; Skoog (1962) (%)</b>	<b>Sacarose (%)</b>
	0
50	1
	2
	0
100	1
	2

### 2.3 Condição das Plântulas Durante a Fase de Aclimatização

Plântulas originadas da fase de pré-aclimatização *in vitro* submetidas aos diferentes tratamentos foram transferidas para bandejas de isopor contendo 200 células, tendo como substrato casca de arroz calcinada. As bandejas foram dispostas em telado de sombrite, com 50% de redução da luminosidade.

### 2.4 Avaliações

Foram realizadas três avaliações, sendo a primeira 60 dias após a fase de pré-aclimatização (sendo considerada o tempo 0 na aclimatização). A segunda foi realizada 70 dias após a implantação dos tratamentos *in vitro* (10 dias após a fase da aclimatização), e a terceira aos 80 dias após a implantação do experimento (20 dias após a fase da aclimatização).

### 2.5 Determinação dos Níveis de Açúcares Solúveis Totais

A extração dos açúcares solúveis totais foi realizada segundo metodologia de Shannon (1968). Os precipitados das amostras utilizadas para a extração de

proteínas foram macerados em cadinho com 4 mL de solução MCW (metanol:clorofórmio:água) na proporção de 12:5:3 e centrifugados durante 30 minutos a 11000 rpm para a obtenção do sobrenadante. Foi realizada uma segunda extração com 4 mL de MCW e, após centrifugação, os dois sobrenadantes foram unidos, reservando-se o precipitado para posterior análise. Para cada 4 partes de sobrenadante, adicionou-se 1 parte de clorofórmio e 1,5 partes de água, seguido de uma centrifugação de 30 minutos a 11000 rpm, onde foram obtidas duas fases aquosas, retirando-se a fase aquosa superior para a posterior dosagem.

A dosagem foi realizada pelo método de Umbreit & Burris (1964), utilizando-se o reagente antrona em 100 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 95%. A solução foi preparada uma hora antes do uso. Alíquotas de 1 mL foram obtidas dos extratos e foram adicionadas em água fervente por 3 minutos. Após esfriar, em temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 620 nm. Os cálculos dos níveis de açúcares solúveis totais foram obtidos a partir da curva padrão, preparada com concentração de 0 a 100  $\mu g.mL^{-1}$  de glicose, diluída em água destilada.

## 2.6 Determinação dos Níveis de Proteínas Totais

Utilizou-se 200 mg de matéria fresca da parte aérea que foi congelada em nitrogênio líquido e mantida no freezer a  $-20^{\circ}C$  até a realização das análises bioquímicas. As amostras foram maceradas à temperatura de  $4^{\circ}C$ , com tampão de extração composto de fosfato de sódio dibásico (50mM) pH 7,0,  $\beta$ -mercaptoetanol (1,5%) (v/v), SDS (dodecil sulfato de sódio) (0,5%) (p/v) e PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil) (1mM). Após, as amostras maceradas foram centrifugadas a 11000 rpm por 30 minutos a  $0^{\circ}C$ . O sobrenadante e o precipitado foram separados, sendo o último novamente armazenado a  $-20^{\circ}C$  para posterior utilização. As proteínas totais, presentes no sobrenadante, foram precipitadas com adição de dois volumes de álcool etílico absoluto, no mínimo, para cada volume de sobrenadante; em seguida as amostras foram armazenadas a  $-3^{\circ}C$  por 15 minutos. Após este período, as amostras, foram centrifugadas a 11000 rpm por 20 minutos a  $0^{\circ}C$ . O sobrenadante foi descartado e as proteínas totais precipitadas foram resuspendidas

com 250  $\mu\text{L}$  da solução fosfato de sódio dibásico (50mM) (pH 7,0). Os níveis de proteínas foram determinados pelo método de Bradford (1976), com as modificações de Read & Northcote (1981), utilizando-se o reagente azul brilhante de Coomassie G-250 (Sigma). Dos extratos obtidos foram removidos alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  no qual foi adicionado 2 mL do reagente. A absorbância foi obtida em espectrofotômetro (UV – visível) Sento, modelo 700 plus, com a absorbância a 595 nm. Os cálculos de proteínas totais foram realizados a partir de valores de absorbância obtidos para a curva padrão, preparada com concentração de 0 a 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de soro albumina bovina.

## **2.7 Determinação dos Níveis de Amido**

A extração de amido foi realizada segundo metodologia de McCready et al. (1950). Os resíduos das amostras utilizadas para a extração de açúcares totais foram macerados em 2 mL de ácido perclórico 30% e centrifugados a 11000 rpm por 30 minutos. Foi realizado uma segunda extração com 2 mL de ácido perclórico 30% e, após a centrifugação os dois sobrenadantes foram unidos.

A determinação dos níveis de amido total foi realizada pelo método de Umbreit & Burris (1964), utilizando-se a antrona (0,2%) como reagente. Alíquotas de 1 mL dos extratos foram adicionadas a 2 mL de antrona 0,2%. Em seguida, as soluções foram agitadas e aquecidas em água fervente por 3 minutos. Após esfriar, em temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (UV – visível) Sento, modelo 700 plus, com a absorbância de 620 nm. Os cálculos dos níveis de amido foram obtidos a partir da curva padrão, preparada com concentrações de 0 a 100  $\mu\text{g.mL}$  de glicose, diluídas em ácido perclórico 30%. Os valores encontrados nas amostras foram multiplicados pelo fator 0,9 para a conversão em amido, segundo McCready et al. (1950).

## **2.8 Determinação dos Níveis de Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )**

Para a extração de  $\text{NO}_3^-$  utilizou-se 1 g de matéria fresca da parte aérea

congelada em nitrogênio líquido e mantida no freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises bioquímicas. As amostras foram maceradas com 5 mL de água ultrapura, sendo em seguida centrifugadas a 11.000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 11.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante resultante foi utilizado para análises de  $\text{NO}_3^-$ .

A quantificação de  $\text{NO}_3^-$  foi determinada segundo a metodologia descrita por Cataldo et al. (1975). Em um frasco do tipo Erlenmeyer de 50 mL contendo 0,2 mL do extrato (sobrenadante do item anterior), adicionou-se 0,8 mL de uma solução contendo 5 g de ácido salicílico dissolvido em 100 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado; após agitação, aguardou-se 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se, lentamente, 19 mL de NaOH 2N, depois de frio, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro (UV-visível) Sento, modelo 700 plus, absorvância em 410 nm. Para cada amostra houve um controle que conteve 0,2 mL do extrato, 0,8 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (sem o ácido salicílico) e 19 mL de NaOH 2N. A curva padrão foi obtida com soluções de diferentes concentrações de  $\text{KNO}_3$  (de 0,4 a 4,8 mM).

## 2.9 Determinação dos Aminoácidos Totais

Os aminoácidos totais foram extraídos com uma mistura de MCA (matanol:clorofórmio:água, 12:5:3, v/v/v) (HORTA & SODECK, 1997). Amostras compostas de 1 g de folhas foram maceradas em cadinho com nitrogênio líquido, adicionando 10 mL de MCA. Após três dias a  $4^{\circ}\text{C}$ , o macerado foi centrifugado a 11.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante coletado. O resíduo foi reextraído com 5 mL de MCA. Os sobrenadantes foram combinados e agitados com 5 mL de clorofórmio e, em seguida, com 6 mL de água destilada. A fase aquosa foi coletada e seca em evaporador a vácuo em temperatura baixa, sendo, em seguida, ressuspensão em 2 mL de água, sendo esse o extrato vegetal utilizado nas dosagens posteriores dos aminoácidos.

Para quantificar os aminoácidos totais utilizou-se o método da ninidrina (MOORE & STEIN, 1954). Aos tubos de ensaio, foram adicionados 0,25 mL de tampão citrato 0,2 M (pH 5,0), seguidos por 0,5 mL do extrato vegetal aéreo e 0,6 mL do reagente contendo ninidrina. Esse último foi preparado misturando-se duas soluções: 2,5 gramas de ninidrina, a qual foi dissolvida em metil celossolve até

completar o volume de 250 mL. Os tubos foram fechados com papel alumínio, agitados e aquecidos em banho-maria a 97°C por 15 minutos. Logo em seguida, os tubos foram esfriados em água corrente por cinco minutos, sendo adicionado o volume de 1,5 mL de etanol 60%. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (UV – visível, SHIMADZU), com a absorbância em 570 nm.

A curva padrão foi realizada empregando-se uma solução estoque de nor-leucina (2 mM), a qual foi preparada com o emprego de 0,1 N de HCL. A partir dessa solução, e utilizando um tampão citrato (0,2 M pH 5), foram realizadas as concentrações de 0,2 a 0,6 mM de nor-leucina. A quantidade de aminoácidos foi expressa em mM de leucina por µg/g. massa fresca/mL.

## **2.10 Determinação dos Níveis de Amônia (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)**

Para a extração de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi utilizada 2g de matéria fresca da parte aérea congelada em nitrogênio líquido e mantida no freezer a -20°C até a realização das análises bioquímicas. As amostras foram maceradas com 5 mL de água ultrapura, sendo centrifugadas a 11000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 11000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante resultante foi utilizado para análises de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

A quantificação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> presente na parte aérea foi determinada de acordo com a reação conhecida como fenol-hipoclorito, segundo metodologia proposta por (WEATHERBURN, 1967), com modificações para a planta em estudo. Alíquotas de 1 ml do extrato foliar foram distribuídas em tubos de ensaio, aos quais foi adicionado 5 ml de um reagente contendo 10g.L<sup>-1</sup> de fenol e 50 mg.L<sup>-1</sup> nitroprusside. Após agitação vigorosa, adicionaram-se mais 5 mL de outro reagente contendo 5 g de NaOH, 4,34 g de Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O e 20 ml de NaOCl (4-6%) por litro de solução. Em seguida os tubos foram agitados em vortex, permanecendo em temperatura ambiente por 30 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (UV – visível) Sento, modelo 700 plus, com a absorbância em 625 nm. A curva padrão foi obtida por meio de soluções de diferentes concentrações de (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (de 0,7 a 16,7 mM).



### 2.11 Fenóis Totais

Para a extração de fenóis totais utilizou-se 2 g de matéria fresca da parte aérea congelada em nitrogênio líquido e mantida no freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises bioquímicas. As amostras foram maceradas com 2 mL de solução (MeOH:HCL 1%), metanol e ácido clorídrico; em seguida acrescentado nitrogênio líquido e logo após esta solução foi filtrada a vácuo. Os resíduos filtrados foram para a estufa a  $45^{\circ}\text{C}$  até secura total; após, o precipitado foi ressuspenso com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada para a obtenção do extrato fenólico. A partir deste extrato aquoso foi separado 1 mL para a quantificação dos níveis fenólicos, acrescentando a este extrato 5 mL de metanol 95%. Desta solução final retirou-se 1 mL, no qual foi adicionado 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada; a partir desta etapa foi acrescentado 0,5 mL de Folin Ciocalteau, em seguida foi agitado em vortex para homogenizar a amostra; após permaneceu em repouso durante cinco minutos para adicionar 1 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (carbonato de sódio); novamente agitado em vortex; e após um repouso de 60 minutos a absorbância foi lida em espectrofotômetro (UV – visível, SHIMADZU), com a absorbância 725 nm. A curva padrão foi obtida por meio de soluções de diferentes concentrações de 0 a  $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de ácido gálico.

### 2.12 Análise Estatística

Para todos os parâmetros analisados foram utilizadas três repetições com três amostras. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), á comparação das médias foi realizada pelo teste SNK, á nível de 5% de probabilidade, conforme recomendações de Steel & Torrie (1980).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Carboidratos Solúveis Totais

Durante a fase *in vitro* a ausência de sacarose no meio de cultura basal MS a 50%, promoveu um decréscimo nos conteúdos de açúcares solúveis totais e amido. Por outro lado, o conteúdo de açúcares solúveis totais nas plântulas foi superior ao conteúdo de amido neste tratamento (Tabela 10). A concentração de açúcares solúveis totais em meio de cultura MS 50% com ausência de sacarose foi baixa em relação aos meios com sacarose 1 e 2% (Tabela 10). Este decréscimo nas concentrações de carboidratos solúveis totais em meio de cultura MS 50% com a ausência de sacarose está relacionado à importância dos carboidratos na expressão de genes em células vegetais (STITT et al., 1995). A falta de carboidratos restringe a concentração de fosfato inorgânico para os cloroplastos (GOLDSCHIMIDT & HUBER, 1992), que por sua vez afeta a disponibilidade da ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBPCO), envolvidas no ciclo de Calvin (GRUB & MÄCHLER, 1990).

Outro efeito do decréscimo dos carboidratos solúveis totais em plantas deficientes de nitrogênio pode estar associado com o *pool* de sacarose no interior da célula vegetal, o que diminui a atividade da sacarose-fosfato sintase (SPS), que é uma enzima chave no metabolismo da sacarose em plantas (ISOPP et al., 2000). Isto pode afetar o armazenamento de sacarose e amido em plantas em crescimento, afetando a atividade fotossintética (HELDT, 1997).

Quando a sacarose esteve presente no meio de cultura independente da concentração do meio de cultura MS, os açúcares solúveis totais foram mais elevados (Tabela 10). Observou-se que nas fases *in vitro* houve um acúmulo de carboidratos solúveis totais (açúcares solúveis totais e amido) nos tratamentos com MS a 50%, quando comparamos aos meios MS 100% independente das concentrações de sacarose. Embora a concentração de 2% sacarose no meio de cultura MS 50% tenha promovido um efeito significativo nas concentrações de amido, este tratamento promoveu um decréscimo nas concentrações de açúcares solúveis totais internas das plântulas. Por sua vez, a concentração de 1% de

sacarose presente no meio MS a 50% promoveu um aumento significativo de açúcares solúveis totais, enquanto que as concentrações de amido declinaram. Quando a sacarose esteve presente no meio de cultura MS a 50%, verificou-se que o conteúdo de amido foi maior do que o de açúcares solúveis totais (Tabela 10).

Deste modo, a alteração dos níveis dos açúcares solúveis totais e de amido em plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck pode estar relacionada ao balanço do carbono/nitrogênio no meio de cultura, tendo em vista que as altas concentrações de amido estão relacionadas ao acréscimo de sacarose no meio de cultura (MATTHEW & FOYER, 2001). Há uma grande variação interespecífica nas concentrações de sacarose e amido acumulados (HUBER, 1981). Segundo Farrar et al., (2000) em condições de baixa disponibilidade de nutrientes e carbono, ocorre um acúmulo nas concentrações de amido. Para Larcher (2000), sob um suprimento pobre em nitrogênio o carboidrato excedente é estocado na forma de amido. O acúmulo de amido ocorre através de uma diminuição da síntese de sacarose, promovendo o acúmulo de Pi no citosol, impossibilitando a entrada dentro dos cloroplastos (WEBBER et al., 1994). A depleção do ATP resulta em baixas concentrações de Pi, que produzirá gliceraldeído-3-fosfato para dentro do cloroplasto, que ativará a enzima ADP-glicose pirofosforilase, responsável pela síntese de amido (STITT & QUICH, 1989), permitindo que ocorra um aumento de amido dentro do cloroplasto (URBAN, 2003).

Os níveis de carboidratos solúveis totais (sacarose/amido) das plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck provenientes do meio de cultura MS a 100%, foram inferiores aos valores observados nos tratamentos de cultura MS a 50%. O decréscimo das concentrações de amido está correlacionado aos altos suprimentos de N que podem induzir a degradação do amido pela deficiência no fluxo de CO<sub>2</sub> aos carboidratos (ALHAMA et al., 1998).

Observou-se que a ausência de sacarose no meio MS a 100% na fase *in vitro* promoveu concentrações dos açúcares solúveis totais inferiores aos meios suplementado com sacarose 1 e 2%. Para o amido as diferentes concentrações de sacarose 0, 1 e 2% no meio de cultura não promoveram diferenças significativas (Tabela 10). Este aumento das concentrações de açúcares solúveis totais em resposta à sacarose no meio MS a 100%, pode ser atribuído ao fato que a sacarose é uma importante fonte de reserva de hexoses, assim como uma fonte de carbono para a síntese de polissacarídeos estruturais e de reserva. Após a hidrólise da

sacarose pela sintetase e/ou invertase (VAN DEN ENDE & LAERE, 1995), ocorre um aumento na concentração de carboidratos, que deverão ser metabolizados pelas culturas, aumentando os níveis de açúcares solúveis totais (HORBOWICZ et al., 1995).

**Tabela 10:** Açúcares Solúveis Totais e Amido em plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%).

Tratamentos		Açúcares solúveis totais	Amido
Sacarose %	MS	( $\mu\text{g}$ de massa seca/ $\text{mL}^{-1}$ )	
<b>60 dias após pré-aclimatização <i>in vitro</i></b>			
<b>Avaliação 1</b>			
0		47,02 A c	21,47 A c
1	50	80,04 A a	143,90 A b
2		68,02 A b	201,75 A a
0		22,58 B b	24,79 A a
1	100	32,63 B a	18,07 B a
2		40,69 B a	20,68 B a
CV%		18,14	25,65
<b>10 dias após aclimatização</b>			
<b>Avaliação 2</b>			
1		52,99 A b	70,60 A b
2	50	70,23 A a	180,77 A a
1		28,62 B b	55,60 B b
2	100	46,42 B a	90,00 B a
CV%		23,84	28,22
<b>20 dias após aclimatização</b>			
<b>Avaliação 3</b>			
1		120,13 A b	101,08 A b
2	50	151,60 A a	125,48 A a
1		59,01 B a	22,40 B a
2	100	74,33 B a	18,11 B a
CV%		31,02	32,26

Letras maiúsculas comparam médias de MS para cada concentração de sacarose. Letras minúsculas comparam médias das concentrações de sacarose em cada MS. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ).

Os resultados demonstraram que, tanto na fase *in vitro* quanto nas fases da aclimatização, as plântulas provenientes do meio MS a 50% foram influenciadas pela redução nutricional, caracterizando estas plântulas com uma concentração elevada de açúcares solúveis totais e amido quando comparadas com àquelas oriundas do meio MS a 100% (Tabela 10).

O amido acumulado indica que a assimilação é maior que a utilização para a sobrevivência da planta (RUFTY et al., 1988), ou seja, a assimilação dos nutrientes e fonte de carbono é maior que a utilização para o desenvolvimento do metabolismo (STITT, 1991). Uma excessiva formação de amido em plântulas provenientes do meio de cultura MS 50% pode conduzir um dano mecânico nas membranas dos tilacóides (DELUCIA et al., 1985). Este dano mecânico nas membranas pode diminuir a atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase RuBCO (GRUB & MÄCHLER, 1990), promovendo um decréscimo da atividade fotossintética, diminuindo o carbono disponível entre os órgãos das plantas, bem como a locação de carbono para as rotas metabólicas (RAO & TERRY, 2000). Assim sendo, é possível entender que mesmo com tanto acúmulo de carboidratos solúveis, as plantas originadas do meio de cultura MS a 50% não se adaptaram durante a fase da aclimatização.

Houve um efeito residual significativo da sacarose 2% no meio MS a 50%, tanto para concentração interna de açúcares solúveis totais e de amido durante a fase da aclimatização. As plântulas oriundas do meio MS a 100% apresentam somente efeito residual da sacarose 2% ao final do décimo dia da aclimatização. Já no final da fase da aclimatização, não houve diferenças significativas entre as concentrações de sacarose 1 e 2% no meio de cultura MS a 100% (Tabela 10).

Observou-se um aumento significativo da concentração de amido ao final do décimo dia da fase da aclimatização em plântulas originadas do meio MS a 100% independente da concentração de sacarose (Tabela 10). Stitt (1999) sugeriu que a síntese de amido pode ser estimulada pelo baixo acúmulo nas concentrações de nitrato (Tabela 12). Este aumento elevado de amido é a forma mais abundante de reserva de carbono em plantas e sua distribuição nos órgãos varia entre as espécies (DELMER & AMOR, 1995).

Ao final da fase da aclimatização houve um aumento das concentrações de açúcares solúveis totais no meio MS a 50% e uma diminuição nas concentrações de amido em relação ao décimo dia da aclimatização (Tabela 10). Em experimentos realizados com mandioca, a diminuição das fontes nitrogenadas promoveu aumento no conteúdo de carboidratos em relação ao de amido. A degradação do amido geralmente ocorre para liberar ATP que é exportado dos plastídeos para o desenvolvimento do metabolismo na fase de aclimatização (STITT, 1991). O metabolismo enzimático dos carboidratos solúveis totais é um fator crítico em

resposta ao estresse em muitas plantas, mas provavelmente há um grande número de genes que expressam alta regulação metabólica dos carboidratos nas células vegetais (MILLER et al., 1998).

Pode-se observar que ao décimo dia da fase de aclimatização houve um decréscimo nas concentrações de açúcares solúveis totais e um aumento nas concentrações de amido em plântulas oriundas do meio MS a 100% (Tabela 10). O decréscimo das concentrações dos açúcares solúveis totais em plântulas provenientes deste meio ao final da fase de aclimatização pode estar associado ao aumento das concentrações de clorofilas, e ceras epicuticulares (Capítulo II), durante as fases de aclimatização. Todos estes parâmetros estão relacionados ao metabolismo do C e N que consome a maior parte das reservas energéticas nos organismos fotossintéticos (HUPPE et al., 1994). As reservas acumuladas na forma de açúcares solúveis totais podem ser utilizadas no período de estresse das primeiras semanas da fase de aclimatização (VAN HUYLEMBROECK, 2000).

Ao final da fase de aclimatização houve um aumento nas concentrações de açúcares solúveis e um decréscimo nas concentrações de amido em plântulas originadas do meio MS 100% em relação ao décimo dia de aclimatização (Tabela 10). Este aumento das concentrações de açúcares solúveis caracteriza um metabolismo mixotrófico durante a fase de aclimatização em plântulas cultivadas com sacarose (VAN HUYLEMBROECK & DEBERGH, 1996). Provavelmente, o consumo de amido durante a fase de aclimatização ocorreu principalmente em função das demandas metabólicas para o enraizamento (Capítulo I).

Estes resultados podem variar segundo a espécie cultivada, pois o fluxo de carbono varia em resposta ao suprimento do nitrogênio (THOMPSON & THORPE., 1987; WEBBER et al., 1997). Em outras palavras, parte dos carboidratos das plântulas pode ser consumida pela respiração ou usada como fonte de energia até que as plantas desenvolvam competência fotossintética (SEON et al., 2000).

### **3.2 Proteínas e Aminoácidos Totais**

Detectou-se diferença estatística para as concentrações de proteínas totais em meios com ausência da sacarose independente da concentração do meio MS ao

final da fase de pré-aclimatização. Porém, não foram observadas grandes oscilações nas concentrações de proteínas solúveis totais presentes nas plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck em resposta aos diferentes tratamentos durante a fase de aclimatização. O meio MS a 50% não afetou a síntese de proteínas solúveis em comparação aos valores observados em resposta ao meio MS a 100% (Tabela 11).

Através das análises de carboidratos solúveis totais (Tabela 10), observou-se que a ausência de sacarose resultou em menores teores de açúcares solúveis totais e amido. Assim, é provável que o fluxo de carbono tenha sido direcionado para a formação de ácidos orgânicos que estão envolvidos na formação de aminoácidos e proteínas (CHAMPIGNY, 1995). Outras hipóteses a respeito do acúmulo de proteínas podem estar relacionadas à inibição na dinâmica de crescimento das plântulas *in vitro* originadas dos meios sem sacarose, assunto abordado no Capítulo I. O crescimento das plantas é acompanhado por mudanças na síntese e mobilização das proteínas, carboidratos e lipídios, que são consideradas as principais substâncias de reservas das células vegetais. Os níveis destas substâncias variam nas diferentes fases de crescimento das culturas celulares (LULSDORF et al., 1992), onde atuam como sinais específicos na cadeia de transdução de sinais ou no fornecimento de substrato e energia necessários para o crescimento celular (NOMURA & KORMAMINE, 1995).

Na cultura *in vitro* de *Cryptomeria japonica* a utilização do nitrogênio reduzido promoveu um menor acúmulo de proteínas solúveis totais (CAPALDI, 2002). No entanto, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que os meios de cultura MS com 50%, independente da concentração de sacarose utilizada, resultou em teores mais elevados de proteínas totais e menor concentração de aminoácidos totais na fase de pré-aclimatização (Tabela 11).

Tendo em vista que se há maior disponibilidade de proteínas há um decréscimo nas concentrações de aminoácidos totais (LARCHER, 2000), pode-se sugerir que, no presente trabalho, a síntese de aminoácidos foi influenciada negativamente pelo decréscimo do fornecimento do nitrogênio (KHAMIS et al., 1990). Por sua vez, as altas concentrações de proteínas observadas em resposta ao meio MS com 50% podem ter relação com as altas concentrações de amido neste tratamento (Tabela 11). A influência do amido sobre a acumulação protéica pode estar relacionada com mudanças no potencial osmótico influenciando a produção de proteínas específicas (TURNER et al., 1990).

Os resultados do presente trabalho demonstraram que apesar do meio MS com 100% ter disponibilizado uma maior concentração de nutrientes, o conteúdo de proteínas totais foi inferior às concentrações observadas no meio MS com 50%. Por outro lado, as maiores concentrações de aminoácidos foram encontradas em plântulas cultivadas em meio de cultura MS 100%. Assim, pode-se dizer que teores mais elevados de N resultaram em uma maior disponibilidade de aminoácidos.

**Tabela 11:** Proteínas e Aminoácidos Totais em plântulas de *Agave attenuata salmy Dyck* micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%).

Tratamentos		Proteínas totais	Aminoácidos totais
Sacarose %	MS	(µg de massa seca/mL <sup>-1</sup> )	
<b>60 dias após pré-aclimatização <i>in vitro</i></b>			
<b>Avaliação 1</b>			
0		13,35 A a	173,29 A a
1	50	7,90 A b	103,93 B b
2		7,84 A b	101,47 B b
0		9,50 B a	124,88 B a
1	100	6,95 B b	123,30 A a
2		5,52 B c	127,46 A a
CV%		17,25	14,31
<b>10 dias após aclimatização</b>			
<b>Avaliação 2</b>			
1		6,54 A a	89,56 A a
2	50	5,51 A b	73,96 A b
1		7,00 A a	79,25 B a
2	100	5,79 A b	62,93 B b
CV%		17,9	11,7
<b>20 dias após aclimatização</b>			
<b>Avaliação 3</b>			
1		3,44 A b	38,39 B b
2	50	4,56 A a	50,51 B a
1		3,66 A b	54,45 A b
2	100	4,84 A a	59,48 A a
CV%		16,82	13,32

Letras maiúsculas comparam médias de MS para cada concentração de sacarose. Letras minúsculas comparam médias das concentrações de sacarose em cada MS. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos mostraram que a sacarose 2%, independente da concentração do meio MS, promoveu um decréscimo nas concentrações de proteínas e aminoácidos totais ao final do décimo dia da aclimatização. Entretanto, ao final da fase de aclimatização estes mesmos tratamentos propiciaram as maiores



concentrações de proteínas totais e aminoácidos totais em plântulas originadas destes meios (Tabela 11).

O decréscimo na concentração de proteínas e aminoácidos está associado ao estresse hídrico durante a fase de aclimatização. As proteínas protegem as membranas contra danos causados pela cristalização de outros componentes celulares e podem também ajudar a minimizar o estresse (MILLER et al., 1998). No entanto, a sacarose 2%, independente da concentração do meio MS utilizado resultou em teores mais elevados de proteínas e aminoácidos totais ao final do vigésimo dia da aclimatização (Tabela 11). Este comportamento relaciona-se com os mecanismos adaptativos que podem diferir entre as espécies ou na mesma espécie, dependendo do estágio de desenvolvimento. Geralmente as plantas respondem aos estresses alterando seus mecanismos fisiológicos e/ou bioquímicos, os quais podem ser de curta ou longa duração, dependendo de como a condição estressante se manifesta, possibilitando a sobrevivência das plantas nas fases autotróficas (SERAPHIN, 1994).

Podemos observar que a diminuição dos níveis de proteínas e dos aminoácidos totais durante as fases da aclimatização pode ser atribuída ao seu consumo pela divisão e expansão celular (VIERSTRA, 1993), bem como a produção de lipídios na camada epicuticular (CALDWELL & WHITMAN, 1987). Segundo Nomura & Komanine (1995), o ciclo celular é acompanhado pela síntese de várias proteínas que induzem mudanças morfológicas e bioquímicas na célula, durante a atividade mitótica. Os mecanismos associados à regulação do ciclo de divisão celular das células vegetais são altamente conservativos, onde as proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDPKs) são responsáveis pela entrada das células no ciclo de divisão celular (TAIZ & ZEIGER, 1998).

Vale ressaltar que o decréscimo gradativo dos teores de aminoácidos totais na fase de aclimatização foi coincidente com o aumento da concentração de amônia e o período da expansão celular. Embora tenha ocorrido uma lenta dinâmica de crescimento, houve incremento na área foliar e aumento nas taxas de enraizamento, principalmente em plântulas provenientes do meio MS completo suplementado com 2% de sacarose.

À medida que ocorreu um aumento nas concentrações de amônia (Tabela 12), ocorreu um decréscimo nas concentrações de aminoácidos (Tabela 11). Deste modo, as concentrações de aminoácidos mostram-se inversamente correlacionadas

com as concentrações de amônia (LEA & FORDE, 1994). A diminuição do conteúdo de aminoácidos totais ao longo da organogênese na planta em estudo também pode estar relacionada à degradação de proteínas (VIERSTRA, 1993). Estes aminoácidos podem ter sido metabolizados e transformados em vários outros aminoácidos para a incorporação nas proteínas (MIFLIN & LEA, 1976).

### 3.3 Nitrato e Amônia

De modo geral, houve um acúmulo de amônia e nitrato em plântulas cultivadas em meios isentos de sacarose, independente da concentração do meio MS utilizado na fase da pré-aclimatização (Tabela 12).

As concentrações de nitrato e amônia em células de plantas cultivadas *in vitro* dependem das fontes nitrogenadas e do suprimento exógeno de C (PISSARA et al., 1988). A baixa concentração de nitrato observada em plântulas cultivadas em meio de cultura MS com 50% sem sacarose, pode ter ocorrido devido à ausência da sacarose no meio de cultura, a qual não estimulou a assimilação do nitrato (STITT & KRAPP, 1999). A inibição na assimilação do nitrato muitas vezes pode ser superada pela re-mobilização de fontes de carbono. Esta redução pode ser produzida pela via das pentoses que é uma rota de degradação do amido disponibilizando o carbono que pode favorecer a assimilação do nitrato. Porém, como mostrado na (Tabela 10) foram observadas baixas concentrações de açúcares solúveis totais e amidos nestes tratamentos, fato este que pode ter afetado a absorção de íons nitratos nas plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck.

As altas concentrações de nitrato e amônia observadas em resposta ao meio de cultura MS 100% sem sacarose (Tabela 12), sugere que a ausência de sacarose pode ter afetado a ação da glutamina sintetase e glutamato sintase, que por sua vez servem de substrato para as reações de transaminação, para a produção de todos os outros aminoácidos necessários para a síntese de proteínas (FINNEMAN & SCHJOERRING, 1999). Segundo Oliver et al. (1990), plantas deficientes em glutamina sintetase expressam altas concentrações de amônia nas células vegetais.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o meio MS 50%, independente da concentração de sacarose, resultou nos teores mais elevados de

$\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  durante as fases da aclimatização (Tabela 12). Já foi mencionada a importância da sacarose na assimilação do nitrato. Portanto, sugere-se que o aumento das concentrações de nitrato nas plântulas cultivadas neste meio tenha relação com os carboidratos solúveis totais que podem acelerar a assimilação de  $\text{NO}_3^-$  através da mobilização do amido armazenado. Sendo que a maior parte desta assimilação será reduzida à amônia por ação da enzima nitrito redutase (FINNEMAN & SCHJOERRING, 1999). A degradação de amido também foi negativamente relacionada com a assimilação de amônia em plantas de *S. minimum*, produzindo uma mobilização de amido durante as taxas de assimilação de amônia. Além disto, a amônia é a forma preferencial de absorção de nitrogênio quando as plantas estão sujeitas à deficiência nitrogenada (GAZZARRINI et al., 1999).

O meio MS 100% independente da concentração de sacarose, não resultou em acúmulos adicionais de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  nas plântulas durante as fases *in vitro* e aclimatização (Tabela 12). A presença do C e dos demais nutrientes do meio de cultura pode ter acelerado a assimilação do  $\text{NO}_3^-$  pelas raízes, o qual foi rapidamente reduzido ou armazenado nos vacúolos, ou translocado para a parte aérea.

Parte do  $\text{NO}_3^-$  consumido pode ter sido utilizado para induzir a expressão de genes transportadores de alta e baixa afinidade pelo  $\text{NO}_3^-$  (LEJAY et al., 1999), ou de genes da nitrito e nitrito redutase (MIGGE et al., 1997), bem como os genes responsáveis pela síntese das enzimas necessárias à assimilação do amônia via GS/GOGAT (SHEIBLE et al., 1997).

Os sinais derivados do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) interno e externo também influenciam o crescimento de raízes e arquitetura (STITT, 1999). A presença do  $\text{NO}_3^-$  em locais pontuais no solo estimula a ramificação dessas raízes (GUO et al., 2002). No Capítulo I, verificou-se que o meio MS completo propiciou um incremento na dinâmica de crescimento. As baixas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  observadas em plântulas cultivadas em meio de cultura MS completo pode estar associada à alta atividade enzima glutamina sintetase (GS), formando glutamina e aumentando a utilização da amônia em relação ao meio MS reduzido (MERHAUT & DARNELL, 1995).

A assimilação do  $\text{NO}_3^-$  foi menor do que a assimilação da  $\text{NH}_4^+$  durante a aclimatização, independente concentração do meio de cultura MS. A quantidade de  $\text{NO}_3^-$  intracelular varia durante a ontogenia da planta (TOURAINÉ et al., 1992). Durante o crescimento vegetativo ocorre um decréscimo nas concentrações de  $\text{NO}_3^-$

(IMSANDE & TOURAINE, 1994). Esta diminuição está correlacionada com as altas concentrações de aminoácidos, o que pode inibir a assimilação de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes (TOURAINE, 1992).

**Tabela 12:** Níveis de Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e Amônia ( $\text{NH}_4^+$ ) em plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck micropropagadas em meio MS a 50 e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%).

Tratamentos		$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$
Sacarose	MS	(µg de massa seca/mL <sup>-1</sup> )	
%			
<b>10 dias após aclimatização</b>			
<b>Avaliação 2</b>			
0		0,05 B c	2,51 B a
1	50	0,44 A b	1,42 A b
2		0,59 A a	0,54 A c
<hr/>			
0		1,70 A a	12,65 A a
1	100	0,32 B b	0,35 B b
2		0,23 B c	0,33 B b
CV%		8,46	24,36
<b>10 dias após aclimatização</b>			
<b>Avaliação 2</b>			
1		0,10 A b	0,27 A b
2	50	0,16 A a	0,36 A a
<hr/>			
1		0,03 B a	0,17 B a
2	100	0,05 B a	0,08 B b
CV%		20,65	24,51
<b>20 dias após aclimatização</b>			
<b>Avaliação 3</b>			
1		0,03 A b	0,99 A a
2	50	0,04 A a	0,84 A b
<hr/>			
1		0,01 B a	0,81 B a
2	100	0,01 B a	0,61 B b
CV%		19,43	32,69

Letras maiúsculas comparam médias de MS para cada concentração de sacarose. Letras minúsculas comparam médias das concentrações de sacarose em cada MS. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que a maior parte do N inorgânico acumulado foi na forma de  $\text{NH}_4^+$ , independentemente da concentração da sacarose e o meio de cultura MS utilizado (Tabela 12). Este comportamento bioquímico pode ser um mecanismo poupador de energia, uma vez que a redução  $\text{NO}_3^-$  é um processo que envolve alto consumo de energia (SALSAC

et al., 1987). Provavelmente estes mecanismos associados à assimilação do  $\text{NO}_3^-$  consomem muita energia e esqueletos carbônicos (CORUZZI & BUSH, 2001). Por isso, os íons  $\text{NH}_4^+$  podem ser reduzidos e incorporados aos aminoácidos sem a necessidade do processo de redução. No entanto, o acúmulo de amônia  $\text{NH}_4^+$  pode afetar o ciclo dos ácidos tricarbônicos e, deste modo, limitar a formação de cetoácidos requeridos para a síntese de aminoácidos (GAMBORG, 1970). Além disso, a absorção excessiva  $\text{NH}_4^+$  pode ser tóxica (BRITTO et al., 2001), pois altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  inibem a enzima PEPcase devido a mudanças no pH do citoplasma. A assimilação da  $\text{NH}_4^+$  produz  $\text{H}^+$  que pode contribuir para uma acidificação no citoplasma (AMÂNCIO et al., 1993). No presente trabalho, este fator pode ter contribuído com o decréscimo na dinâmica do crescimento e de taxas fotossintéticas, principalmente em plantas cultivadas em meio de cultura MS com 50%, onde houve um acúmulo significativo de  $\text{NH}_4^+$ .

As altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  em plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck ao final da aclimatização provavelmente promoveram uma inibição no crescimento celular, resultados estes observados no Capítulo I. Este fato, pode ter promovido um lento crescimento após a fase da aclimatização nas plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck. Assim, a relação das concentrações de amônia  $\text{NH}_4^+$  e o nitrato  $\text{NO}_3^-$  são fatores essenciais para o crescimento celular das células vegetais (LAUKKANEN et al., 1997).

### 3.4 Fenóis Totais

Os compostos fenólicos são intermediários do metabolismo do fenilpropanoíde (CVIKROVÁ et al., 1996), precursores da lignina (LEWIS & YAMAMOTO, 1990) e de fitoalexinas (KESSMANN et al., 1990), que possuem uma importante função de proteção em plantas contra algumas condições de estresse (HAHLBROCK & SCHEEL, 1989).

No presente trabalho, plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck micropropagadas em meio de cultura MS com 50% da sua concentração na ausência de sacarose, mostraram teores superiores de fenóis totais em comparação aos teores observados nas plântulas cultivadas em meio de cultura MS 100% na

ausência de sacarose (Tabela 13). Isto poderia indicar que os tecidos estão sob estresse, pois um acúmulo de fenóis totais indica decréscimo na dinâmica de crescimento (LORENZO et al, 2001). No Capítulo I, observou-se que plântulas cultivadas em meio de cultura MS 50% sem sacarose mostraram estagnação no crescimento. Este acúmulo pode também estar relacionado às altas concentrações de proteínas observadas em plântulas cultivadas em meio de cultura MS 50% com ausência de sacarose (Tabela 9). PÉRES-MALDONADO et al. (1995), sugerem que as maiores concentrações de fenóis estão relacionadas com o acúmulo de proteínas. E que um acúmulo de proteínas e fenóis totais pode caracterizar uma resposta de estresse na fase de aclimatização (LAUKKANEN et al., 1997).

Na fase *in vitro* não houve diferenças significativas para este parâmetro em plântulas cultivadas em meio de cultura MS a 50% e 100%, independente da concentração de sacarose 1 e 2% utilizada. Porém, no meio MS com 50%, observou-se que a concentração de 2% de sacarose promoveu um acúmulo na concentração de fenóis em relação a plântulas cultivadas em meio com 1% de sacarose. Segundo Shü (1999b), as altas concentrações de sacarose também são responsáveis pela atividade da PAL, responsável pela produção dos compostos fenólicos.

Após a fase de pré-aclimatização houve um acúmulo de fenóis totais em plântulas provenientes do meio MS 50%, independente das concentrações de sacarose. Ao final da fase de aclimatização, plântulas cultivadas em meio de cultura MS 50% e 100%, suplementado com 1% de sacarose, apresentaram um acúmulo no conteúdo de fenóis totais (Tabela 13). Já nas plantas originadas do meio MS completo observou-se um decréscimo nas concentrações de fenóis totais (Tabela 13). A concentração de fenóis é afetada por fatores internos e externos (ZAPROMETOV, 1989), a disponibilidade intracelular dos nutrientes inorgânicos no metabolismo celular depende da concentração de N no meio de cultura. Segundo Graham (1983), ocorre acúmulo de fenóis totais em plantas cultivadas em meio com baixa disponibilidade de N. Legrand & Bouazza (1991), verificaram que o decréscimo na expansão celular em *Cichorium intybus* esteve associado com altas concentrações de fenóis.

As baixas concentrações de fenóis em plântulas cultivadas em meio de cultura MS completo nas fases da aclimatização (Tabela 13) estão correlacionadas com a proliferação celular na área foliar e na dinâmica de crescimento (área foliar,

altura e enraizamento). A proliferação celular está associada com baixas concentrações de fenóis (LORENZO et al., 2001). Conclui-se assim que os fenóis estão envolvidos na regulação de crescimento das plantas (MARIGO & BOUDET, 1979), diferenciação celular e organogênese (BEAUDOIN-EAGAN & THORPE, 1984).

Compostos fenólicos possuem papel importante no metabolismo das plantas (GRAHAM, 1998). Os fenóis têm sido considerados moléculas sinalizadoras, moduladoras da ação do (AIA) ácido indolil-3-acético (BECKMAN, 2000). Eles estão também associados aos mecanismos de estresse, sendo que quando este é menos intenso ocorre à acumulação de fenóis e quando o estresse é severo ocorre à depleção dos carboidratos, o que pode aumentar ou reduzir a concentração de sacarose, a fonte mais comum de carbono usado em células de plantas, tecidos e órgãos (PRITCHARD et al, 1997).

**Tabela 13:** Fenóis totais em plântulas de *Agave attenuata* Salmy Dyck micropropagadas em meio MS a 50% e 100% com diferentes concentrações de sacarose (0, 1 e 2%).

Tratamentos		Fenóis totais ( $\mu\text{g}$ de massa seca/ $\text{mL}^{-1}$ )		
		Tempo de aclimatização (dias)		
Sacarose	MS	0	10	20
%				
0		1,26 A a	.....	.....
1	50	0,11 A c	0,18 A a	0,24 A a
2		0,25 A b	0,22 A a	0,19 A b
0		0,21 B a	.....	.....
1	100	0,19 A a	0,13 B a	0,17 B a
2		0,20 A a	0,12 B a	0,13 B b
CV%		22,25	6,86	3,51

Letras maiúsculas comparam médias de MS para cada concentração de sacarose. Letras minúsculas comparam médias das concentrações de sacarose em cada MS. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ).

## 4 CONCLUSÕES

Muitos aspectos ainda devem ser explorados para se entender o metabolismo bioquímico e fisiológico na expressão de genes associados às muitas respostas adaptativas do estresse hídrico e nutricional em plantas micropropagadas. No presente estudo foi possível relacionar os níveis de nutrientes do meio MS e de sacarose com as taxas de assimilação e mobilização dos carboidratos solúveis totais, nitrogenados e ácidos fenólicos totais durante o cultivo *in vitro* e a aclimatização de *Agave attenuata* Salmy-Dyck.

Os resultados obtidos demonstram que a ausência de sacarose no meio de cultura MS independente da sua concentração afetou as concentrações dos carboidratos solúveis totais (açúcares solúveis totais e amido), resultando em um acúmulo de proteínas totais, aminoácidos totais, nitrato, amônia, e fenóis totais em plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck. Os parâmetros avaliados podem ser indicativos de que as altas concentrações de tais compostos mencionados acima não foram efetivamente utilizadas na morfogênese vegetal, como mostrado nos capítulos I e II.

De forma geral, meio de cultura MS 100% com 2% de sacarose ativam a diferenciação celular e isto esteve associado a um decréscimo nas concentrações de fenóis totais, nitrato, amônia e carboidratos solúveis totais.

O meio de cultura MS 100% suplementado com 2% de sacarose promoveu a mobilização de carboidratos solúveis totais, proteínas totais e aminoácidos totais para o metabolismo do C e N promovendo o melhor desempenho fisiológico das plântulas.

Enquanto que o meio de cultura MS 50% promoveu um acúmulo de carboidratos solúveis totais,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  nas plântulas, resultando em uma inibição do crescimento e no desenvolvimento morfo-fisiológico (clorofilas e ceras totais, bem como baixa densidade estomática).

As fontes de C e N são fatores importantes para determinar os processos de resposta adaptativa das espécies na fase da aclimatização. Diante de tais resultados recomenda-se à suplementação de utilização de 2% de sacarose ao meio MS com 100% da sua concentração a fim de maximizar a eficiência fotoquímica e a regulação metabólica das plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck durante as fases da cultura *in vitro* e aclimatização.



## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHAMA, J.; LOPES-RUIZ, A.; DIEZ, J.; GARCIA-FERNANDEZ, J. M. Nitrogen availability on intracellular amino acids and ammonium pools in the green alga *monophidium braunii*. **Journal of Plant Physiology**, v. 153, p. 529 - 533, 1998.

AMÂNCIO, S.; DIOGO, E.; SANTOS, H. Effects of the source of inorganic nitrogen on C and N intection in maize callus tissue: phosphoenolpyruvate carboxylase activity, cytosolic pH and 15N aminoacids. **Physiologia Plantarum**, v. 89, p. 618 - 625, 1993.

BEAUDOIN-EAGAN, L. & THORPE, T. Turnover of shikimate pathway metabolites during shoot initiation in tobacco callus cultures. **Plant Cell Physiology**, v. 25, p. 913-921, 1984.

BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p.101-110, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRITO, G. J. M. Estudo da assimilação do nitrato em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.C.V Petite Havana SRI) que expressam o gene Lhab1\*2 de ervilha constitutivamente. Piracicaba, Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de queiros” Universidade de São Paulo, p. 77, 2001

BRYANT, J. P.; CHAPIN, F. S.; KLEIN, D. R. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. **Oikos**, v. 40, p. 357-368, 1983.

BUCHANAN, B.; GROISSEM, W.; JONES. R. Biochemistry & Biology of Plants. In: LORRENZI, G.; LAST, R. (eds) Amino acids. American Society of Plant Physiologist, v, 35, p. 410, 2000.

CALDWELL, C. R.; WHITMAN, C. E. Temperature induced protein conformational changes in barley root plasma membrane protein and lipid mobility. **Plant Physiology**, v. 84, p. 918 -923, 1987.

CATALDO, D. A.; HAARON, M.; SCHARADER, L. E. & YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Commun. Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p.71-80, 1975.

CAPALDI, F. R. Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio em explantes de *Cryptomeria japonica* D. DON “Elegans” Cultivadas *in vitro*: Análise Bioquímica e Relações entre reguladores vegetais. Tese de Doutorado, Piracicaba, São Paulo, p. 1-61, 2002.

CHAMPIGNY, M. L. Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higer plants. **Photosynthesis Research**, v. 46, p.177-127, 1995.

CORUZZI, G & BUSH, D. Nitrogen and Carbon, Nutrient and metabolite Signaling in Plants. **Plant Physiology**, v.125, p. 61-64, 2001.

CVIKROVÁ M.; HRUBCOVÁ, M.; EDER, J. & BINAROVÁ , P. Changes in the levels of endogenous phenolics aromatic monoamines phenylalanine ammonia-lyase peroxidase and auxin oxidase activities during initiation of alfalfa embriogenic and nonembriogenic calli. **Plant Physiology. Biochemistry**, v. 34, n. 6, 853–861,1996.

DELMER, B. P.; AMOR, Y. Cellulose biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, p987-1000, 1995.

DELUCIA, E.H.; SASEK, T. W.; STRAIN, B. R. Photosynthetic inhibition after long-trm exposure to elevated levels of atmospheric carbon dioxide. **Photosynth. Res.** v. 7, p. 175-184, 1985.

FARRAR, J.; POLLOCK, C.; GALLAGHER, J. Sucrose and integration of metabolism in vascular plants. **Plant Science**, v, 154, p. 1-11, 2000.

FINNEMAN, J.; SCHJOERRING, J. K. Translocation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in oilseed rape plants in relation to glutamine synthetase isogene expression and activity. **Physiologia Plantarum**, v. 105, p. 469-477, 1999.

GAMBORG, O. L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. **Plant Physiology**, v. 45, p. 372 -375, 1970.

GAZZARRINI, S.; LEJAY, L.; GOJON, A.; NINNEMANN, O.; FROMMER, W. B. & VON WIRÉN, N. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. **Plant Cell**, v. 11, p. 937-947. 1999.

GOLDSCHMIDT, E. E.; HUBER, S. C. Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose and hexose sugars. **Plant Physiology**, v. 99, p.1443 -1448, 1992.

GRAHAM, R. D. Effects of nutrients stress on susceptibilidade of plants to disease with particular reference to the trace elements. In: WOOLHOUSE, H. W (Eds.) **Advance in Botanical Research**, Academic Press, New York, NY. ISBN 0-12-0050-X, v. 10, p. 221-276, 1983.

GRAHAM, T. E. Flavonoid and flavol glycoside metabolism in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 36, p.135 -144, 1998.

GRUB, A.; MÄCHLER, F. Photosynthesis and light activation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in the presence of starch. **Journal Experimental Botany**, v. 4, p, 1293 -1301, 1900.

GUO, F-Q.; WANG, R. & CRAWFORD, N. M. The arabidopsis dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is regulated by auxin in both shoots and roots. **Journal Experimental Botany**, v. 53, p. 835 - 844, 2002.

HAHLBROCK, K. & SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **Plant Mol. Bio**, v. 40, 347-369, 1989.

HALPERIN, T.; WETHEREL, D. R. Ammonium requirement for embryogenesis in vitro. **Nature**, v. 205, p. 519-520, 1965.

HARBORNE, J. B.; **Introduction to Ecological Biochemistry**, 2<sup>a</sup> (ed). New York: Academic Press, 1982.

HELDT, H. W. **Plant biochemistry and molecular biology**. Oxford University. New York. p. 522, 1997.

HORBOWICZ, M; et al. Soluble saccharides and cyclitols in alfafa *Medicago sativa* L. somatic embryos, leaflets and mature seeds. **Plant Science**. v. 109, p. 191-198, 1995.

HORTA, A. C.; SODEK, L. Free amino acid and storage protein composition of soyben fruit explants and isolated cotyledons cultured with and without methionine. **Annals of Botany**, v. 79, p. 547-552, 1997.

HUBER, S.C. Interspecific variation in activity and regulation of leaf sucrose phosphate synthetase. **Z. Pflanzenphysiol**, v, 102, p. 443-450, 1981.

HUPPE, H. C.; TURPIN, D. H. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plants and algal cells. **Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 577-607, 1994.

IMSANDE, J. & TOURAIRE, B. N demand and the regulation of nitrate uptake. **Plant Physiology**, v.105, p. 3 - 7, 1994.

ISOPP, H.; FREHNER, M.; LONG, S.P.; NÖSBERGER, J. Sucrose phosphate synthase responds differently to source-sink relations and to photosynthetic rates: *Lolium perenne* L. growing at elevated PCO<sub>2</sub> in the field. **Plant Cell Environment**, v. 23, p. 597 - 607, 2000.

JOHNSON, I. R. & THORLEY, J. H. M. A model of shoot:root partitioning with optimal growth. **Annals Botany**, v. 60 p. 133-142, 1987.

KESSMANN, H.; CHOUDHARY, A.; DIXON, R. Stress response in alfalfa III. Induction of medicarpin and cytochrome P450 enzyme activities in elicitor-treated cell suspension cultures and protoplast. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 3, p. 38 - 41, 1990.

KHAMIS, S.; LAMAZE, T.; LEMOINE, Y.; FOYER, C. Adaptation of the photosynthetic apparatus in maize leaves as a result of nitrogen limitation, **Plant Physiology**, v. 94, p. 1436 -1443, 1990.

LARCHER, W. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: RiMA Artes e textos, p. 53, 2000.

LAUKKANEN, H.; TITTO, R. J.; HORTOLA, A. Effects of different nitrogen nutrients on the viability, protein synthesis and tannin production of Scots pine callus. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 982 - 988, 1997.

LEA, P. J.; FORDE, B. C. The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. **Plant Cell and Environment**, v. 17, p. 541- 556, 1994.

LEGRAND, B. & BOUAZZA, A. Changes in peroxidase and AIA oxidase activities during adventitious bud formation from small root explant of *Cichorium intybus* L.: influence of glucose. **Journal Plant Physiology**, v. 138, p. 102 -106, 1991.

LEJAY, L.; TILLARD, P.; LEPETIT, M.; OLIVE, F. D.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F. & GOJON, A. Molecular and functional characterization of two NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake systems by N and C- status Arabidopsis plants. **Journal Plant**, v. 18, p. 509-519, 1999.

LEWIS, G. G.; YAMAMOTO, E. Lignin occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**, v. 41, p. 455 - 496, 1990.

LORENZO, J. C.; BLANCO, M. DE LOS A.; PELÁEZ, O.; GONZÁLEZ, A.; CID, M.; IGLESIAS, A.; GONZÁLEZ, B.; ESCALONA, M.; ESPINOSA, P. & CARLOS BORROTO. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. **Plant Cell, and Organ Culture**, v. 65, p. 1 - 8, 2001.

LULSDORF, M. M. et al. Growth parameters of embryogenic suspension culture of interior spruce (*Picea glauca-engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.). **Plant Science**, v. 82, p. 227-234, 1992.

MARIGO, G. & BOUDET, A. Effect of an increase in the level of phenolic compounds on the auxin content and growth of *Lycopersicon esculentum*. **Z. Pflanzenphysiol**, v. 92, p. 33-38, 1979.

MATTHEW, J. P. & FOYER, C. H. Sink regulation of photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 360, p. 1383-1400, 2001.

McCREADY, R. M. et al. Determination of starch and amylase in vegetables. **Analytical Chemistry**, v. 22, p.1156 -1158, 1950.

MERHAUT, D. J. & DARNELL, R. L. Ammonium and nitrate accumulation in containerized southern high bush blueberry plants. **HortScience**, v. 30, p. 1378- 1381, 1995.

MIFLIN, B. J. & LEA, P. J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, v.15, p. 873 - 885, 1976.

MIGGE, A.; CARRAYOL, E.; KUNZ, C.; HIREL, B.; FOCK, H. & BECKER, T. The expression of the tobacco genes encoding plastidic glutamine synthetase or ferredoxin dependent glutamate synthase does not depend on the rate of nitrate reduction, and is unaffected by suppression of photorespiration. **Journal Experimental Botany**, v. 48, p. 1175 -1184 ,1997.

MILLER, S. A.; SMITH, G. S.; BOLDINGH, H. L. & JOHANSSON, A. Effects of water stress on fruit quality attributes of kiwifruit. **Annals of Botany**, v. 81, p. 73 - 81, 1998.

MOORE, S. & STEIN, W. H. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. **Journal Biology Chemistry**, v. 2111, p. 907-913, 1954.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, v. 5, p. 473 - 497, 1962.

NICHOLSON, R.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytophology*, v.30, p. 369 -389, 1992.

NOMURA, K.; & KOMANINE, A. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer academic Publishers. p. 249-266, 1995.

OLIVER, D. J.; NEUBURGER, M.; BOURGUIGNON, J. & DOUCE, R. Glycine metabolism by plant mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 80, p. 487 -491, 1990.

ORTIZ-LOPES, A.; CHANG, H. C.; BUSH, D. R. Amino acid transporters in plants. **Biochemistry and Biophysica Acta**, v. 1465, p. 275-280, 2000.

PÉREZ-MALDONADO, R. A.; NORTON, B. W. & KERVEN, G.L. Factors affecting in vitro formation of tannin-protein complexes. **Journal Science Food Agriculture**. v. 69, p. 291 -298, 1995.

PISSARA, J.; SANTOS, I. & SALEMA, R. Effects of ammonium and nitrate supply on growth, protein contents and lignin production in plant callus tissue. **Biol. Soc. Brot**, v. 61, 237-249, 1988.

PORTER, J. R.; LAWLOR, D. W. *Plant growth: interactions with nutrition and environment*. Cambridge:University of Cambridge Press, p. 284 1991.

PRITCHARD, S. G.; PETERSON, C. M.; PRIOR, S. A.; ROGERS, H. H. Elevated carbon dioxide differentially affects needle ultra-structure and phloem anatomy in *Pinus palustre*: interactions with soil resource availability. **Plant Cell and Environment**, v. 20, p. 641 - 471, 1997.

RAO, I. M.; TERRY, N. Photosynthetic adaptation to nutrient stress. In: YUNUS, M.; PATRICK, U.; MOHANTY, P. (Eds.): **Probing Photosynthesis. Mechanisms, Regulation and Adaptation**. Taylor & Francis, London- New York. p. 379-397, 2000.

READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Analytical Biochemistry**, v. 116, p. 53 -64, 1981.

RUFTY, T. W. Jr.; HUBER, S. C; VOLK, R. J. Alterations in leaf carbohydrate metabolism in response to nitrogen stress. **Plant Physiology**. v. 88, p. 725 - 730, 1988.

SALSAC, L.; CHAILLOU, S.; MOROT-GAUDRY, J. & LESANT, C. Nitrate and ammonium nutrition in plants. **Plant Physiology Biochemistry**. v. 25, p. 805 - 812, 1987,

SCHEIBLE, W.R.; LAUERER, M.; SCHULZE, E.D.; CABOCHE, M.; STITT, M. Accumulation of nitrate in the shoots acts as a signal to regulate Shoot-root allocation in tobacco. **Plant journal**, v. 11, n. 4, p.671-691, 1997a.

SCHEIBLE, W.R.; GONZALEZFONTES, A.; LAUERER, M.; MULLERROBER, B.; CABOCHE, M.; STITT, M.; Nitrate acts as signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell*, v. 9, n. 5, p. 783-798, 1997.

SEON, J. H.; CUI, Y. Y.; KOSAI, T.; PAEK, K. Y. Influence of *in vitro* growth conditions of photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 61, p. 135 - 142, 2000.

SERAPHIN, E. S. Importância da comunicação raiz-parte aérea nas respostas aos estresses ambientais. X Congresso da Sociedade de Botânica de São Paulo, São Paulo, 1994.

SHANNON, J. C. A. Procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *zea mays* kernels. **Res. Bul**, v. 842, p. 1-8, 1968.

SHÜ, Z. H. Total soluble solids, protein, phenylalanine ammonia-lyase activity and total phenol as related to anthocyanin biosynthesis in cultured wax apple fruit skin. **J. Agr. Assn. China**, New Series, v. 185, p. 102–110, 1999b.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics- A biometrical Approach**. 2 (Ed). New York, Macgraw - Hill, p. 633, 1980.

STITT M.; KRAPP A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. **Plant Cell Environment**, v. 22, p. 583-621, 1999.

STITT, M. Rising CO<sub>2</sub> levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. **Plants Cell Environment**, v. 14, p. 741-762, 1991.

STITT, M.; KRAPP, A.; KLEIN, D.; ROPER-SCHWARZ.; PAUL, M. Do carbohydrates regulate photosynthesis and allocation by altering gene expression. In: MADORE, M. A.; LUCAS, W. J. (Eds). **Carbon partitioning and source-sink interactions in plants**. American Society of Plant Physiologist, 1995.

STITT, M.; QUICH, W .P. Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation. **Plant Physiology**, v. 77, p. 633-641, 1989.

SUSSEX, I. M.; FREI, K. A. Embryoid development in long term tissue cultures of carrot. **Phytomorphology**, v, 18, 339- 349, 1968.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Plant Physiology**, 2ed.; Sunderland: Sinauer Associates. p. 192, 1998.

THOMPSON, M. R. Future options for genetic improvement of conifers. Part II: Longer-term technologies. **Irish Forestry**, v. 50, n. 3. p. 108 -122, 1993.

TOURAINÉ, B.; MULLER, B.; GRIGNON, C. Effect of phloem-translocated malate on NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake by roots of intact soybean plants. **Plant Physiology**, v. 93, p. 1118 -1123, 1992.

TURNER, S. R.; BARRETT, D. H. P.; CASEY. R. The effect of different alleles at the locus on the synthesis of seed storage proteins in *Pisum sativum*. **Plant Mol Biol**, v. 14, p. 793-803, 1990.

UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H. Method for glucose and other sugars, In: UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H.; STAUFFER, J. P. (Eds.) *Manometric Techniques*, Edition 4, Burguers Publishing Co, 1964.

URBAN, O. Physiological impacts of elevated CO<sub>2</sub> concentration ranging from molecular to whole plant responses. **Photosynthetica**, v. 41, n. 1, p. 9 - 20, 2003.

VAN DEN ENDE, W.; VAN LAERE, A. Purification and properties of a neutral invertase from the roots of *Cichorium intybus*. **Physiologia Plantarum**. v. 93, p. 241-248, 1995.

VAN HUYLENBROECK, J. M. Monitoring Quality of Micropropagated Plants During Acclimatization. **Acta Horticulture**. v. 517, p. 65-70, 2000.

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

VERMA, D. C.; DOUGALL, D. K. Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. **Plant Physiology**, v. 59, p. 81- 85, 1977.

VIERSTRA, R. D. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. **Plant Mol. Biol**, v. 44, 385 - 410, 1993.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, v. 39, p. 971-974, 1967.

WEBBER, H. et al. A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. **Plant Cell**, v. 9, p. 895 - 908, 1997.

WEBBER, A. N.; NIE, G. Y.; LONG, S. P. Acclimation of photosynthetic proteins to rising atmospheric CO<sub>2</sub>. *Photosynth. Res*, v, 39, p. 413-425, 1994.

WETHERELL, D. F. & DOUGALL, D. K. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Plant Physiology*, v. 37, p. 97-103, 1976.

ZAPROMETOV, M. The formation of phenolic compounds in plant cell and tissue cultures and the possibility of its regulation. **Adv. Cell Cult.** v. 7, p. 240-245, 1989.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

No presente trabalho vários aspectos morfo-fisiológicos e metabólicos em plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck foram influenciados pela concentração do meio de cultura e pela sacarose suplementada a esse meio. Constaram-se mudanças drásticas no desenvolvimento morfo-fisiológico e em componentes bioquímicos acarretando assim mudanças na re-expressão morfogenética, o que pode caracterizar uma baixa adaptabilidade nas fases de aclimatização.

Visto que as concentrações de N e C são fatores limitantes para o desenvolvimento das plântulas de *Agave attenuata* Salmy-Dyck, e que as informações contidas neste trabalho podem auxiliar na compreensão mais aprofundada das possíveis inter-relações dos componentes químicos do meio de cultura, sugere-se, para trabalhos futuros, ampliar as concentrações estudadas de sacarose, bem como testar outras fontes de carbono a serem suplementadas ao meio de cultura.

Sugere-se também para futuros trabalhos um estudo mais aprofundado das diferentes fontes e concentrações de nitrogênio no meio de cultura, incluindo diferentes balanços de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  e fontes orgânicas, principalmente aminoácidos. Além de permitir uma maior compreensão dos fatores fisiológicos e bioquímicos em nível de células, tecidos, órgão e planta. Tais estudos podem contribuir ainda mais para uma maior compreensão no controle na expressão de genes fotossintéticos que coordena o estado morfo-fisiológico da planta nas etapas de aclimatização.

Sob o prisma aplicado estes estudos podem aumentar a eficiência de protocolos regenerativos *in vitro*, principalmente nas fases de pré-aclimatização e aclimatização.