

Uso da luz natural na micropropagação.

Silva, Adriano Bortolotti da¹.

¹Professor, Doutor, Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Rodovia MG 179, Km 0, Caixa Postal 23, CEP 37130-000 Alfenas, Minas Gerais, fone (35) 3299-3119, email: bortolot@bol.com.br.

INTRODUÇÃO

Novas técnicas para tornar mais eficiente a propagação *in vitro* têm sido desenvolvidas. Laboratórios têm usado sofisticados meios para regulação ambiental da temperatura, umidade, luminosidade, ventilação natural ou forçada (Cui et al., 2000; Kanechi et al., 1998; Khan et al., 2003), as quais proporcionam algumas vantagens para o crescimento das culturas em sistemas de micropropagação. Contudo, inovações tecnológicas nem sempre estão disponíveis e sua adoção pode representar aumento nos custos de produção das mudas nestes sistemas.

As lâmpadas fluorescentes, bastante comuns em salas de crescimento de laboratórios, são citadas em 90% dos trabalhos com pesquisas em cultura de tecidos, como a principal fonte de luz utilizada (Dooley, 1991). O custo referente à iluminação em sala de crescimento pode atingir 65% do total de gastos com energia elétrica (Standaert de Metsenaere, 1991). Este fator apresenta um dos maiores custos na produção de mudas em laboratório, sendo superado apenas pelos gastos com mão-de-obra (Dooley, 1991). A utilização de luz natural apresenta vantagens, como redução dos gastos com luz artificial, instalações simplificadas e, menor estresse à planta durante a aclimatização (Erig & Schuch, 2005).

O emprego de luz natural pode ser uma forma de aproximar a micropropagação convencional e o sistema de micropropagação fotoautotrófica, ou seja, possibilitando que as plantas cultivadas *in vitro* possam aumentar sua taxa fotossintética pela maior densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (Kodym & Zapata-Arias, 1998; Kozai et al., 1997).

A alta irradiância pode afetar diretamente o desenvolvimento das plantas *in vitro*, apresentando efeito sobre a lamina foliar e modificando características, tais como espessura foliar, diferenciação do mesofilo, divisão celular e desenvolvimento dos estômatos (Lichtenthaler et al., 1981; Terry et al., 1983, citados por Lee et al., 1988). O fator luz também influencia a fotossíntese, a concentração de clorofila e a estrutura dos cloroplastos em plantas cultivadas *in vitro* (Lee et al., 1988).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo apontar algumas considerações relativas a viabilidade do emprego da luz natural em sistemas de micropropagação, bem como as alterações na anatomia foliar nos vegetais cultivados *in vitro* em ambiente de alta irradiância.

MICROPROPAGAÇÃO FOTOAUTOTRÓFICA E USO DA LUZ NATURAL

A micropropagação fotoautotrófica pode ser definida como a produção de micropropágulos sem a adição de sacarose no meio de cultura (Kubota & Tadokoro, 1999). Este conceito é ainda recente e está relacionado com o fornecimento de condições ambientais adequadas para que os tecidos vegetais cultivados *in vitro* possam realizar fotossíntese, fazendo com que as plantas micropropagadas apresentem crescimento fotoautotrófico sustentável. No intuito de atingir esse objetivo, torna-se necessário o aumento da disponibilidade de CO₂, o aumento dos níveis de radiação e a redução da umidade relativa nos recipientes de cultivo, conferindo às plantas capacidade de crescimento e multiplicação em meio sem suprimentos orgânicos (Borkowska, 2001; Fischer & Alfermann, 1995; Kanechi et al., 1998; Khan et al., 2003; Seko & Nishimura, 1996). Em

adição, favorece também a transpiração da planta, beneficiando a absorção de água e sais minerais (Kozai et al., 1997).

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas com o intuito de fornecer condições ambientais que promovam o aumento na capacidade fotossintética do material micropropagado e favoreçam a aquisição de fotoautotrofia *in vitro*, sendo as principais:

- a) *Sistema de ventilação natural* – recipientes com filtros de membrana, que promovem o aumento das trocas gasosas, com o ambiente sob concentrações normais de CO₂ (Zobayed et al., 2002);
- b) *Sistema de ventilação forçada* – recipientes com filtros de membrana em ambiente enriquecido com CO₂ (Khan et al., 2003; Vyas & Purohit, 2003);
- c) *Aumento do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA)* – troca das lâmpadas comuns por lâmpadas de halogênio (Kozai et al., 1997);
- d) *Uso de iluminação natural* (Kodym & Zapata-Arias, 1999).

O uso dessas alternativas em conjunto ou de forma isolada pode apresentar vantagens para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de diversas espécies por reduzir as desordens fisiológicas e morfológicas, aumentando a sobrevivência, promovendo o rápido e vigoroso desenvolvimento das plantas durante a aclimatização (Kozai et al., 1997; Khan et al., 2003).

A utilização de luz natural pode representar menor gasto com luz artificial, além de redução nos custos de manutenção, requerendo instalações mais simplificadas (Kodym & Zapata-Azarias, 1998). Entretanto, a disponibilidade de luz pode variar com as condições climáticas, como estações do ano e hora do dia. Este fator pode ser limitante em algumas regiões, principalmente aquelas com baixa intensidade luminosa e grande mudança climática durante o ano, como em áreas de clima frio.

O fator luz também influencia a fotossíntese, a concentração de clorofila e a estrutura dos cloroplastos em plantas cultivadas *in vitro*, entretanto, isso não causa limitação durante o processo de aclimatização (Lee et al., 1988). Provavelmente, maiores limitações de sobrevivência e adaptação a um novo ambiente das plântulas transplantadas estão relacionadas com a perda excessiva de água causada pelo baixo desenvolvimento de cera epicuticular com extensos espaços intercelulares no mesofilo (Wetzstein & Sommer, 1982) e também a estômatos com reduzida funcionalidade (Wetzstein & Sommer, 1983).

O estresse hídrico tem sido relatado como a principal causa de choque no transplântio, tendo como resultado a perda excessiva de água pelas plântulas (Brainerd & Fuchigami, 1981). A alta umidade relativa do recipiente de cultivo (próxima de 100%) e a baixa irradiância são os principais fatores que provocam alterações na estrutura e no funcionamento dos tecidos, causando a baixa capacidade das mudas produzidas *in vitro* de controlar a perda de água quando submetidas às condições do ambiente natural, com aumento da demanda evaporativa (Fuchigami et al., 1981; Preece & Sutter, 1991).

As plantas cultivadas em sistemas fotoautotróficos apresentam melhores características morfoanatômicas (Adelberg et al., 1999) como melhor desenvolvimento do sistema radicular, maior diferenciação do parênquima paliçádico, cutículas mais espessas, redução na densidade de estômatos e melhor funcionamento destes (Serret et al., 1996; Dimassi-Theroui & Bosabalidis, 1996; Khan et al., 2003).

CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS

As desordens estruturais e funcionais das folhas de plantas são o resultado dos complexos fatores ambientais encontrados no ambiente de cultivo *in vitro*. A consequência é uma baixa taxa de sobrevivência das plantas, quando transferidas para condições *ex vitro* (Ziv, 1987). As modificações manifestadas nas folhas de plantas micropropagadas afetam os principais processos executados por estas, ou seja, a fotossíntese e as trocas gasosas (Debergh & Maene, 1984).

As plantas micropropagadas apresentam folhas com aspectos diferenciados, quando comparadas com plantas que cresceram em ambientes naturais, tais como pouca cera cuticular e estômatos pouco funcionais, reduzida diferenciação do mesofilo com grandes espaços intercelulares, além de uma fraca conexão vascular entre o sistema radicular e a parte aérea, o que pode limitar os processos de aclimatização (Brainerd et al., 1981; Grout & Aston, 1978; Pierik, 1990; Wetzstein & Sommer, 1983).

Donnelly & Vidaver (1984), trabalhando com anatomia foliar de framboesa, observaram que as folhas *in vitro* apresentavam-se menores, mais finas e com células paliçádicas e células do mesofilo menos compactas em relação às plantas crescendo em ambiente natural.

Comparando a anatomia de bétula branca desenvolvida *in vitro* com material mantido em casa de vegetação, Smith et al. (1986) verificaram que as células paliçádicas em corte transversal tomavam 38% do total da espessura nas plantas em casa de vegetação, porém, somente 21% nas dos materiais *in vitro*.

Lee et al. (1985), trabalhando com *Liquidambar*, mostraram que diferenças no fluxo quântico podem modificar o desenvolvimento *in vitro*. A elevação nos níveis de luz produziu folhas mais espessas *in vitro*, com diferenciação do tecido paliçádico no mesofilo. A anatomia foliar destas plântulas apresentou-se mais próxima de folhas de mudas em aclimatização do que o material *in vitro* crescendo em baixa irradiância.

A estrutura e o funcionamento do estômato têm sido implicados pela falta de controle da entrada e saída de água mostrada pelas plantas micropropagadas quando removidas do meio de cultura. Em todas as espécies observadas, os estômatos estavam totalmente abertos quando em cultivos *in vitro*. A densidade estomática *in vitro*, medida por número de estômatos por mm², foi maior em macieira (Blanke & Belcher, 1989) e roseira (Capellades et al., 1990), mas menor em ameixeira (Brainerd et al., 1981), quando comparadas com plantas que cresceram em casa de vegetação.

A morfologia e a densidade dos estômatos podem ser alteradas *in vitro* por mudanças das condições ambientais. Em roseiras que cresceram em condições *in vitro*, o aumento na irradiância de 25 para 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e decréscimo da umidade relativa de 100% para 75%, resultou em estômatos muito similares àqueles formados em plantas em casa de vegetação. Os estômatos foram mais elípticos e em menor número (Capellades et al., 1990).

O tempo de fechamento dos estômatos durante a transferência das plantas *in vitro* para casa de vegetação pode ser determinante para a sua sobrevivência durante a aclimatização. Esse tempo pode ser variável de acordo com a espécie e as condições *in vitro*. Na verdade, a maioria dos estômatos fecha entre 12 e 24 horas após a retirada da planta do meio de cultura. Shackel et al. (1990) calcularam que a perda de água após 24 horas supera duas ou três vezes o peso inicial das plantas. Esses dados revelam que a demanda transpiratória pode resultar em severo estresse hídrico por meio da resposta de fechamento de estômatos à baixa umidade relativa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora seja certo que a alteração do ambiente de cultivo possa favorecer a capacidade fotoautotrófica, a dificuldade tem sido determinar qual o grau de fotoautotrofia atingida pela planta em determinada condição de cultivo, principalmente em função das metodologias disponíveis para esses estudos (Serret et al., 1996). Além disso, uma única característica da planta ou único fator ambiental não podem expressar um processo tão complexo (Decchetti, 2004).

É evidente que qualquer metodologia que cause a aproximação da micropropagação convencional, em relação aos sistemas fotoautotróficos, pode trazer benefícios interessantes, como economia do processo e proporcionar plantas produzidas *in vitro* mais rústicas e resistentes aos estresses do processo de aclimatização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELBERG, J.; FUJIWARA, K.; KIRDMANEE, C.; KOZAI, T. Photoautotrophic shoot and root development for triploid melon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 95-104, 1999.

BLANKE, M. M.; BELCHER, A. R. Stomata of apple leaves cultured in vitro. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 85-89, 1989.

BORKOWSKA, B. Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted *in vitro* or *ex vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 89, n. 3, p. 195-206, July 2001.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. J. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, July 1981.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. J.; KWIATKOWSKI, C. S. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environment. **HortScience**, Alexandria, v. 16, n. 2, p. 173-175, Apr. 1981.

CAPELLADES, M.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C. DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue culture *Rosa multiflora*. **Jornal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141-145, Jan. 1990.

CUI, Y. Y.; HAHN, E. J.; KOZAI, T.; PAEK, K. Y. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 62, n. 3, p. 219-226, 2000.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. Pathological and physiological problems related to in vivo culture of plant. **Parasitica**, Gebloux, v. 40, n. 1, p. 69-75, 1984.

DECCETTI, S. F. C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L.** 2004. 93 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A. M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in kiwifruit cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordercht, v. 47, n. 2, p. 127-134, 1996.

DOOLEY, J. H. Influence of lighting spectra on plant tissue. In: METTING OF AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS, 1991, Chicago. **Proceedings...** Chicago: [s. n.], 1991.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Leaf anatomy od red raspberry transfered from culture to soil. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 109, n. 2, p. 172-176, Mar. 1984.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso de luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p. 961-965, jul-ago, 2005,

FISCHER, U.; ALFERMANN, A. W. Cultivation of phoautotrophic plant cell suspensions in biorfeactor: influence of culture conditions. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 19-28, July 1995.

FUCHIGAMI, L. H.; CHENG, T. Y.; SOELDNER, A. Abaxial transpiration of water loss in aseptically cultured plum. **Journal of the american society of horticultural science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 519-522, July 1981.

GROUT, B. W. W.; ASTON, M. J. Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. **Annals of Botany**, London, v. 42, n. 180, p. 993-995, 1978.

KANECHI, M.; OCHI, M.; ABE, M.; INAGAKI, M. N.; MAEKAWA, S. The effects of carbon dioxide enrichment, natural ventilation, and light intensity on growth, photosynthesis, and transpiration of Cauliflower plantlets cultured *in vitro* photoautotrophically and photomixotrophically. **The Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, n. 2, p. 176-181, Mar. 1998.

KHAN, S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, O. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia plantarum**, Copenhagen, v. 46, n. 2, p. 161-166, 2003.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata*) cv. Grande Naine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 141-145, 1998.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, n. 1, 49-56, 1997.

KUBOTA, C.; TADOKORO, N. Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, New York, v.35, p. 296-298, 1999.

LEE, N.; WEZSTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. **Journal of the american society of horticultural science**, Alexandria, v. 113, n. 1, p. 167-171, Jan. 1988.

PREECE, E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 72-93.

SEKO, Y.; NISHIMURA, M. Effects of CO₂ and light on survival and growth *in vitro* on sugar-free medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 257-264, Sept. 1996.

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

SHACKEL, K. A.; NOVELLO, V.; SUTTER, E. G. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue cultured apple plants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 3, p. 468-472, Apr. 1990.

SMITH, M. A. L.; PALTA, J. P.; McCOWN, B. H. Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling, and greenhouse-grown asian White birch. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 11, n. 3, p. 437-442, May 1986.

STANDAERT-DE-METSANAERE, R. E. Economic considerations. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation – technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 131-140.

VYAS, S.; PUROHIT, S. D. In vitro growth and shoot multiplication of *Wrightia tomentosa* Roem et Schult in a controlled carbon dioxide environment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 283-286, Dec. 2003.

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. **American Journal of botany**, Columbus, v. 69, n. 10, p. 1579-1586, Oct. 1982.

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Scanning electron microscopy of in vitro cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 3, p. 475-480, May 1983.

ZIV, M. In vitro hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERRSON, P. G. (Ed.). **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths, 1987. p. 187-196.

ZOBAYED, S.M.A. Physiology of Eucalyptus plantlets grown photoautotrophically in scaled-up vessel. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, New York, v.37, p. 807-813, 2001.

PALAVRAS CHAVES:
Micropropagação, luz natural.