

Divulgação técnica

Avaliação de parâmetros fotosintéticos em microplantas de Castanheiro durante a fase de aclimatização

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo comparativo em microplantas de castanheiro com dois sistemas de expressão e desenvolvimento radicular, *in vitro* e *ex vitro*, e com duas intensidades luminosas (150 e 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a aclimatização, e a sua influência no desenvolvimento das microplantas durante esta fase, através da quantificação de parâmetros fotossintéticos. A concentração de clorofilas, após os tratamentos de aclimatização, dependeu quer do tipo de sistema radicular que as plantas possuíam no início da aclimatização, quer do regime luminoso a que as plantas estiveram submetidas.

As plantas com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas sob menor irradiância foram as que apresentaram valores superiores para a clorofila total (7,74 mg g⁻¹ps), mas com o valor mais baixo na razão entre clorofila a/b (2,7).

José Carlos
Gonçalves
Escola Superior Agrária.
Instituto Politécnico
de Castelo Branco.
CERNAS - Centro
de Estudos Recursos
Naturais, Ambiente e
Sociedade
Portugal.
jcgoncalves@ipcb.pt

Maria Teresa Coelho
Escola Superior Agrária.
Instituto Politécnico
de Castelo Branco.
CERNAS - Centro de
Estudos de Recursos
Naturais, Ambiente e
Sociedade
Portugal.
mteresacoelho@ipcb.pt

Graça Diogo
Escola Superior Agrária.
Instituto Politécnico
de Castelo Branco.
Portugal.
gdiogo@ipcb.pt

Quando comparamos os valores registrados para os parâmetros fotossintéticos das plantas dos diferentes tratamentos, verificamos que as taxas de fotossíntese aparente vão gradualmente aumentando à medida que as novas folhas se vão desenvolvendo ($0,75 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nas folhas persistentes e $3,43 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ na folha 3 das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). O mesmo acontece na capacidade fotossintética ($3,93 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nas folhas persistentes e $7,87 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ na folha 3 das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Estes valores foram tendencialmente superiores nas plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a maior irradiância, pelo que a um melhor sistema radicular e uma maior disponibilidade luminosa correspondeu um acréscimo na competência fotossintética, o que resultou num melhor desenvolvimento morfofisiológico das plantas.

Palavras-chave: aclimatização, castanheiro, fotossíntese, irradiância, rizogênese.

Abstract

The aim of this study was to conduct a comparative study in chestnut microplants with two systems of expression and root development, *in vitro* and *ex vitro*, and with two light intensities (150 and $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) during acclimatization, and its influence on the development of microplants during this phase, through the quantification of photosynthetic parameters. The chlorophyll concentration after acclimatization treatments depended on both type of root system that the plants had at the beginning of acclimatization, whether the light intensity to which the plants were subjected. Plants with roots *in vitro* and acclimatized under lower irradiance showed the higher values for total chlorophyll ($7.74 \text{ mg g}^{-1}\text{ps}$), but with the lowest value of the ratio of chlorophyll a/b (2.7). When the values recorded for the photosynthetic parameters of plants of different treatments were compared, we found that the rates of apparent photosynthesis gradually increasing as the new leaves are developed ($0.75 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in persistent leaves and $3.43 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ on leaf 3 on plants acclimatized to $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). The same happens in photosynthetic capacity ($3.93 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in persistent leaves and $7.87 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ on leaf 3 of plants acclimatized to $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). These values were higher in plants with *ex vitro* rooting and acclimatization to higher irradiance, so a better root system availability and a higher light availability, corresponding to an increase in the pho-

tosynthetic ability, resulting in a better morphophysiological plant development.

Keywords: acclimatization, chestnut, light intensity, photosynthesis, rooting.

1. INTRODUÇÃO

O processo de multiplicação *in vitro* desenvolve-se num microambiente caracterizado por elevada humidade relativa, baixa intensidade de fluxo fotónico, trocas gasosas limitadas e com disponibilidade de açúcar e nutrientes que garantem um crescimento heterotrófico. Como consequência destes fatores, o material vegetal que aí se desenvolve apresenta, comparativamente às plantas obtidas por semente, alterações ao nível morfológico, anatómico e fisiológico que condicionam fortemente a sua capacidade de adaptação às futuras condições naturais de crescimento.

Para que o processo de adaptação às condições naturais permita obter uma elevada taxa de sobrevivência das microplantas regeneradas *in vitro*, torna-se necessário um período de transição, conhecido por aclimatização, durante o qual se devem desenvolver adaptações anatómicas e fisiológicas às condições de cultura em autotrofia, sendo este processo muito dependente das espécies (Grout, 1988).

A funcionalidade do sistema radicular adventício é, assim, uma condição essencial para a sobrevivência da planta durante a fase de aclimatização, como também para o crescimento e desenvolvimento da planta no seu local definitivo (Mohammed e Vidaver, 1991; Van Telgen et al., 1992; Díaz-Pérez et al., 1995). Se o balanço hídrico da planta depende em muito da funcionalidade estomática, não é menos verdade que esse balanço pode ser condicionado pela capacidade de absorção do sistema radicular. Esta capacidade de absorção é controlada pela área de exposição radicular, pelas propriedades hidráulicas que se estabelecem entre raiz e substrato, pelo potencial de água do solo, bem como por outros fatores, tais como, salinidade, baixas temperaturas e fraco arejamento do substrato (Kramer, 1983). As raízes formadas em condições *in vitro* têm sido consideradas, para algumas espécies, como funcionalmente deficientes, quer pela sua hipertrofia quer pela ausência de pelos radiculares (Debergh e Maene, 1981; Ziv, 1986; McClelland et al., 1990), bem como por apresentarem deficientes conexões vasculares com o caule, o que resulta numa restrição na capacidade de translocação de água entre a raiz e o caule (Grout e Aston, 1977a). Também a elevada mortalidade destas raízes durante as primeiras

horas ou dias de aclimatização foi referida como sendo uma desvantagem destes sistemas radiculares (Debergh e Read, 1991).

Em oposição a estes sistemas radiculares *in vitro* estão os sistemas radiculares adventícios cujos processos de expressão e desenvolvimento ocorrem em condições *ex vitro*, isto é, em condições de autotrofia. Estes sistemas, para além da vantagem de possibilitarem a formação de raízes em contacto direto com um substrato natural, permitem também à microplanta saírem das condições heterotróficas para as condições autotróficas, com as evidentes vantagens que esse facto deverá trazer à planta quando for colocada em condições de aclimatização.

A intensidade da luz durante a aclimatização é outro fator que pode condicionar o êxito da fase de aclimatização. Sabe-se que a intensidade luminosa tem efeitos significativos na diferenciação foliar e pode influenciar certas características, tais como a espessura da folha, a diferenciação do mesófilo, o desenvolvimento vascular, a divisão celular e a diferenciação estomática (Lichtenthaler, 1981). Como consequência destes efeitos, e por um efeito direto, também a atividade fotossintética é condicionada pela luz (Donnelly e Vidaver, 1984; Lee et al., 1985; Matysiak e Nowak, 1994). Acréscimos na intensidade de luz durante a aclimatização têm sido referenciados como vantajosos para o acelerar do processo de adaptação (Lee et al., 1985; Kozai et al., 1990; Reuther, 1991; Dubé e Vidaver, 1992) desde que não se verifiquem condições de fotoinibição (Dubé e Vidaver, 1992).

O objetivo deste trabalho foi o estudo comparativo de dois sistemas de expressão e desenvolvimento radicular, *in vitro* e *ex vitro*, e sua influência no desenvolvimento das microplantas durante a aclimatização, bem como o estudo da influência de duas intensidades luminosas a que as microplantas foram sujeitas durante a aclimatização. A avaliação destes fatores foi feita através do estudo de parâmetros fotossintéticos dos quais a quantificação de clorofilas, taxa de fotossíntese aparente, taxa de transpiração e a condutância estomática e capacidade fotossintética.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a fase de aclimatização das microplantas foram utilizados estufins com um volume interno de 450 litros e equipados com dispositivos de controlo de luz e humidade (ARALAB™, mod. 500 E). Os estufins estavam colocados numa sala climatizada a 25°C. No interior dos estufins,

como consequência da dissipação de calor pela energia luminosa, a temperatura oscilou em 25 ± 2 °C. A iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes Osram® Lumilux White Cool e Sylvania® Gro-lux colocadas no topo do estufim, com intensidade de acordo com os tratamentos definidos. O fotoperíodo utilizado foi de 16 h luz e 8 h noite.

A humidade relativa (HR), controlada por uma sonda higrométrica com controlo digital, era produzida por um sistema vaporizador de ultrassons (sistema de nevoeiro), que produz gotículas de água, cujas dimensões permitem a criação de ambientes com humidade elevada, sem que haja significativa condensação. Os valores de HR foram sendo gradualmente reduzidos desde os 98% e 95% no dia 0 de instalação, respetivamente para as microplantas provenientes do enraizamento *in vitro* e *ex vitro*, até aos 50%, 24 dias após o início da aclimatização, mantendo-se esta humidade até ao final do período de aclimatização que foi de 4 semanas.

As microplantas usadas nos ensaios de aclimatização foram selecionadas por forma a constituírem lotes homogéneos e apresentando sinais aparentes de crescimento, quer da parte aérea quer da parte radicular. No caso das microplantas provenientes do enraizamento *in vitro*, após a remoção da planta do meio de cultura, foi feita a lavagem do sistema radicular em água corrente por forma a retirar o mais possível os restos de agar antes de serem colocadas em vasos. No caso das plantas com enraizamento *ex vitro*, estas foram retiradas das caixas e colocadas diretamente nos vasos.

As microplantas foram colocadas, individualmente, em vasos de plástico com 200 cm³ de capacidade (\emptyset 9 x 8 cm). O substrato foi uma mistura de turfa:perlite, 1:2, v:v. Após o envasamento cada planta foi regada com uma solução nutritiva sendo de imediato colocada no estufim de aclimatização.

Para uma mais fácil e rápida visualização apresenta-se na figura 1 um esquema ilustrativo dos ensaios realizados e respetivos momentos de avaliação. Na figura 2 apresenta-se um aspeto geral das microplantas na fase inicial e final de aclimatização.



Fig. 1. Esquema dos ensaios de enraizamento e aclimatização e respetivos momentos de avaliação.



Fig. 2. Aspetto geral das microplantas na fase inicial e final de aclimatização. (A) Início da aclimatização no estufim de aclimatização. (B e C) Fim de aclimatização, dentro e fora do estufim.

2.1 Quantificação de clorofilas

A primeira quantificação das concentrações de clorofilas foi feita nas folhas de plantas no final da fase de enraizamento a que correspondeu o dia zero de aclimatização (fD0) (Fig. 1). A segunda avaliação teve lugar 4

semanas após o dia zero, isto é, no final da fase de aclimatização a que foram sujeitas as plantas provenientes do enraizamento *in vitro* e *ex vitro* e submetidas a dois níveis de irradiância, 150 e $250 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 1 e 2). Foram quantificadas as concentrações de clorofilas nas folhas persistentes (fP), folha um (f1), folha dois (f2) e folha três (f3). Foram também determinadas as concentrações de clorofilas em folhas de plantas micropropagadas a crescer em vaso sob condições de campo (fC).

A extração foi feita em acetona a 80% de acordo com o método de Arnon (1949) a partir do material vegetal fresco. As absorvências dos extratos foram lidas no espectrofotómetro (Shimadzu, UV-2100) para os comprimentos de onda de máxima absorvência das Cla e Clb em acetona a 80% (663 e 645 nm respetivamente) e aplicaram-se as fórmulas de cálculo (Mackinney, 1941).

Cada determinação foi feita a partir do extrato de dois discos de tecido foliar com $\varnothing 7 \text{ mm}$ ($0,77 \text{ cm}^2$ de área), recolhidos em plantas distintas e casualizadas tendo sido usadas 8 amostras ($n=8$) para cada tipo de folha; as experiências foram repetidas duas vezes para cada tratamento.

Os resultados foram expressos em mg de clorofila por unidade de peso seco foliar ($\text{mg g}^{-1}\text{ps}$). Nestas determinações foi utilizado um valor médio de peso seco por disco para cada um dos tipos de folhas referenciadas. Esse valor foi determinado como a média de 20 amostras ($n=20$), repetido por 3 vezes.

2.2 Parâmetros fotossintéticos

A taxa de fotossíntese aparente (A), a taxa de transpiração (E) e a condutância estomática (G) foram medidas nas folhas persistentes (fP), folha um (f1), folha dois (f2) e folha três (f3) de plantas com enraizamento *ex vitro* e submetidas aos dois níveis de irradiância, 150 e $250 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e nas folhas dois (f2) e folhas três (f3) de plantas com enraizamento *in vitro*, igualmente submetidas aos dois níveis de irradiância durante a aclimatização (Fig. 1). Estes parâmetros foram também quantificados em folhas de campo (fC).

O equipamento utilizado foi um porómetro portátil com sistema de aquisição de dados integrado (CO_2 Gas Analyzer, Model CI-301 - CID, Inc., USA), acoplado a uma cuvete circular com $2,5 \text{ cm}^2$ de área, a funcionar em sistema aberto. A taxa de fluxo de ar foi de $0,5 \text{ litros min}^{-1}$ e os registos feitos em modo manual. A taxa de fotossíntese líquida, ou aparente, é determinada através da taxa de CO_2 fixado por unidade de área foliar e por unidade de tempo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a taxa de transpiração é dada pelo fluxo de vapor de água

por unidade de área foliar e por unidade de tempo ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a condutância estomática é dada pelo inverso da resistência estomática, conhecendo a transpiração e temperatura da superfície da folha e expressa em $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Por cada folha efetuaram-se 5 leituras consecutivas, sendo o valor considerado, a média dessas cinco leituras. Para a folha dois (f2) e folha três (f3) foram utilizadas 15 plantas ($n=15$), para as folhas persistentes (fp) e folhas de plantas de campo (fc) foram utilizadas 10 plantas ($n=10$) e a experiência foi repetida 2 vezes.

2.3 Curvas de resposta à luz e capacidade fotossintética

A taxa fotossintética máxima (A_{max}) foi medida pela taxa de libertação de O_2 em condições de CO_2 saturante. A densidade do fluxo fotónico fotossinteticamente ativo (PPFD) foi saturante para o caso da determinação de A_{max} ($1120 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Para a sua determinação utilizou-se um sistema constituído por um eléctrodo de oxigénio na fase gasosa (Hansatech Ins. Ltd, Modelo LD2, Norfolk, UK) e uma caixa de controlo do eléctrodo (Hansatech Ins. Ltd, Modelo CB1-D, Norfolk, UK). A luz foi emitida por uma lâmpada Björkman (Hansatech Ins. Ltd, LS2), com sistema de filtros neutros que, por associação entre si, permitem fornecer a PPFD pretendida.

As taxas foram determinadas no mesmo tipo de folhas das utilizadas para a determinação da taxa de fotossíntese aparente, à temperatura constante de 25°C . A concentração de CO_2 foi de aproximadamente 5%, fornecido pela libertação de CO_2 a partir de uma solução tampão saturada de NaHCO_3 .

Para a determinação das curvas de resposta à luz, a CO_2 saturante, após um período inicial de escuro, a densidade de fluxo fotónico (PPFD) variou progressivamente para 8, 18, 28, 70, 140, 370, 700 e $1120 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante o qual as taxas de libertação de O_2 por área foliar e por unidade de tempo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram calculadas pela seguinte expressão:

$$k = \frac{(l_f - l_i) \cdot A \cdot \Delta t}{(C_i - C_f) \cdot V} \cdot \frac{273}{273 + T}$$

[l_f e l_i são as leituras finais e iniciais dos valores da unidade LD2, de medida (m) ou de calibração (c) respetivamente; Δt é o intervalo de tempo entre l_i e

l_f (min); s é a área foliar usada (cm^2); CO_2 é a concentração de CO_2 na câmara (%), e T é a temperatura do ar na câmara ($^\circ\text{C}$). A constante 15.62 é o fator de conversão de unidades em que é expressa A]

Para cada determinação foram utilizados 7 discos foliares de $\varnothing 7 \text{ mm}$ ($2,695 \text{ cm}^2$ de área) destacados da mesma folha a partir de plantas casualizadas, exceto das folhas persistentes que, devido à sua reduzida área se tornou necessário utilizar duas a três folhas da mesma planta. Para cada tipo de folha foram feitas três determinações ($n=3$) e a experiência foi repetida duas vezes.

3 RESULTADOS

3.1 Clorofilas

As concentrações em pigmentos clorofilinos, clorofila a (Cl_a), clorofila b (Cl_b) e clorofila total (Cl_{total}) foram determinadas de acordo com o descrito em material e métodos.

Os resultados dessas determinações são apresentados na tabela 1, onde se avalia a influência dos dois fatores, sistema de enraizamento e irradiância, e nas figuras 3 a 7 onde se avalia, para cada um dos tratamentos de enraizamento, a influência da irradiância de aclimatização em cada um dos tipos de folhas comparativamente com os valores das folhas no dia zero (fD0) de aclimatização

Verificaram-se, para todos os parâmetros em análise (Cl_a , Cl_b , Cl_{total} e razão Cl_a/Cl_b) efeitos significativos, quer do tipo de sistema radicular que as plantas possuíam no início da aclimatização quer da irradiância a que as plantas estiveram sujeitas durante a aclimatização, bem como uma interação significativa entre estes dois fatores (Tab. 1).

Tab. 1. Influência do tipo de desenvolvimento radicular e da intensidade da luz na concentração de Cl_a , Cl_b , Cl_{total} e razão Cl_a/Cl_b no final da fase de aclimatização em plantas de castanheiro micro-propagadas.

Rizogénese	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Cl_a ($\text{mg g}^{-1} \text{ps}$)	Cl_b ($\text{mg g}^{-1} \text{ps}$)	Cl_{total} ($\text{mg g}^{-1} \text{ps}$)	Razão Cl_a/Cl_b
<i>In vitro</i>	150	7,74 a	3,50 a	11,24 a	2,70 b
	250	4,71 c	1,30 c	6,01 c	3,80 a
<i>Ex vitro</i>	150	4,50 c	1,43 c	5,94 c	3,50 a
	250	6,14 b	1,96 b	8,10 b	3,40 a

As plantas com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram as que apresentaram concentrações de Cl_a e Cl_b mais elevadas, no entanto, apresentaram uma

razão entre Cl_a/Cl_b significativamente inferior às plantas dos restantes tratamentos; nas plantas com enraizamento *ex vitro*, contrariamente ao que se registou nas plantas com enraizamento *in vitro*, foram as plantas submetidas a maior irradiância ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) as que apresentaram concentrações de clorofilas mais elevadas (Tab. 1).

Na tabela 2 estão indicadas as concentrações de Cl_a , Cl_b , Cl_{total} e razão Cl_a/Cl_b para as folhas de campo de plantas micropropagadas com um ano de idade, onde é possível observar uma razão Cl_a/Cl_b dentro dos valores apresentados pelas plantas no final da aclimatização, apresentando, no entanto, valores superiores de Cl_a , Cl_b , e Cl_{total} .

Tab. 2. Concentração de Cl_a , Cl_b , Cl_{total} e razão Cl_a/Cl_b em folhas de campo de plantas micropropagadas com 1 ano de idade. Os valores são médias \pm ep de 8 repetições.

Clorofila a (mg g ⁻¹ ps)	Clorofila b (mg g ⁻¹ ps)	Clorofila total (mg g ⁻¹ ps)	Razão Cl_a / Cl_b
9,59 \pm 1,06	3,10 \pm 0,46	12,69 \pm 1,30	3,14 \pm 0,45

A análise da influência da irradiância a que as microplantas estiveram sujeitas durante a fase de aclimatização, para cada um dos tipos de enraizamento, permite avaliar mais em detalhe a variação das concentrações de clorofilas em cada um dos tipos de folhas, bem como a comparação dessas concentrações com o valor da folha do dia zero (fD0) de aclimatização.

Nas plantas com enraizamento *in vitro* registaram-se diferenças significativas na concentração de Cl_a , em função do tratamento (níveis de irradiância) e do tipo de folha analisado (Fig. 3). O valor médio mais elevado foi registado nas folhas persistentes e folha um, com $9 \pm 0,5$ e $9,2 \pm 0,5$ mg g⁻¹ps respetivamente, diferindo de forma significativa das restantes. Quando comparamos a concentração de Cl_a nas folhas do dia zero, verificamos que esta difere significativamente das folhas persistentes das plantas aclimatizadas a 150 e 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 3A).

Nas plantas com enraizamento *ex vitro* são as folhas das plantas que estiveram sujeitas à maior irradiância durante a aclimatização que apresentam as concentrações de Cl_a mais elevadas, contrariamente ao que havia sido registado com as plantas aclimatizadas a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 3B). O valor mais elevado foi registado nas folhas persistentes das plantas aclimatizadas a 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com $7,1 \pm 0,4$ mg g⁻¹ps, e o valor mais baixo registado na folha dois das plantas aclimatizadas sob a irradiância de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com $3,4 \pm 0,2$ mg g⁻¹ps. Quando comparamos a concentração de Cl_a nas folhas do dia zero verificamos que esta difere significativamente das folhas persistentes (Fig. 3B).

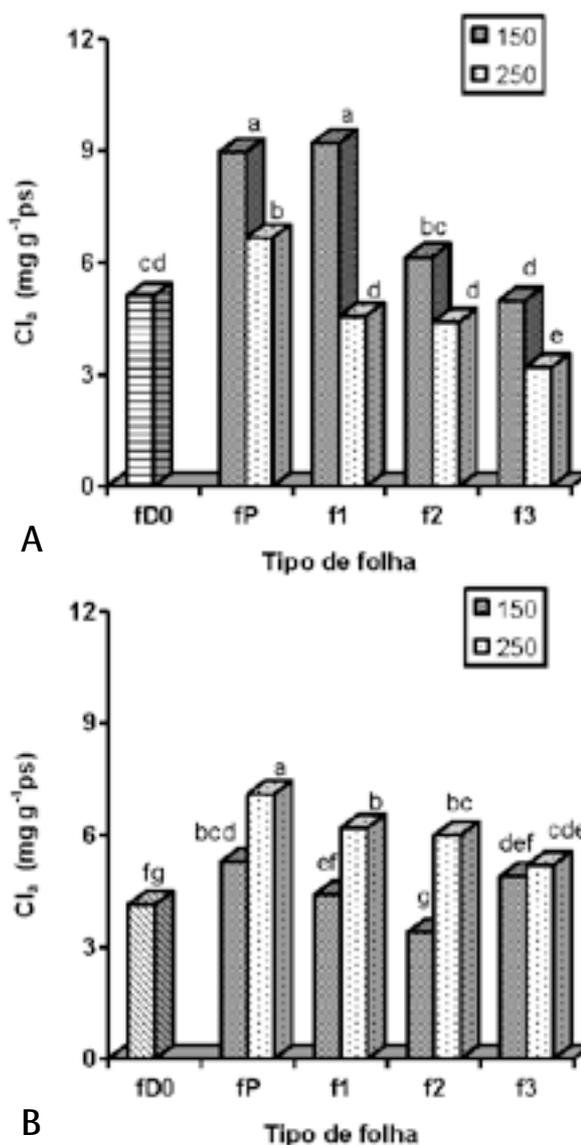


Fig. 3. Efeito da intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a fase de aclimatização de plantas de castanheiro micropropagadas, nas concentrações de clorofila a (Cl_a) para cada um dos tipos de folha analisada e folha do dia zero (fD0). (A) Plantas com sistema radicular desenvolvido *in vitro*. (B) Plantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro*.

As concentrações de Cl_b apresentaram um padrão de variação em tudo semelhante ao registado para as concentrações de Cl_a . Assim, nas plantas com enraizamento *in vitro* registaram-se valores mais elevados nas folhas das plantas aclimatizadas a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ comparativamente às aclimatizadas a 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com os valores mais elevados a serem registados também nas folhas persistentes e folha um, sem diferença significativa entre si (Fig. 4A). A concentração na folha do dia zero não mostrou diferença significativa para

a concentração das folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Já as folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram um acréscimo significativo no teor de Cl_b . Nas plantas com enraizamento *ex vitro* foram as folhas das plantas sujeitas à maior irradiância durante a aclimatização as que apresentaram valores de Cl_b mais elevados, com valores máximos a serem registados para as folhas persistentes, folha um e folha dois, sem diferença significativa entre si (Fig. 4B).

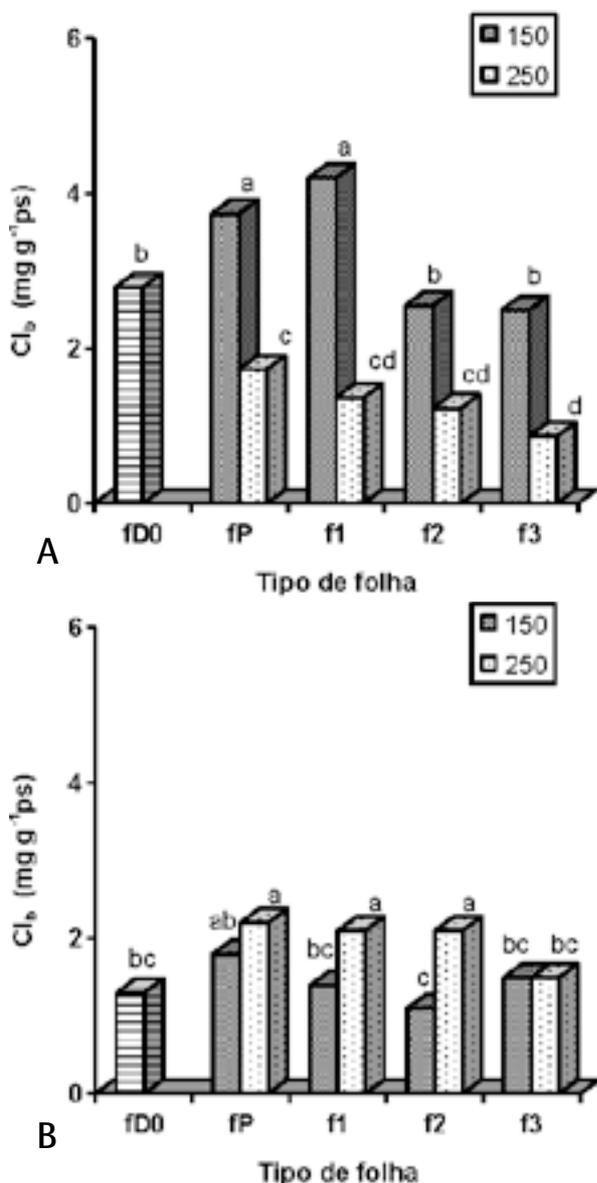


Fig. 4. Efeito da intensidade de luz durante ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a fase de aclimatização de plantas de castanheiro micropropagadas na concentração de clorofila b (Cl_b) para cada um dos tipos de folhas analisadas e folha do dia zero (fD0). (A) Plantas com sistema radicular desenvolvido *in vitro*. (B) Plantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro*.

As folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mostraram um acréscimo significativo no teor de Cl_b comparativamente com as folhas do dia zero, o mesmo já não acontecendo com as folhas persistentes das plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4B).

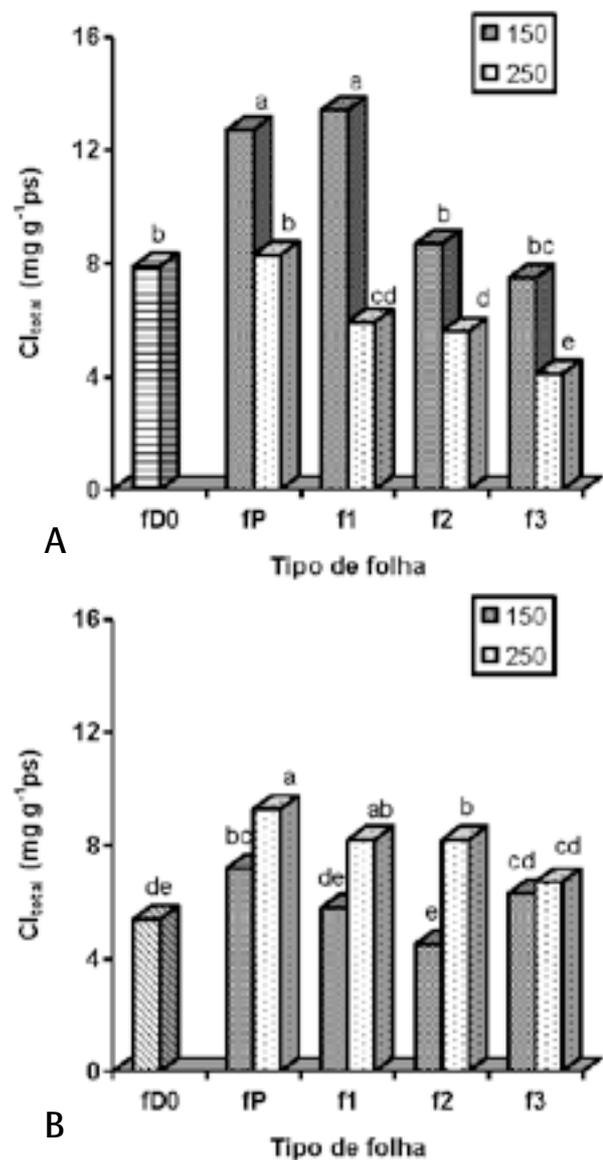


Fig. 5. Efeito da intensidade de luz durante a fase de aclimatização na concentração de clorofila total (Cl_{total}) para cada um dos tipos de folhas analisadas e folha do dia zero (fD0). (A) Plantas com sistema radicular desenvolvido *in vitro*. (B) Plantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro*.

A concentração de clorofila total reflete, consequentemente, o padrão de variação conjunto das concentrações de Cl_a e Cl_b em função do tratamento (níveis de intensidade luminosa) e do tipo de folha analisado. Em relação ao tipo de folha, o valor médio mais elevado foi registado nas fo-

lhas persistentes e folha um das plantas com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com $12,7 \pm 0,5$ e $13,4 \pm 0,9 \text{ mg g}^{-1}$ ps respectivamente, diferindo de forma significativa das restantes (Fig. 5A). Nas plantas com enraizamento *ex vitro*, os valores mais elevados foram registados nas folhas persistentes, folha um e folha dois das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com $9,3 \pm 0,3$, $8,2 \pm 0,8$ e $8,2 \pm 0,4 \text{ mg g}^{-1}$ ps respectivamente (Fig. 5B).

Na razão Cl_a/Cl_b das plantas com enraizamento *in vitro* em função dos níveis de intensidade luminosa, registaram-se valores mais elevados nas folhas que estiveram sujeitas a maior irradiância durante a aclimatização, com valores entre $3,6 \pm 0,2$ e $3,9 \pm 0,1$ (Fig. 6A).

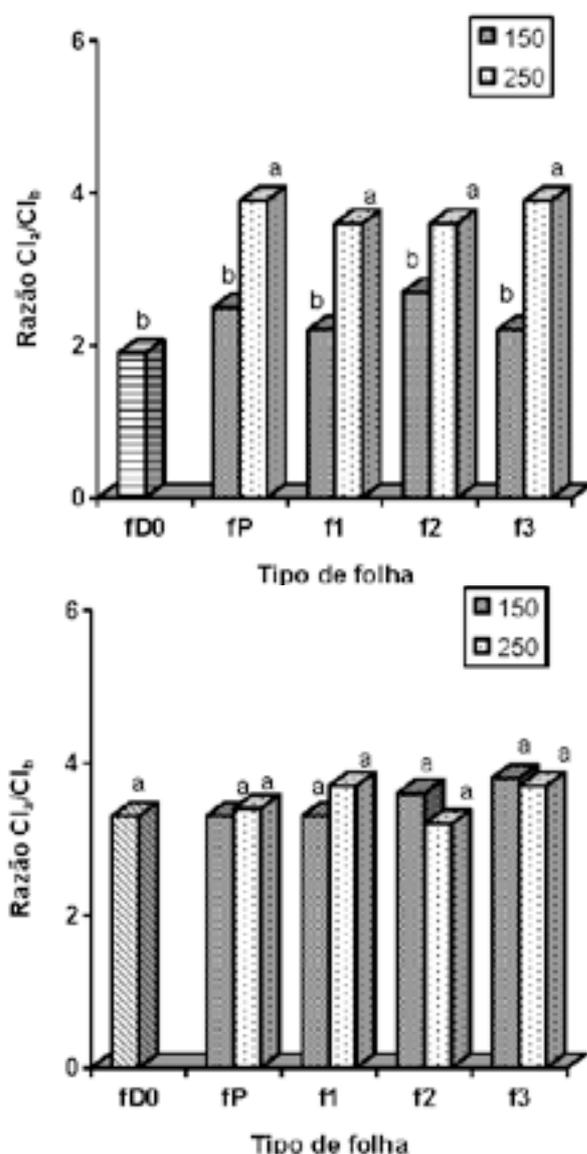


Fig. 6. Efeito da intensidade de luz durante a fase de aclimatização na razão entre concentrações de clorofila a e b (Cl_a/Cl_b) para cada um dos tipos de folha analisada e folha do dia zero (FD0). (A) Plantas com sistema radicular desenvolvido *in vitro*. (B) Plantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro*.

Nas plantas com enraizamento *ex vitro* os valores da razão entre Cl_a/Cl_b não mostraram qualquer diferença significativa em função do tipo de folha analisada, tendo os valores oscilado entre os $3,2 \pm 0,2$ para a folha dois das plantas que foram aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e os $3,8 \pm 0,4$ para a folha três das plantas que foram aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Verifica-se também que as folhas do dia zero apresentavam já uma razão em tudo idêntica à das folhas no final da fase de aclimatização (Fig. 6B).

3.2 Taxa de fotossíntese aparente, transpiração e condutância estomática

Na tabela 3 estão indicados os resultados obtidos na taxa de fotossíntese aparente, transpiração e condutância estomática, para as microplantas de cada um dos tipos de tratamentos no final da fase de aclimatização, utilizando apenas os resultados quantificados na folha dois (f2) e folha três (f3) uma vez que estes tipos de folhas foram comuns a todos os grupos de plantas.

Tab. 3. Influência do tipo de sistema radicular e densidade de fluxo fotônico de cada um dos tratamentos de aclimatização na taxa de fotossíntese aparente (A), taxa de transpiração (E) e condutância estomática (G), em plantas de castanheiro micropropagadas, quantificados na folha dois e três dos respetivos tratamentos, no final da fase de aclimatização.

Rizogénese	Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	G ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
<i>In vitro</i>	150	3,49 ab	2,09 b	80,47 b
	250	3,81 a	3,08 a	106,93 a
<i>Ex vitro</i>	150	3,23 b	1,82 bc	78,13 b
	250	3,25 b	1,72 c	79,35 b

Para qualquer dos referidos parâmetros, verificou-se que as diferenças significativas que se registaram se ficaram a dever, exclusivamente, ao fator rizogénese, isto é, o tipo de sistema radicular que as plantas possuíam no início do processo de aclimatização, não tendo o nível de irradiância influenciado os referidos parâmetros. O valor da taxa de fotossíntese aparente mais elevado foi registado nas plantas com raízes *in vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com $3,81 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sem diferença significativa para as plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mas significativamente diferente das plantas com raízes *ex vitro* (Tab. 3). Aquele grupo de plantas apresentou, também, os valores mais elevados para a taxa de transpiração (E), com $3,08 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e condutância estomática (G), com $106,9 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

De referir ainda que, para a taxa de transpiração e condutância estomática, se registaram interações significativas entre o tipo de tratamento de rizogénese e o regime de luz a que as plantas estiveram sujeitas durante a fase de aclimatização, dando assim a indicação de que estes parâmetros variam consoante a combinação destes fatores entre si (Tab. 3).

A análise do comportamento dos diferentes tipos de folhas quantificadas neste estudo, feita nas microplantas com enraizamento *ex vitro*, torna possível avaliar o contributo parcial de cada um desses tipos de folhas comparativamente com as folhas de plantas de campo (fC) (Fig. 7). Assim, são patentes as baixas taxas de fotossíntese aparente que as folhas persistentes apresentam, independentemente do tratamento luminoso a que as plantas estiveram sujeitas durante a aclimatização, com valores de $1 \pm 0,09$ e $0,75 \pm 0,09 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respetivamente para as plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 7A). É também visível o gradual acréscimo de taxa de fotossíntese na sequência de diferenciação foliar, entre folha um, dois e três, quer no caso das plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, quer nas plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 7A). De referir que na folha três das plantas do tratamento com maior irradiância se verificou um valor de taxa de fotossíntese aparente ligeiramente superior, sem diferença significativa, relativamente ao apresentado pela folha três do grupo de plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A taxa de fotossíntese aparente para as folhas de campo foi de $4,5 \pm 0,2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As taxas de transpiração apresentaram comportamento semelhante em todos os tipos de folhas analisados, com valores ligeiramente superiores nas folhas um e folha dois das plantas sujeitas a uma irradiância de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, com as folhas três das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a apresentarem um valor mais elevado em relação à folha três das plantas aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 7B). Também neste parâmetro o valor mais elevado foi registado nas folhas das plantas de campo, com $2,5 \pm 0,3 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

A condutância estomática apresenta também um padrão de flutuação bastante restrito (entre $70 \pm 4,7 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para a folha um das plantas aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $92 \pm 14,7 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para as folhas persistentes do mesmo tratamento), com um padrão de variação entre folhas das plantas dos dois tratamentos em tudo idêntico ao verificado com o das taxas de transpiração (Fig. 7C).

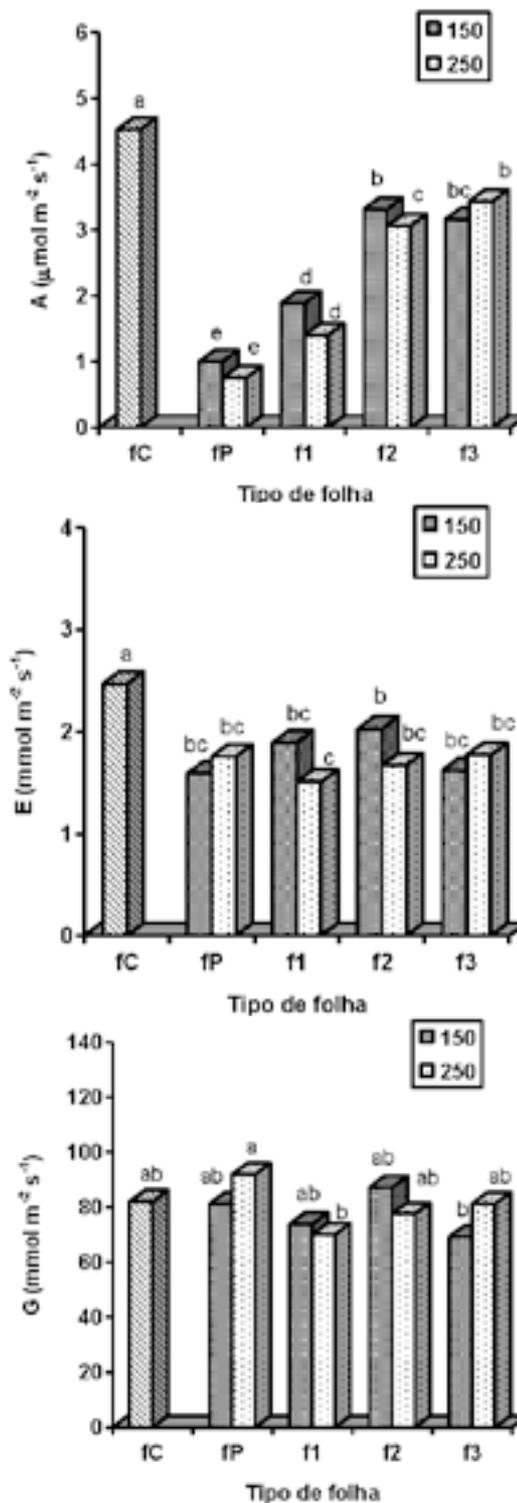


Fig. 7. Efeito da intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) durante a fase de aclimatização na taxa de fotossíntese aparente A (A), taxa de transpiração E (B) e condutância estomática G (C) em plantas de castanheiro micropropagadas com enraizamento *ex vitro*, medidas em folhas persistentes (fP), folha um (f1), folha dois (f2), folha três (f3) e folhas de campo de plantas micropropagadas (fC).

3.4 Curvas de resposta à luz e capacidade fotossintética

As curvas de resposta da taxa de fotossíntese em função da densidade de fluxo fotónico (PPFD), medidas a CO_2 saturante, apresentadas nas figuras 8 a 12, mostram uma adaptação gradual do aparelho fotossintético das plantas micropropagadas às condições *in vivo*, à medida que se vai assistindo ao desenvolvimento de novas folhas durante o processo de aclimatização.

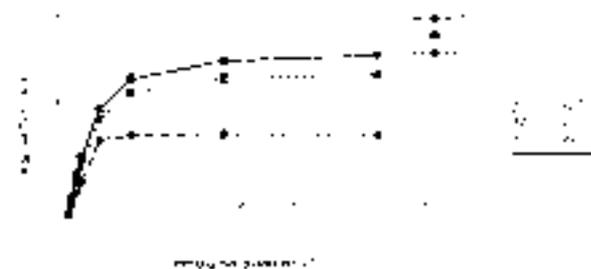


Fig. 8. Curvas de resposta à irradiância da taxa de libertação de O_2 , medida a 25°C e CO_2 saturante, em discos foliares dos diferentes tipos de folhas analisadas (f1, f2 e f3), de plantas de castanheiro com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, após 4 semanas de aclimatização. Os valores representam médias \pm erro padrão de três repetições.

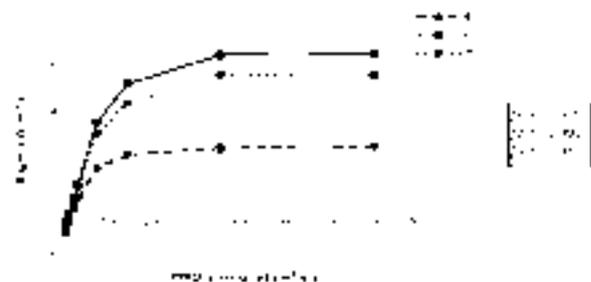


Fig. 9. Curvas de resposta à irradiância da taxa de libertação de O_2 , medida a 25°C e CO_2 saturante, em discos foliares dos diferentes tipos de folhas analisadas (f1, f2 e f3), de plantas de castanheiro com enraizamento *in vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, após 4 semanas de aclimatização. Os valores representam médias \pm erro padrão de três repetições.

No caso das folhas dois e três, a saturação da fotossíntese na taxa na libertação de O_2 verifica-se a níveis de irradiância mais elevados, entre 300 e $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As curvas de resposta à luz das folhas dois e três apresentaram um padrão de comportamento muito semelhante, independentemente dos tratamentos, tendo a folha dois apresentado sempre valores superiores ao da folha três, com exceção das plantas com raízes *ex vitro* e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nas irradiâncias intermédias (Fig. 10). Vale a pena referir que a folha dois tem, pelo menos, mais uma semana de desenvolvimento comparativamente à folha três.

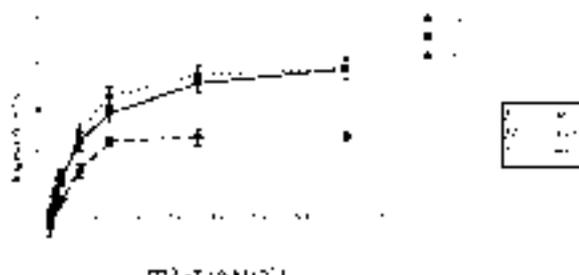


Fig. 10. Curvas de resposta à irradiância da taxa de libertação de O_2 , medida a 25°C e CO_2 saturante, em discos foliares dos diferentes tipos de folhas analisadas (f1, f2 e f3), de plantas de castanheiro com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, após 4 semanas de aclimatização. Os valores representam média \pm erro padrão de três repetições.

Verifica-se, também, que nas plantas com o sistema radicular desenvolvido em substrato natural, *ex vitro*, há uma certa tendência de aproximação das curvas de resposta entre estes dois tipos de folhas, de tal forma que os intervalos de confiança se sobrepõem entre si, deixando assim de haver diferenças significativas (Fig. 10 e 11), o que não aconteceu com as microplantas com enraizamento *in vitro* (Fig. 8 e 9).

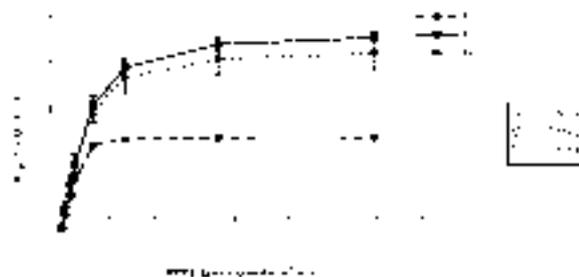


Fig. 11. Curvas de resposta à irradiância da taxa de libertação de O_2 , medida a 25°C e CO_2 saturante, em discos foliares dos diferentes tipos de folhas analisadas (f1, f2 e f3), de plantas de castanheiro com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, após 4 semanas de aclimatização. Os valores representam média \pm erro padrão de três repetições.

A curva de resposta das folhas de campo de plantas micropropagadas revela a maior capacidade fotossintética destas folhas, atingindo o ponto de saturação para intensidades de luz entre os 800 e $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 12).

De facto, é notória a reduzida capacidade fotossintética das folhas persistentes para qualquer dos tratamentos, não só em termos da rápida saturação, que é atingida a baixos níveis de PPFD a que se submeteram, $\pm 100 \mu\text{mol}$ quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, como também do valor de A_{max} que apresentaram, não ultrapassando $3,93 \pm 0,15 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtido nas folhas das plantas com raízes *ex vitro* e aclimatizadas a $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tab. 4).

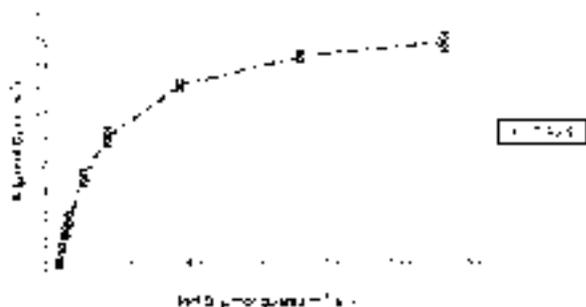


Fig. 12. Curva de resposta à irradiância, da taxa de libertação de O_2 , medida a $25^\circ C$ e CO_2 saturante, em discos foliares de folhas de campo (fC), de plantas de castanheiro micropropagadas com um ano. Os valores representam média \pm erro padrão de três repetições.

Tab. 4. Valores da taxa de fotossíntese a luz saturante, A_{max} ($\mu mol O_2 m^{-2} s^{-1}$), para as folhas persistentes (fP), folha um (f1) e folha dois (f2) no final dos diferentes tratamentos de aclimatização de plantas de castanheiro micropropagadas.

Rizogénese	Luz ($\mu mol m^{-2} s^{-1}$)	fP	f2	f3
<i>In vitro</i>	150	$3,68 \pm 0,10$	$7,72 \pm 0,47$	$6,76 \pm 0,11$
	250	$3,78 \pm 0,18$	$7,40 \pm 0,17$	$6,37 \pm 0,17$
<i>Ex vitro</i>	150	$3,66 \pm 0,12$	$7,87 \pm 0,64$	$6,84 \pm 0,50$
	250	$3,93 \pm 0,15$	$8,56 \pm 0,24$	$7,87 \pm 0,23$

Estes aspetos são apoiados pela análise dos valores estimados para as taxas de fotossíntese a luz saturante (A_{max}), calculados com base no ajustamento de uma função de regressão não linear, anteriormente descrita, às curvas de resposta à densidade de fluxo fotónico fotossinteticamente ativo (PPFD), para os diferentes tipos de folhas em cada um dos tratamentos (Tab. 4). As folhas persistentes apresentam entre si valores muito semelhantes, variando entre $3,66 \pm 0,12$ e $3,93 \pm 0,15 \mu mol O_2 m^{-2} s^{-1}$ e muito inferiores aos que se registaram na folha dois e folha três (entre $7,4 \pm 0,17$ e $8,6 \pm 0,247 \mu mol O_2 m^{-2} s^{-1}$ e $6,4 \pm 0,17$ e $7,9 \pm 0,23 \mu mol O_2 m^{-2} s^{-1}$ respetivamente), com diferenciação e expansão já em condições de aclimatização. As folhas dois apresentaram sempre valores superiores aos registados nas folhas três, independentemente do tipo de tratamento, o que não será de estranhar face à diferença de tempo de desenvolvimento para com a folha dois. De referir ainda que as plantas com raízes formadas *ex vitro* apresentaram uma melhor capacidade fotossintética, independentemente do tipo de folha, comparativamente às microplantas com raízes formadas *in vitro*, o que indicia a importância do sistema radicular que cada um dos grupos possuía no início da aclimatização ou também o facto de estas plantas terem já iniciado o seu processo de autotrofia em simultâneo com o desenvolvimento do sistema radicular.

4. DISCUSSÃO

As microplantas são submetidas a rápidas e extremas alterações de funcionamento quando transferidas dos sistemas de cultura *in vitro*, onde possuem uma fonte de sacarose disponível e de uma limitada troca de gases e baixas intensidades de luz, para sistemas de crescimento e desenvolvimento *in vivo*. Como consequência, estas plantas são forçadas a alterarem profundamente o seu sistema metabólico de heterotrófico para autotrófico, e o processo fotossintético torna-se então determinante para permitir a sobrevivência.

É bem conhecida a importância e os efeitos das características da luz ambiental sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal, determinando muitas das características morfológicas e fisiológicas das folhas. É sabido que as folhas desenvolvidas na presença de baixos níveis de irradiância apresentam uma elevada proporção de Cl_b relativamente à Cl_a , um elevado valor da Cl_{total} , bem como uma menor razão de proteína solúvel/clorofila, comparativamente a folhas desenvolvidas sob intensidades mais elevadas (Chaves, 1994), sendo apontados valores de Cl_a/Cl_b de $2,85 \pm 0,09$ para espécies de sombra e de $3,5 \pm 0,15$ para espécies de sol (Boardman, 1977).

Os resultados das plantas com enraizamento *in vitro* estão assim de acordo com as considerações feitas anteriormente e também referidas por outros autores (Lichtenhaler, 1981; Donnelly e Vidaver, 1984). A razão de tal não se ter verificado com as plantas com enraizamento *ex vitro* poderá relacionar-se com o facto de estas plantas possuírem desde o início da aclimatização um sistema radicular funcional, permitindo uma maior capacidade de absorção de nutrientes e, como consequência, um desempenho metabólico superior, confirmado pelo comportamento fotossintético destas plantas. No entanto, este grupo de plantas, não apresenta valores de razão de Cl_a/Cl_b significativamente diferentes das plantas com enraizamento *in vitro*, quando comparamos os diferentes tipos de folhas entre si.

As plantas com desenvolvimento *in vitro* apresentam uma concentração de clorofila total comparável ao apresentado por plantas controlo crescendo sob idênticas condições de luz (Donnelly e Vidaver, 1984). Em termos de área foliar, a concentração de clorofila é elevada em níveis de luz baixos comparativamente a níveis altos (Lee et al., 1985). Este facto está em concordância com a normal adaptação encontrada nas folhas de sombra (Björkman, 1981). Também em *Liquidambar styraciflua* crescendo *in vitro* sob baixa irradiância, Lee et al. (1985) observaram

que as membranas dos cloroplastos não estavam diferenciadas em grana e as membranas internas apresentavam um arranjo irregular. Quando colocadas sob elevadas intensidades, as folhas formadas em condições *in vitro* apresentaram fraca capacidade fotossintética que poderia resultar de danos provocados nos pigmentos fotossintéticos associados a fotoinibição.

Com a utilização de técnicas de fluorescência Lees et al. (1991), mostraram que folhas de *Clematis* diferenciadas *in vitro*, apresentavam alterações significativas no comportamento dos diferentes parâmetros de fluorescência, revelando a existência de clorofila fora dos centros de reação e desorganização dos pigmentos fotossintéticos. A desorganização dos pigmentos fotossintéticos pode ser responsável pela baixa capacidade fotossintética das folhas desenvolvidas *in vitro* e posteriormente aclimatizadas, apesar de apresentarem elevadas concentrações de clorofila total, tal como ocorreu nestes ensaios com as plantas de castanheiro. É provável que uma mudança de balanço fotossintético negativo para positivo durante a fase de diferenciação foliar esteja correlacionada com o acoplamento dos pigmentos fotossintéticos aos centros de reação. Apesar de se dispor de pouca informação sobre o impacto das condições de cultivo *in vitro* neste mecanismo, são referidos resultados sugerindo que, em condições *in vitro*, a inibição do ciclo de Calvin por “feedback” dos açúcares tem como resultado um fluxo de elétrons excessivo nas membranas dos tilacoides que provocam então fotoinibição e fotooxidação (Cappellades et al., 1991; Dubé e Vidaver, 1992; Huylenbroeck et al., 1995).

Lees et al. (1991) em *Clematis* ‘The President’, referem que apesar de se assistir a um significativo aumento na capacidade fotossintética das folhas persistentes na primeira semana de aclimatização, quase o dobro do que as folhas apresentavam quando *in vitro*, estas continuam a apresentar capacidades de fotossíntese limitadas. Aqueles autores sugerem que uma possível inibição pela sacarose possa permanecer ainda evidente neste tipo de folhas. Em *Rubus idaeus* verificou-se que a quantidade de CO₂ incorporada por folhas persistentes, um mês após a sua saída do meio de cultura se mantinha inalterável podendo mesmo apresentar, momentaneamente, um balanço negativo (Donnelly e Vidaver 1984), resultado que nos nossos ensaios apenas registámos até ser atingido o ponto de compensação para a luz. Aqueles autores referem ainda que as folhas persistentes constituíam cerca de 30% do total da área foliar embora fossem responsáveis por menos de 10% do CO₂ incorporado. Smith et al. (1986) em *Betula platyphylla*, in-

dicam resultados semelhantes. Já em *Asparagus officinalis* e em morangueiro, Yue et al. (1992; 1993) referem que a capacidade fotossintética das folhas formadas *in vitro* é um contributo importante para o crescimento autotrófico durante o período de aclimatização.

O comportamento descrito para as folhas persistentes de castanheiro, com balanço positivo de carbono durante a aclimatização, deverá traduzir-se num importante suporte para a manutenção das condições de sobrevivência e desenvolvimento da planta, durante a fase inicial de aclimatização, isto é, na ausência de novas folhas. Deverá ter ainda especial significado nas plantas cujo desenvolvimento radicular ocorreu em condições *ex vitro* e, portanto, já em condições autotróficas, sem sacarose, período durante o qual se assiste à formação do sistema radicular. O castanheiro deverá, por isso, ser incluído dentro das espécies competentes, no que diz respeito ao comportamento das folhas persistentes.

As folhas formadas de novo (folhas dois e três), apresentaram taxas de fotossíntese aparente 3 vezes superiores às registadas para as folhas persistentes e cerca de 50% mais do que o valor apresentado pela folha um. Também a capacidade fotossintética aumentou significativamente, na ordem dos 200%, e registou-se um aumento significativo na PPF_D a que ocorre saturação para a luz. Estes aspetos traduzem uma importante melhoria da competência fotossintética das plantas após o transplante e no decorrer da aclimatização que, como se referiu, é fundamentalmente devida às folhas que se diferenciam de novo. Esta situação tem sido referida por vários autores como Donnelly et al. (1984) em *Rubus idaeus*, Grout e Millam (1985) em *Fragaria x ananassa*, Smith et al. (1986) em *Betula platyphylla* e Lees et al. (1991) em *Clematis*.

Quer a taxa de fotossíntese aparente (A) quer a taxa de fotossíntese máxima (A_{max}) mostraram ser afetadas pelo regime luminoso a que as microplantas foram submetidas durante o processo de aclimatização, sendo aqueles parâmetros influenciados positivamente pelo aumento da irradiância. Ao aumento da disponibilidade luminosa correspondeu, assim, um acréscimo das taxas de fotossíntese. Lee et al. (1985) não registaram acréscimos na taxa de fotossíntese líquida em microplantas de *Liquidambar styraciflua*, quando o nível de irradiância variou entre 50 e 150 μmol m⁻² s⁻¹, mas sim quando esses níveis variaram entre 155 e 315 μmol m⁻² s⁻¹. Também Donnelly et al. (1984) em *Rubus idaeus*, verificaram uma relação direta entre a taxa de fixação de 14CO₂, o nível de irradiância e o crescimento durante a fase de aclimatização. Em geral, acréscimos de

intensidade luminosa tendem a permitir acréscimos na atividade fotossintética. Lee et al. (1985), Kozai et al. (1988, 1990) e Dubé e Vidaver (1992) mostraram que a utilização de elevadas intensidades luminosas, próximas das 400 a 500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, provocam um incremento na atividade fotossintética.

Comparativamente às folhas de campo de plantas micropropagadas, verifica-se ainda uma diferença significativa nas taxas de fotossíntese aparente com valores de 4,5 contra 3,4 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ da folha três das plantas com enraizamento *ex vitro* e aclimatizadas a 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; a taxa de transpiração é significativamente superior; a condutância estomática apresentando valores não significativamente diferentes. Romano (1994), em plantas de sobreiro micropropagadas e após 1 mês de aclimatização, refere valores muito semelhantes, 3,5 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para a taxa de fotossíntese aparente, 1,3 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para a taxa de transpiração e 170 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para a condutância estomática. O valor registado para a taxa de fotossíntese aparente nas plantas de campo micropropagadas com um ano de idade, 4,5 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$, está muito próximo dos valores apontados por Lanteri et al. (1993) para a taxa de fotossíntese instantânea de plantas seminais de castanheiro com 3 anos de idade. Estes autores referem valores de taxa de fotossíntese aparente compreendidos entre 5,3 e 7,8 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dependendo das características do grupo de plantas analisado, e valores de condutância estomática a variarem entre 90 e 140 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Verificamos, ainda, uma certa tendência para as microplantas com sistema radicular desenvolvido *ex vitro* e aclimatizadas sob o nível de irradiância mais elevado, apresentarem valores superiores na taxa fotossintética a CO_2 saturante. Isto traduz a melhor eficiência do aparelho fotossintético desenvolvido sob condições de irradiância mais elevadas nas microplantas com enraizamento *ex vitro*. Este melhor desempenho é consequência do facto de um melhor sistema radicular ter maior capacidade de absorção de água, permitir a formação de mais tecidos produtores ('sources') e, como tal, maior quantidade de produtos que podem ser usados na fotossíntese. A importância de um sistema radicular bem desenvolvido na capacidade fotossintética e sobrevivência na aclimatização foi também referida por Mohammed et al. (1992) em plantas de *Pseudotsuga menziesii*.

Do estudo da capacidade fotossintética feita em condições não limitantes, de luz e CO_2 , constata-se que o enriquecimento da atmosfera em CO_2 resulta num acréscimo das taxas de fotossíntese. Isto mesmo tem sido indicado por outros autores, noutras espécies (Lakso et al., 1986;

Desjardins et al., 1987, 1995; Kozai et al., 1987; Faulks e Mudge, 1988), referindo no entanto que se torna indispensável proceder a um incremento na intensidade luminosa para que o tratamento com CO_2 suplementar possa ser eficiente. Nas condições experimentais dos nossos ensaios admitimos que os valores máximos de irradiância possam atingir 400 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, valor a que foi registado a saturação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bjorkman, O., 1981. Responses to different quantum flux densities. In: O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond & H. Ziegler (eds.), Responses to the Physical Environment. *Physiol. Plant Ecol. I.* Vol.12A, pp.57-107. Springer-Verlag, Berlin.
- Boardman, N.K., 1977. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 28:355-912.
- Cappellades, M., Lemeur, R., & Debergh, P., 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 25:21-26.
- Debergh, P.C. & Maene, L.J., 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort.*, 14: 335-345.
- Debergh, P.C. & Read, P.E., 1991. Micropropagation. In: P.C. Debergh & R.H. Zimmerman (eds.), *Micropropagation, Technology and Application*, pp. 1-13. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht.
- Desjardins, Y., Gosselin, A. & Yelle, S., 1987. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO_2 -enriched environments and supplementary lighting. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 112:846-851.
- Desjardins, Y., Hdider, C. & de Riek, J., 1995. Carbon nutrition *in vitro* - regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In: J. Aitken-Christie, T. Kozai, & M.L. Smith (eds.), *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, pp. 441-471. Kluwer Academic Pub., Dordrecht.
- Díaz-Pérez, J.C., Shackel, K.A. & Sutter, E.G., 1995. Effects of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120(3):435-440.
- Donnelly, D.J. & Vidaver, W.E., 1984b. Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. *J. Amer. Hort. Soc. Sci.*, 109:177-181.
- Donnelly, D.J., Vidaver, W.E. & Colbow, K., 1984. Fixation of ^{14}C in tissue cultured red raspberry prior and after transfer to soil. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 4:43-50.
- Dubé, S.L. & Vidaver, W., 1992. Photosynthetic competence of plantlets grown *in vitro*. An automated system for measurement of photosynthesis *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 84:409-416.
- Grout, B.W.W., 1988. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro*, and the stresses of transplanting. *Acta Hort.*, 230:129-135.
- Grout, B.W.W. & Aston, M.J., 1977a. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort. Res.*, 17:1-7.
- Grout, B.W.W. & Millam, S., 1985. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Ann. Bot.*, 55:129-131.
- Huylenbroeck, J.M., Huygens, H. & Debergh, P.C., 1995. Photoinhibition during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum 'Petit'* plantlets. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 31:160-164.

- Kozai, T., Koyama, Y. e Watanabe, I., 1988. Multiplication of potato plantlets in vitro with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. *Acta Hort.*, 230:121-127.
- Kozai, T., Oki, H. e Fujiwara, K., 1990. Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22:205-211.
- Kramer, P.J., 1983. *Water Relations of Plants*. Academic Press, New York. 500 pp.
- Lakso, A.N., Reisch, B.I., Mortensen, J. e Roberts, M.H., 1986. Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of *in vitro*-propagated grapevines after transfer from culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 111:634-638.
- Lanteri, M., Cherubini, M., Cona, A., Villani, F. e Brugnoli, E., 1993. Variations of carbon isotope discrimination and leaf photosynthesis among populations of *Castanea sativa* Mill. Proceedings of the International Congress on Chestnut, pp. 111-114. Spoleto, Italy.
- Lee, N., Wetzstein, Y. e Sommer, H.E., 1985. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiol.*, 78:637-641.
- Lees, R.P., Evans, E.H. e Nicholas, J.R., 1991. Photosynthesis in *Clematis*, "The President", during growth *in vitro* and subsequent *in vivo* acclimatization. *J. Exp. Bot.*, 42:605-610.
- Lichtenthaler, H.K., 1981. Adaptation of leaves and chloroplasts to high quanta fluence rates. In: G. Akoyunoglou (ed.), *Photosynthesis*. Vol. 6, Proc. of 5th Int. Congress, pp. 273-289.
- MacKinney, G., 1941. Absorption of light by chlorophyll solution. *J. Biol. Chem.*, 140:315-322.
- McClelland, M., Smith, M. e Carothers, Z., 1990. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on the subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23:115-123.
- Mohammed, G.H., Gillies, S.L. e Vidaver, W.E., 1992. *Ex vitro* photosynthetic activity in plantlets of tissue-cultured Douglas-fir. *Tree Physiology*, 10:403-410.
- Mohammed, G.H. e Vidaver, W.E., 1991. Plantlet morphology and the regulation of net water loss in tissue-cultured Douglas fir. *Physiol. Plant.*, 83:117-121.
- Reuther, G., 1991. Stimulation of the photoautotrophy of *in vitro* plants. *Acta Hort.*, 300:59-75.
- Romano, A. 1994. Estudos *in vitro* em *Quercus suber* L.: micropropagação, micorrização e conservação. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências da Uni. de Lisboa. 281 pp.
- Smith, M.A.L., Palta, J.P. e McCown, B.H., 1986. Comparative anatomy and physiology of micropropagated, seedling and greenhouse-grown asian birch. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 111:437-442.
- Van Telgen, H., Van Mil, A. e Kunneman, B., 1992. Effect of propagation and rooting conditions on acclimatization of micropropagated plants. *Acta Botanica Neerlandica*, 41:261-267.
- Yue, D., Desjardins, Y., Lamarre, M. e Gosselin., 1992. Photosynthesis and transpiration of *in vitro* cultured asparagus plantlets. *Scientia Hort.*, 49:9-16.
- Yue, D., Gosselin, A. e Desjardins, Y., 1993. Re-examination of photosynthetic capacity of *in vitro*-cultured strawberry plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118:419-424.
- Ziv, M., 1986. *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: L.A. Withers, e P.G. Anderson (eds.), *Plant Tissue and Agricultural Applications*, pp. 187-196. Butterworths, London.



Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior Agrária

MESTRADO FRUTICULTURA INTEGRADA