



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

SAMIRA RANGEL DO PRADO FRADE

ANATOMIA FOLIAR COMPARADA DE JEQUITIBÁ-ROSA (*Cariniana legalis*) CULTIVADA *IN VITRO* E *EX VITRO*

Prof.^a. Dra. EVÂNIA GALVÃO MENDONÇA
Orientadora

SEROPÉDICA, RJ
FEVEREIRO – 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

SAMIRA RANGEL DO PRADO FRADE

ANATOMIA FOLIAR COMPARADA DE JEQUITIBÁ-ROSA (*Cariniana legalis*) CULTIVADA *IN VITRO* E *EX VITRO*

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Prof.^a Dra. EVÂNIA GALVÃO MENDONÇA
Orientadora

Prof.^a Dra. VANESSA CRISTINA STEIN
Coorientadora

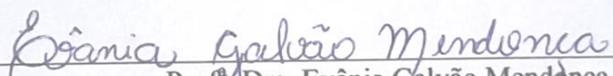
SEROPÉDICA, RJ
FEVEREIRO – 2017

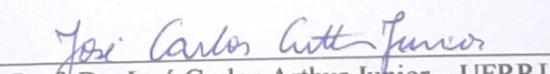
ANATOMIA FOLIAR COMPARADA DE JEQUITIBÁ-ROSA (*Cariniana legalis*) CULTIVADA IN VITRO E EX VITRO

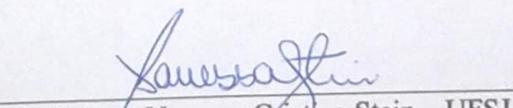
SAMIRA RANGEL DO PRADO FRADE

Monografia aprovada em 06 de Fevereiro de 2017.

Banca Examinadora:


Prof.^a / Dra. Evânia Galvão Mendonça
Orientadora


Prof. Dr. José Carlos Arthur Junior – UFRRJ
Membro


Prof.^a Dra. Vanessa Cristina Stein – UFSJ
Membro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meu avô Jorge Carvalho do Prado (*in memoriam*), aos meus pais Nívia e Valdenio e a meu irmão Pedro.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e de todos gostaria de agradecer á Deus por toda vitória concedida desde o ingresso nesta instituição, às batalhas vencidas, aos livramentos e toda felicidade concedida a mim.

Agradeço a esta Instituição de Ensino (UFRRJ) por toda estrutura, suporte e conhecimentos adquiridos, sem dúvida uma universidade de formação de bons profissionais e melhores seres humanos.

Agradeço a meus pais, Nívia e Valdenio, sem eles nada disso seria possível, vocês são a razão de eu existir e por estar aqui hoje. Obrigada pela educação e apoio em todos os momentos.

Agradeço em particular o engenheiro florestal mais lindo deste Brasil, Renan Gilberto da Silva Carvalho, amigo, parceiro, confidente, obrigada meu “namorado” por estar sempre ao meu lado, na alegria e na tristeza, pelos sermões, pela paciência e apoio até este momento, com você tudo foi mais fácil e feliz.

Agradeço a toda minha família que sempre estiveram me apoiando e me deram assistência, família é tudo e toda essa conquista é por vocês. Em especial aos meus avós queridos, João Frade, Helena Frade, Adelaide Rangel e Jorge Prado vocês são meu espelho.

Agradeço a todos os professores, os quais cada um de uma forma especial transmitiu seus ensinamentos e experiências e me deram assistência quando precisei.

Em especial agradeço a minha querida orientadora Evânia Galvão, que desde o início me fez empolgar com área de estudo, excelente profissional, ótima orientadora, amiga e sorridente sempre, obrigada por toda ajuda, saiba que você é um exemplo pra mim.

Agradeço aos queridos colegas do laboratório de biotecnologia, Ana Carolina Davis, Thais Amorim e Thiago Tito por toda ajuda na elaboração deste trabalho, pela parceria e trabalho em equipe.

Agradeço aos queridos colegas da turma 2011-II, sempre que pode estávamos unido, cada um de uma forma particular de ser, diferentes personalidades, as quais juntas formavam uma só família. As minhas queridas “abigas” Anna Luiza Sousa, Clara Maria Rangel, Carla Martins, Flávia Vinhas, Laura Pantaleão e Suênia Cristina. E aos queridos “abigos” Allan Charles, Gabriel (Gabrié), Darlan Teodoro, Bernardo Larsen, Ruy Cassiano e Alexandre Padi-lha.

Agradeço aos parceiros do alojamento M331, melhores momentos, melhores comidas e “gordices”, melhores filmes e acima de tudo melhores irmãos, obrigada por sempre poder contar com vocês, vocês foram minha família nesta fase da vida. Obrigada Robson (Binho), Taciano (Panguá), Anderson (Bode), Willis (Guri), Elionai (Léo), Leydiane (Leydi), Paloma, Julinha, Julinha do Binho, Esther (Esthersinha), Danielle (Danipeixe) e Pedro (Pedinho meu maninho).

Agradeço aos amigos caiçaras pela amizade mantida mesmo a distância, em especial minhas melhores amigas Jéssica Suguimoto e Thays Angélica. E também as melhores treinadoras de ginástica rítmica que de certa forma contribuíram e muito na formação da pessoa que sou hoje, obriga Jerusa e Joyce Suguimoto.

Por fim, e não menos importante agradeço a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para minha formação.

RESUMO

Considerando a importância de conservação da *Cariniana legalis* (jequitibá-rosa) aliado às amplas possibilidades de uso e de comercialização, este trabalho teve como objetivo comparar as estruturas anatômicas foliares de plantas cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. Para as avaliações anatômicas foram utilizadas folhas das plântulas do cultivo *in vitro* mantidas 15 dias em câmara B.O.D. com temperatura de 25°C e ausência de luz, das plântulas transferidas para sala de crescimento com 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $35 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$, onde permaneceram por 15 dias, das plântulas em bom estágio de desenvolvimento as quais foram selecionadas e transferidas para as condições de aclimatização utilizando sacos plásticos transparentes e em casa de sombra com substrato comercial Mecplant[®], onde permaneceram por 21 dias e folhas de plantas cultivadas *ex vitro*. O estudo anatômico foi realizado a partir de fotomicrografias de seções transversais e paradérmicas das folhas, analisado em microscópico e mensurado os tecidos da epiderme adaxial e abaxial, parênquima paliçádico e lacunoso, mesofilo, limbo foliar, nervura central, diâmetro polar e equatorial dos estômatos e densidade estomática através, do software AxionVision. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey. As estruturas foliares de jequitibá-rosa apresentam organização dorsiventral, epidermes uniestratificadas, hipostomática e os estômatos do tipo anomocíticos. Folhas do cultivo *ex vitro*, em comparação aos cultivos *in vitro*, apresentaram maior espessura da epiderme adaxial e nervura central e presença de esclerênquima. Em folhas oriundas do cultivo *in vitro*, observou-se maior espessura do limbo foliar, estômatos maiores e em maior número, porém menos funcionais que os estômatos das folhas do cultivo *ex vitro* e da planta aclimatizada. As plantas de jequitibá-rosa demonstram ter plasticidade para se adaptar as variações de irradiância de luz, umidade e temperatura nas condições de ambiente a qual foram submetidas, fato este de grande importância para um bom desenvolvimento *ex vitro*.

Palavras-chave: Micropropagação, cultura de tecidos, espécies nativas.

ABSTRACT

Considering the importance of conservation of *Cariniana legalis* coupled with ample possibilities of use and marketing, the objective of this work was to perform the *in vitro* cultivation of this species and compare the anatomical structures leaves with plants grown in a vegetation house. For the evaluations were used leaves of seedlings of *in vitro* cultivation kept 15 days in house B.O.D. with temperature of 25°C and absence of light, of seedlings transferred to growth room at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, photoperiod of 16 hours and irradiance of $35 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$, where they remained for 15 days, seedling emergence in good stage of development which were selected and transferred to the conditions of acclimatization using plastic bags are transparent and in a shade house with commercial substrate Mecplant®, where they remained for 21 days and leaves of plants cultivated *ex vitro*. The anatomical study was made from photomicrographs of transversal sections and paradermics leaves, examined in microscopic, and the measured adatial and abbatial epiderms tissue, palisade and sponges parenchyma, mesophly, largest in limb, central nervure, polar and equatorial diameter of stomata and stomatal density through software AxionVision. The data were subjected to analysis of variance and means were compared by the Tukey test. The leaf structures of *Cariniana legalis* feature dorsiventral organization, uniseriate epidermis hipostomatic, and the stomate of type anomocytic. Leaves of cultivation in a greenhouse, in comparison to the cultures *in vitro*, showed greater thickness of the adatial epidermis and central nervure and presence of sclerenchyn. Sheets from the *in vitro* cultivation, increased thickness of the largest in limb, stomata larger and in greater numbers, but less functional that the stomata of the leaves of the *ex vitro* and plant cultivation climatized. The plants of *Cariniana legalis* demonstrated plasticity to adapt the variations of irradiance of light, humidity and temperature in the environmental conditions to which they were subjected, this fact of great importance for a good development *ex vitro*.

Key words: Micropropagation, tissue culture, native species.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Caracterização geral da família botânica Lecythidaceae	2
2.2. Descrição da espécie	3
2.3. Propagação de espécies florestais nativas	4
2.4. Influência das condições de ambiente na micropropagação de espécies florestais	5
2.5. Aspectos da anatomia foliar de plantas micropropagadas	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. Cultivo <i>in vitro</i> de jequitibá-rosa	8
3.2. Cultivo <i>ex vitro</i>	11
3.3. Coleta das amostras de folhas	12
3.4. Análise anatômica	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1. Estabelecimento das plântulas de jequitibá-rosa <i>in vitro</i>	14
4.2. Anatomia foliar comparada de plântulas do cultivo <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i>	15
4.2.1. Espessura dos tecidos da epiderme adaxial e abaxial	15
4.2.2. Espessura do parênquima paliçádico, lacunoso e mesofilo	17
4.2.3. Espessura do limbo foliar e nervura central	18
4.2.4. Densidade, diâmetro polar e equatorial dos estômatos	20
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
6. CONCLUSÕES	22

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
ANEXOS	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espessura média dos tecidos da epiderme adaxial e abaxial de <i>Cariniana legalis</i> nos diferentes tratamentos.	17
Tabela 2. Espessura média do mesofilo, parênquima paliçádico e lacunoso de <i>Cariniana legalis</i> nos diferentes tratamentos.....	18
Tabela 3. Espessura média do limbo foliar e nervura central de <i>Cariniana legalis</i> nos diferentes tratamentos.....	19
Tabela 4. Média da densidade, diâmetro polar e equatorial e relação DP/DE dos estômatos das folhas de <i>Cariniana legalis</i> nos diferentes tratamentos.	20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplar adulto (A), detalhes das flores (B), frutos e sementes (C) de Jequitibá-rosa (Fotos: site GlobalTree).3
- Figura 2.** Material utilizado dentro da câmara de fluxo laminar para o procedimento da assepsia e inoculação das sementes de jequitibá-rosa em meio de cultura. 8
- Figura 3.** Sementes de jequitibá-rosa inoculadas em meio de cultura WPM e armazenadas em câmara B.O.D. na ausência de luz.9
- Figura 4.** Plântula de jequitibá-rosa proveniente do cultivo *in vitro*, selecionada para ser aclimatizada em viveiro. A escala na imagem corresponde a 1 cm. 10
- Figura 5.** Método utilizado com saco plástico e elástico para realizar a aclimação das plantas de jequitibá-rosa cultivadas *in vitro*. 10
- Figura 6.** Muda de jequitibá-rosa produzida no viveiro florestal do Instituto de Florestas da UFRRJ, detalhes das folhas que foram coletadas para amostra. 11
- Figura 7.** Amostras de folhas de jequitibá-rosa coletadas e armazenadas em tudo Falcon contendo álcool 70% e embrulhadas com papel alumínio. 12
- Figura 8.** Micrótopo semiautomático SLEE onde foram realizadas as secções transversais .13
- Figura 9.** Microscópio trinocular MOTIC com sistema de captura Moticam e software de análise de imagens Motic Image plus 2.0. onde foram fotografadas as folhas em lâminas.....14
- Figura 10.** Fotomicrografias de secções transversais do limbo foliar (10 X) de jequitibá-rosa cultivadas em câmara B.O.D. (A), sala de crescimento (B), aclimação em casa-de-sombra (C) e *ex vitro* (D). As setas indicam os estômatos na fase abaxial da folha. Epiderme Adaxial (EAD). Epiderme Abaxial (EAB). As barras nas figuras correspondem a 10 µm. 16

Figura 11. Fotomicrografia de corte transversal objetiva (10x) do limbo foliar de *Cariniana legalis*. Detalhe da constituição do mesofilo. Parênquima Paliçádico (PP). Parênquima Lacunoso (PL). 17

Figura 12. Secções transversais da nervura central de folhas de *Cariniana legalis* cultivadas *in vitro* (A) e em *ex vitro* (B), evidenciando o xilema (XIL), o floema (FLO) e a presença do esclerênquima (ESC). As barras correspondem a 10 µm. 19

Figura 13. Fotomicrografia da secção paradérmica demonstrando o tipo anomocíticos dos estômatos encontrados nas folhas de *Cariniana legalis* em todas as condições de ambiente avaliadas. Diâmetro Polar (DP). Diâmetro Equatorial (DE). 21

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Cariniana legalis* (Martius) Kuntze (jequitibá-rosa) pertencente à família botânica Lecythidaceae e está presente nas regiões tropicais, principalmente na América do Sul. Devido à alta qualidade de sua madeira, esta espécie é amplamente utilizada na construção civil, móveis, tabuados em geral, compensados, cabos de vassoura, confecção de lápis e demais materiais de base madeireira. Da casca são extraídos resina e tanino, utilizados na medicina popular, além de possuir potencial para uso na recuperação de áreas degradadas, paisagismo e arborização urbana. Em decorrência da exploração desordenada e sem plantio de reposição, a *Cariniana legalis* foi inserida na lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçada de extinção (RÊGO, 2001).

Atualmente a principal forma de propagação desta espécie é via seminal, porém suas sementes são recalcitrantes e à medida que se aumenta o tempo de armazenamento, a partir do 30º dia após a colheita, a viabilidade delas diminui significativamente, situação que limita a disponibilidade de mudas (HERNANDEZ et al., 2013).

Considerando a importância de conservação dessa espécie aliada às amplas possibilidades de uso e de comercialização, a propagação vegetativa surge como alternativa para a produção de mudas. Dentre os métodos de propagação vegetativa, as técnicas de cultivo *in vitro* com espécies lenhosas vêm sendo utilizadas com sucesso em vários trabalhos (ALFENAS et al., 2004).

A cultura de tecidos é uma técnica que oferece várias vantagens, dentre elas a multiplicação de clones, propagação de transgênicos e de espécies de interesse econômico de maneira a preservar as florestas naturais (NEHRA et al., 2005). A micropropagação tem sido utilizada para propagar algumas espécies florestais nativas e para estabelecer matrizes para produção de sementes. Já houve êxito na propagação *in vitro* de espécies lenhosas tropicais, como no caso de *Tectona grandis*, *Dalbergia sp.* e *Swietenia macrophylla* (MERKLE & NAIRN, 2005). Entretanto, para a espécie jequitibá-rosa ainda não há estudos utilizando este tipo de técnica de propagação vegetativa.

Apesar do potencial de uso da técnica de cultura de tecidos para espécies lenhosas, as condições deste tipo de cultivo podem ocasionar degeneração metabólica e desorganização morfológica. Desta forma, entender a estrutura básica de uma planta ou órgão é essencial para compreender o desenvolvimento adaptativo do vegetal cultivado (CASTRO, 2002).

De acordo com Preece e Compton (1991), a elevada umidade relativa, a baixa irradiância no ambiente *in vitro*, o acúmulo de etileno e à elevada concentração de sacarose no meio de cultura são os principais fatores que atuam na indução de alterações e funcionalidade de órgãos e tecidos, levando-os à incapacidade de controle de perdas de água quando estas são submetidas a condições adversas, como o ambiente em campo ou casa de vegetação. Essa desorganização morfológica de plantas cultivadas *in vitro* podem influenciar processos metabólicos e fisiológicos, associados, principalmente à fotossíntese e à transpiração (FIDELIS, 1998).

As condições impostas no cultivo *in vitro* consistem em um dos principais responsáveis pela elevação na densidade de estômatos, acompanhada da reduzida capacidade de fechamento dos ostíolos (HAZARIKA, 2006). Para esse autor, o reduzido controle estomático e a alta frequência de estômatos têm sido considerados as principais causas da rápida dissecação das plantas durante a fase de aclimatização.

Desta forma, analisar os aspectos da anatomia foliar de plantas micropropagadas é de grande importância para entender o desenvolvimento dos tecidos e das estruturas adaptativas, principalmente durante a fase de aclimatização, a qual se caracteriza por uma elevada mortalidade, muitas vezes inviabilizando o cultivo *in vitro* de algumas espécies (MARTINOTTO, 2004).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo realizar o estudo comparativo das estruturas anatômicas das folhas de jequitibá-rosa oriundas de diferentes fases do cultivo *in vitro* e *ex vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Caracterização geral da família botânica Lecythidaceae

A família botânica Lecythidaceae apresenta distribuição nas regiões tropicais de planície e atinge sua maior diversidade de espécies nos neotrópicos, em florestas chuvosas, principalmente na América do Sul, possuindo cerca de 400 espécies dentro de 20 gêneros. No Brasil, está representada por uma média de 13 gêneros e 150 espécies, amplamente distribuídas, principalmente na região Norte (MORI, 1990). São representadas por árvores, ocasionalmente arbustos ou lianas que apresentam folhas alternas e espiraladas, frequentemente agrupadas no ápice dos ramos. Possui flores bissexuais e frutos do tipo cápsula, frequentemente duro e

grande, com um opérculo. A maioria das espécies desta família fornece madeira de boa qualidade, além de sementes comestíveis e algumas são cultivadas como plantas ornamentais, principalmente plantas arbóreas (WALTER et al., 2009).

2.2. Descrição da espécie

A espécie *Cariniana legalis* (Martius) Kuntze (Figura 1), vulgarmente conhecida como jequitibá-rosa, jequitibá-grande, jequitibá-cedro, pau-caixão e pau-carga, pertence à família Lecythidaceae, é uma árvore heliófita, característica da floresta latifoliada semidecídua, comumente com 30 a 50 m de altura e 70 a 100 cm de diâmetro. É encontrada nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul, tanto na floresta pluvial atlântica como na latifoliada semidecídua da bacia do Paraná (LORENZI, 2002).

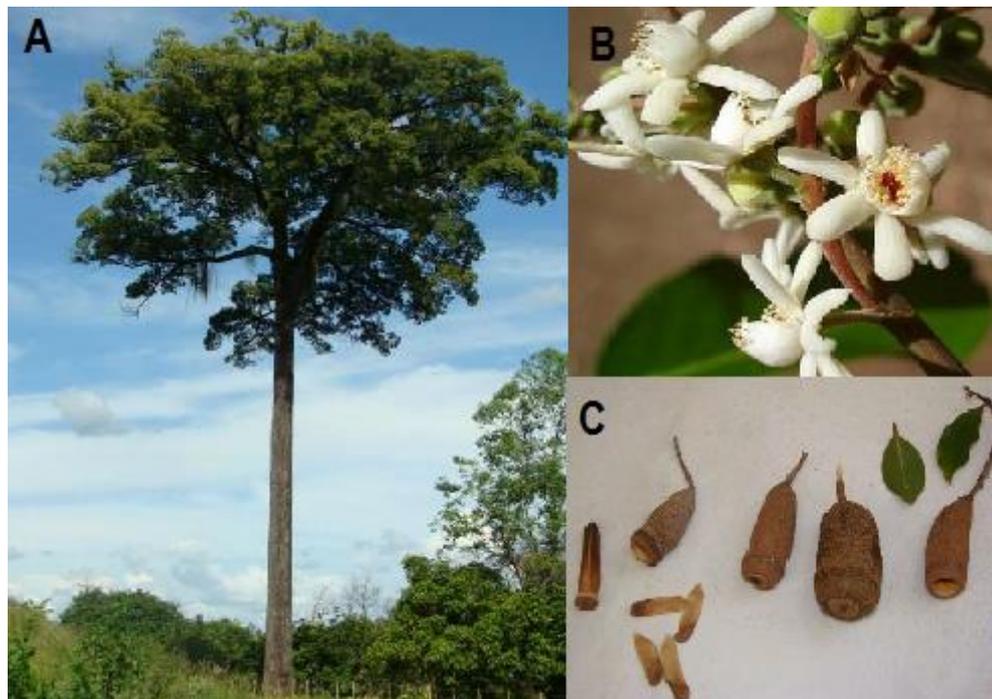


Figura 1. Exemplar adulto (A), detalhes das flores (B), frutos e sementes (C) de Jequitibá-rosa (Fotos: site GlobalTree).

A floração ocorre em períodos diversos, conforme a latitude, geralmente de dezembro a fevereiro. A frutificação se inicia ao redor dos 20 anos de idade, em plantio, e a dispersão das sementes é anemocórica (pelo vento), ocorrendo entre agosto a setembro. Suas flores

apresentam potencial apícola e suas sementes são usadas na dieta de animais, além de indicadas para reflorestamento em locais livres de inundação (RÊGO, 2001).

Sua madeira é utilizada para construção civil, obras internas, móveis, confecção de brinquedos, salto de calçados, lápis, cabos de vassouras, etc. A árvore é exuberante e ornamental, podendo ser empregada no paisagismo de parques e praças públicas. Apresenta baixa resistência ao ataque de organismos xilófagos, quando exposta em condições adversas. Como planta tolerante à luz direta é excelente para plantios mistos em áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1998).

O jequitibá-rosa está na lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçada de extinção, categoria vulnerável, em decorrência da exploração desordenada e sem plantio de reposição. Apesar da importância dessa espécie, são escassos os trabalhos de pesquisa em que foram relatadas as características morfológicas básicas dos propágulos, dos processos de germinação e estudos dos aspectos silviculturais e autoecológicos que demonstrem seu potencial em programas de reflorestamento ou de regeneração (RÊGO, 2001).

2.3. Propagação de espécies florestais nativas

A exploração indiscriminada das florestas nativas tem levado muitas espécies e, até mesmo populações nativas ao risco de extinção (SOUSA & AGUIAR, 2012). Dessa forma, são essenciais estudos visando o aperfeiçoamento de técnicas de multiplicação em larga escala de espécies nativas para aplicação em plantios homogêneos, recuperação de áreas degradadas, melhoramento genético e conservação de germoplasma (OLIVEIRA et al., 2013).

A propagação da maioria das espécies florestais nativas é realizada via seminal, principalmente, devido à ausência de informações silviculturais destas espécies e pela maior facilidade operacional e menores custos de produção que o método apresenta (DIAS et al., 2012). No entanto, há problemas quanto a este método de propagação para várias espécies florestais nativas devido à baixa porcentagem de germinação, longo período para germinar, dificuldades de obtenção e de coleta de sementes em quantidade suficiente, recalcitrância das sementes e inviabilidade de armazenamento, aliados ao desconhecimento sobre a fenologia das espécies florestais nativas, fatores que acarretam em longo período de tempo para a produção da mudas (OLIVEIRA et al., 2013).

Segundo dados do Serviço Florestal Brasileiro (2012) no Brasil há cerca de 7.880 espécies florestais arbóreas. Apesar desse elevado, o número das pesquisas em relação a micropropagação de espécies florestais nativas ainda são reduzidas. No entanto, deve-se considerar a importância destes trabalhos, os quais podem contribuir significativamente para a produção comercial de espécies de elevado interesse, possibilitando sua multiplicação rápida em larga escala e em curto espaço de tempo. Dentre os principais problemas existentes na micropropagação, ressalta-se a recalcitrância de várias espécies nativas ao cultivo *in vitro* e a contaminação por microrganismos (tanto exógena quanto endógena), representando limitações ao estabelecimento das culturas em condições *in vitro* (XAVIER et al., 2013). Além disso, as respostas das plantas às técnicas de micropropagação são variáveis, e dependem da espécie, variedade e/ou cultivar, época de coleta, tipo de explante utilizado e condições de cultivo (WENDLING et al., 2006).

A propagação *in vitro* pode constituir uma alternativa em relação aos métodos clássicos de propagação de espécies florestais nativas, pois além de oferecer a possibilidade de propagação de árvores selecionadas, possibilita a limpeza clonal de plantas livres de contaminação por micro-organismos, superando problemas de contaminação patogênica (WENDLING et al., 2006). Para diversas espécies florestais têm-se obtido resultados que indicam a possibilidade de produção, num curto espaço de tempo, de grandes quantidades de novas plantas a partir de um único explante, por meio da cultura de tecidos (XAVIER, 2007).

Atualmente a propagação de jequitibá-rosa no Brasil é feita por sementes, situação que limita a disponibilidade de suas mudas e o desenvolvimento de seus povoamentos. A técnica de micropropagação a partir de cultura de tecidos surge como alternativa para a produção de mudas dessa espécie, o que permite a implantação de povoamentos comerciais ou para outros fins. A utilização desta técnica com espécies florestais, associada a programas de melhoramento, tem como finalidades acelerar o crescimento, aumentar a produtividade e gerar madeira de qualidade e homogênea, pela multiplicação de plantas selecionadas (ALFENAS et al., 2004).

2.4. Influência das condições de ambiente na micropropagação de espécies florestais

O estabelecimento e a multiplicação de uma determinada espécie vegetal *in vitro* dependem da combinação adequada de variáveis que, sujeita à influência de diversos fatores,

proporciona o sucesso da propagação para cada espécie. As concentrações dos sais e dos reguladores de crescimento nos meios de cultura, bem como a temperatura e fotoperíodo, são os fatores que mais variam entre as técnicas utilizadas para a micropropagação. Outras variáveis como a utilização de agentes geleificantes no meio de cultura, o tamanho dos frascos e os tipos de tampa empregadas no fechamento dos recipientes, podem influenciar no desenvolvimento de algumas plantas (SOUZA et al., 1999).

Segundo Read e Fellman (1985), um dos maiores obstáculos à aplicação prática da cultura de tecidos na propagação de plantas é a dificuldade de transferir com sucesso as mudas da condição *in vitro* para a aclimatização em casa de vegetação e para o campo, devido à grande diferença entre as condições ambientais. O sucesso dessa etapa depende da qualidade das plantas provenientes da fase *in vitro*.

As espécies arbóreas variam grandemente na sua capacidade de responder à alteração na disponibilidade de luz. A luz influencia a anatomia foliar tanto no estágio inicial de desenvolvimento quanto no adulto, uma vez que a folha é um órgão dotado de plasticidade e sua estrutura interna permite adaptar-se a determinadas condições de luz no ambiente (NERY, 2007).

Para HAZARIKA (2006), a baixa intensidade de luz usada durante o cultivo *in vitro*, aliada ao acúmulo de etileno e à elevada concentração de sacarose no meio de cultura são os principais responsáveis pela elevação na densidade de estômatos acompanhada da reduzida capacidade de fechamento dos ostíolos. Para esse autor, o reduzido controle estomático e a alta frequência de estômatos têm sido considerados as principais causas da rápida dissecação das plantas durante a fase de aclimatização.

Com relação à parte aérea, plantas que apresentam alguma toxidez causada por meios de cultivo *in vitro* suplementados com fitorreguladores, tais como, citocinina e auxina, bem como deficiência nutricional tendem a apresentar senescência foliar, comprometendo a sobrevivência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Poucas são as informações sobre como a anatomia de órgãos vegetativos, principalmente de plantas micropropagadas, é afetada pelas condições ambientais de cultivo ou como a anatomia das plantas transplantadas é modificada durante a aclimatização. A avaliação da mudança estrutural que ocorre durante a aclimatização é necessária para a compreensão deste processo de adaptação, sendo essencial para o desenvolvimento de um protocolo eficiente de micropropagação (FRÁGUAS, 2003).

2.5. Aspectos da anatomia foliar de plantas micropropagadas

O ambiente em que a espécie se desenvolve possui fatores que podem influenciar a estrutura anatômica e fisiológica das plantas (DIGNART, 2006).

Alterações na morfologia foliar podem influenciar processos metabólicos e fisiológicos, associados, principalmente, à fotossíntese e transpiração. Muitas dessas evidências indicam que a umidade relativa e as trocas gasosas durante os vários estágios da cultura de tecidos são a chave dos fatores envolvidos na desorganização morfológica de plantas cultivadas *in vitro* (FIDELIS, 1998).

A anatomia foliar em plantas micropropagadas é de grande importância para estudos comparativos do desenvolvimento de seus tecidos e estruturas adaptativas, como espessura de cutícula, disposição de células, dimensão e número de estômatos, entre outros. Esses estudos podem servir de base para pesquisas relacionadas ao desenvolvimento durante a aclimatização, a qual se caracteriza por uma elevada mortalidade, muitas vezes, inviabilizando a micropropagação de algumas espécies (MARTINOTTO, 2004).

Estudos histológicos demonstram que os órgãos vegetativos de plantas desenvolvidas *in vitro* apresentam tecidos e estruturas pouco diferenciadas, se comparados com plantas cultivadas em viveiro (BRAINERD & FUCHIGAMI, 1981).

O aumento na densidade estomática nas folhas das plantas cultivadas *in vitro*, comparado às folhas de plantas mantidas em ambiente natural, tem sido reportado em diversas espécies, estando associada, principalmente, à elevada umidade relativa no interior dos recipientes de cultivo e à reduzida intensidade de luz (KHAN et al., 2003). Aliado as condições ambientais, os altos teores de sacarose utilizados nos meios de cultivo influenciam nas trocas gasosas, provocando alterações no funcionamento dos ostíolos. Este controle osmótico de abertura e fechamento dos estômatos se faz necessário para garantir uma menor transpiração e consequentemente maior sobrevivência das plântulas micropropagadas (FRÁGUAS, 2003).

Tais alterações, geralmente, reduzem a capacidade de plantas micropropagadas sobreviverem quando transplantadas para ambiente natural, pois, nesse segundo ambiente, a planta deve ser capaz de suprir sua necessidade de energia e de carbono por meio da fotossíntese. A planta precisa também ser capaz de controlar eficientemente os processos de transpiração e de absorção de água para manter um balanço hídrico favorável ao desenvolvimento (ZOBAYED et al., 1999).

Estudar a anatomia de órgãos vegetativos das plântulas cultivadas *in vitro* pode fornecer informações para o controle da morfogênese e auxiliar no desenvolvimento e na eficiência de protocolos de micropropagação (ABBADE, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo *in vitro* de jequitibá-rosa

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Recursos Genéticos Florestais (GENFLOR), localizado no Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Foram realizados pré-testes de assepsia e tipos de meio de cultura para germinação de sementes de jequitibá-rosa *in vitro*, coletadas em Oriente, no distrito de Alegre, estado do Espírito Santo. Para a assepsia, avaliaram-se quatro tratamentos utilizando álcool comum, peróxido de hidrogênio a 10%, 20% e 30%. E os meios de cultura avaliados foram MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e Wood Plant Medium (WPM) de Lloyd & McCown (1980).

Com os resultados dos pré-testes anteriores, para assepsia e germinação *in vitro*, selecionou-se 50 sementes de jequitibá-rosa onde foram lavadas em água corrente por 10 minutos e submetidas à desinfestação, em câmara de fluxo laminar (Figura 2). As sementes foram imersas em álcool 70%, por 1 minuto, e posteriormente transferidas para solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 30%. A esta solução foram adicionadas quatro gotas de detergente de uso laboratorial, o Tween 20[®], e as sementes foram expostas à agitação por 5 minutos.



Figura 2. Material utilizado dentro da câmara de fluxo laminar para o procedimento da assepsia e inoculação das sementes de jequitibá-rosa em meio de cultura.

Após este procedimento, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada autoclavada, secas em papel filtro autoclavado e inoculadas em potes de vidro com capacidade de 250 mL, contendo 40 mL de meio de cultura WPM, o qual foi suplementado por 30 g L⁻¹ de sacarose, 1g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP) e 2,9 g L⁻¹ de Phytigel. O pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos. Em cada pote foram inoculadas cinco sementes, totalizando dez repetições. Os potes foram identificados e levados para a câmara Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.) (Figura 3), para tanto utilizou-se neste trabalho uma B.O.D. com temperatura controlada de 25 °C e ausência de luz, pois as sementes de jequitibá-rosa são fotoblásticas neutras, germinam com ou sem a presença de luz.



Figura 3. Sementes de jequitibá-rosa inoculadas em meio de cultura WPM e armazenadas em câmara B.O.D. na ausência de luz.

Diariamente, foram realizadas observações para registro da germinação e da contaminação por fungos ou bactérias.

Foram selecionadas algumas plântulas que estavam em B.O.D. e transferidas para sala de crescimento. Neste ambiente, as plântulas foram mantidas durante 15 dias sob temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 35 μmol m⁻¹ s⁻¹. Após este período, as plântulas que possuíam mínimo de 10 cm de altura, com sistema radicular e foliar bem desenvolvido foram levadas para aclimatização em casa de sombra no viveiro florestal da UFRRJ (Figura 4).



Figura 4. Plântula de jequitibá-rosa proveniente do cultivo *in vitro*, selecionada para ser aclimatizada em viveiro. A escala na imagem corresponde a 1 cm.

As plântulas selecionadas tiveram o sistema radicular lavado em água corrente, sendo posteriormente transplantadas em tubete de 110 cm³ contendo substrato comercial Mecplant® e vermiculita. Com a finalidade de manter um microclima favorável à aclimatização, os tubetes foram cobertos individualmente com saco plástico transparente no tamanho de 20 x 10 cm (Figura 5). A cada dois dias foram borrifados água dentro dos saquinhos para renovar o microclima e permitir a troca gasosa com o ambiente externo e a partir da segunda semana foi realizada um corte na extremidade do saco plástico até a retirada total que ocorreu aos 21 dias.



Figura 5. Método utilizado com saco plástico e elástico para realizar a aclimação das plantas de jequitibá-rosa cultivadas *in vitro*.

Após o período de tempo em cada uma das condições de ambiente, foram coletadas folhas de cinco plântulas para análise anatômica.

3.2. Cultivo *ex vitro*

No viveiro florestal do Instituto de Florestas da UFRRJ foi realizado o cultivo *ex vitro* do jequitibá-rosa via seminal. As sementes dessa espécie foram colocadas a 1,0 cm de profundidade em sementeiras de bandejas plásticas, contendo areia e vermiculita como substrato. Após o desenvolvimento, repicou-se as plântulas para os recipientes de saco plástico de tamanho 14x20 cm³ contendo substrato comercial Mecplant[®].

Posteriormente, os recipientes foram alocados na casa de vegetação, a fim de evitar estresse hídrico e estabelecer o crescimento inicial das mudas.

As mesmas permaneceram cerca de 15 dias neste ambiente, para depois serem realocadas na área de pleno sol para a rustificação das mudas.

Aproximadamente aos três meses após a repicagem das mudas, a fim de comparar a estrutura anatômica foliar com as demais fases de desenvolvimento das plântulas germinadas *in vitro*, foram coletadas cinco folhas, sendo uma de cada muda, completamente expandidas, para realização das análises anatômicas (Figura 6).



Figura 6. Muda de jequitibá-rosa produzida no viveiro florestal do Instituto de Florestas da UFRRJ, detalhes das folhas que foram coletadas para amostra.

3.3. Coleta das amostras de folhas

Para avaliar a estrutura anatômica, foram coletadas folhas de jequitibá-rosa, cultivadas em quatro condições ambientais diferentes: câmara B.O.D., sala de crescimento, aclimatização em casa de sombra e pleno sol no viveiro de mudas.

As plântulas cultivadas *in vitro*, foram oriundas das sementes inoculadas em meio de cultura WPM, conforme descrito no item 3.1.

A coleta das folhas das plântulas cultivadas em B.O.D., se deu aos 15 dias após a inoculação das sementes e o surgimento dos primeiros pares de folhas. Foram coletadas folhas de cinco plântulas e as demais foram transferidas para sala de crescimento. Após 15 dias nas condições de sala de crescimento, realizou-se a coleta de folhas de cinco plântulas e as demais foram selecionadas para serem aclimatizadas. As plântulas aclimatizadas tiveram suas folhas coletadas após 21 dias nestas condições de ambiente. E as folhas das mudas do cultivo *ex vitro* foram coletadas por volta dos 3 meses após semeadura em viveiro.

Ao final da coleta dos quatro tratamentos, as folhas foram armazenadas em tubo Falcon e fixadas por 48 horas em solução de FAA 70% (JOHANSEN, 1940), composta por 70% de álcool etílico, 15% de formoldeído e 15% de ácido acético e posteriormente conservado em álcool 70% (Figura 7). As amostras foram levadas para o Laboratório de Processamento de Tecidos da Universidade Federal de São João Del-Rei, Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Divinópolis-MG, onde foram realizadas as análises microscópicas das estruturas anatômicas nas seções transversais e paradérmicas das folhas.



Figura 4. Amostras de folhas de jequitibá-rosa coletadas e armazenadas em tubo Falcon contendo álcool 70% e embrulhadas com papel alumínio.

3.4. Análise anatômica

As amostras de folhas fixadas em FAA 70% foram mantidas em álcool 70% até o procedimento das análises.

Após a fixação, as amostras foram destinadas ao preparado das lâminas semipermanentes, sendo desidratada em série etílica (70, 80, 90 e 100%) por 1 hora em cada série e incluídas em solução de álcool 100% e historresina Leica[®] na proporção 1:1 (overnight). Após este processo, as lâminas foram incluídas em historresina Leica[®] pura a 37°C por 48 horas, para o emblocamento do material.

Com auxílio do micrótomo semiautomático marca *Slee* (Figura 8), os blocos foram seccionados e os cortes transversais e paradérmicos obtidos com 4 mm de espessura e posteriormente distendidos em lâmina contendo água e lamínula. Após a secagem, as lâminas foram coradas com azul de toluidina.

Os cortes corados montados em lâminas foram observados e fotografados com um microscópio trinocular da *Motic* com sistema de câmera digital acoplada do tipo Moticam e software de análise de imagens Motic Image plus 2.0. (Figura 9).

Para os cortes paradérmicos, foram utilizadas folhas inteiras e colocadas no hipoclorito de sódio 4% por 15 minutos, posteriormente transferidas para outras lâminas contendo água e lamínula.



Figura 5. Micrótomo semiautomático SLEE onde foram realizadas as secções transversais.

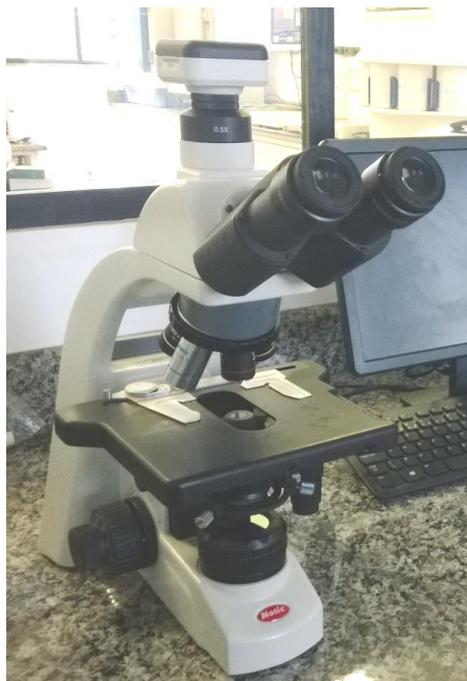


Figura 6. Microscópio trinocular MOTIC com sistema de captura Moticam e software de análise de imagens Motic Image plus 2.0. onde foram fotografadas as folhas em lâminas.

As fotomicrografias foram utilizadas para as medições das estruturas anatômicas através do software de análise de imagens *Axion Vision 4.8*. calibrado com régua microscópica fotomicrografada nos mesmos aumentos.

Foram mensuradas em três pontos distintos das imagens dos cortes transversais a espessura dos seguintes tecidos: epiderme adaxial e abaxial, parênquima paliçádico e lacunoso, mesofilo, nervura central e a espessura total do limbo foliar. Já nos cortes paradérmicos, foram contabilizados o número total de estômatos em cada fotomicrografia e mensurados os diâmetros polar e equatorial de três estômatos escolhidos aleatoriamente. Todas as medidas foram feitas na escala micrométrica (μm).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estabelecimento das plântulas de jequitibá-rosa *in vitro*

Na fase do cultivo *in vitro*, das 50 sementes de jequitibá-rosa que foram inoculadas, 54% germinaram e apresentavam um bom desenvolvimento. O baixo percentual de germina-

ção pode estar relacionado ao fato da semente ser recalcitrante e estar armazenada a 4°C por um período aproximado de 8 meses. Rêgo (2004) encontrou em seus resultados sobre germinação e vigor de sementes de jequitibá-rosa sob condições de viveiro, que o pico de germinação ocorre entre 35 e 45 dias após o armazenamento em câmara fria. Após este período não foi observada germinação das sementes.

Do total de sementes de jequitibá-rosa inoculado, 4% foram contaminadas por fungo ou bactéria, sendo este valor baixo considerando a inoculação de sementes de espécies arbóreas. Silva (2014) encontrou uma média de 3,5% de contaminação em sementes de macaúba no teste de desinfestação *in vitro*, utilizando como tratamento de assepsia o peróxido de hidrogênio. Souza (2011) encontrou para a espécie guabijuzeiro, também em teste de desinfestação *in vitro*, cerca de 2 a 14% de contaminação utilizando hipoclorito de sódio como tratamento. As espécies arbóreas apresentam dificuldade para o estabelecimento *in vitro* devido à grande diversidade de micro-organismo contaminantes, principalmente se for utilizado material vegetal de indivíduos adultos (COUTO et al., 2004).

4.2. Anatomia foliar comparada de plântulas do cultivo *in vitro* e *ex vitro*

Foram observadas diferenças anatômicas entre as espessuras dos tecidos foliares, o número de estômatos e seu diâmetro polar e equatorial das plântulas cultivadas nos diferentes ambientes. Entre outros fatores, essas diferenças podem estar relacionadas à intensidade luminosa na qual as plantas foram submetidas durante o experimento, sendo a luz um fator de fundamental importância para as plantas, devido à ação direta ou indireta na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal. A luz influencia a anatomia foliar tanto nos primeiros estádios de desenvolvimento quanto na fase adulta, pois a folha é um órgão bastante plástico e as estruturas internas adaptam-se às condições de luz do ambiente (OLIVEIRA, 2009).

As diferenças encontradas neste estudo, também foram observadas por outros autores que compararam a anatomia de folhas *in vitro* e *ex vitro* de espécies lenhosas como ingá (*Inga vera*) (Soares, 2003), sangra d'água (*Croton urucurana*) (Lima, 2004) e candeia (*Eremanthus erythropappus*) (Rosal, 2004).

4.2.1. Espessura dos tecidos da epiderme adaxial e abaxial

Foi observado em todas as condições de cultivo, que tanto a epiderme adaxial quanto a epiderme abaxial são uniestratificadas e as folhas são do tipo hipostomática (Figura 10). Esta

ocorrência é comum em plantas terrestres, pois é uma forma de proteção dos estômatos a uma maior exposição luminosa (POOTER, 1999). Smith et al. (1997) afirmam que a ausência dos estômatos na epiderme superior em folhas pode ter sido necessária para prevenir danos foto-oxidativos aos cloroplastos existentes nas células-guarda, além de protegê-los do vento.

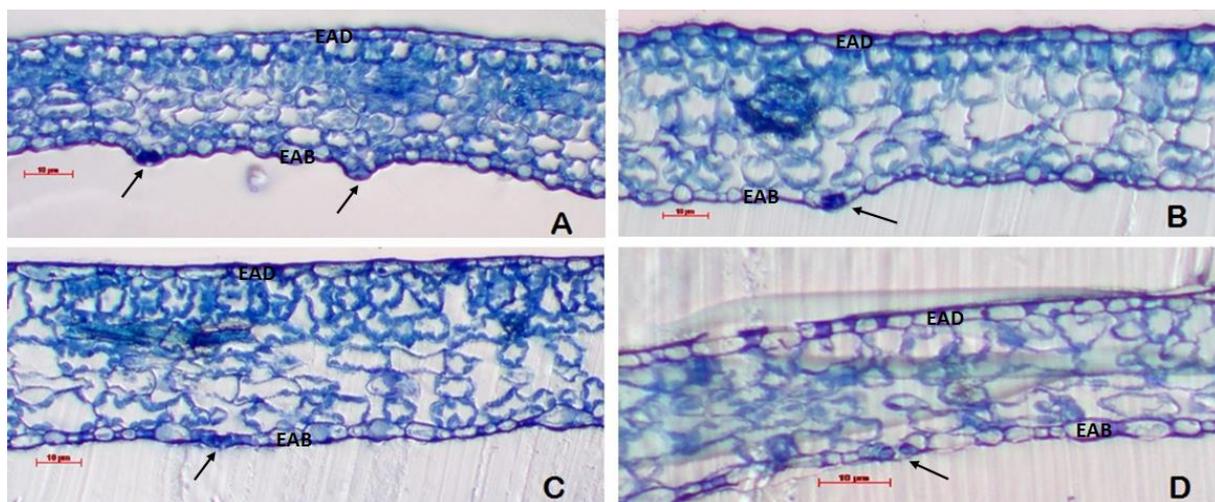


Figura 7. Fotomicrografias de seções transversais do limbo foliar, objetiva (10X), de jequitibá-rosa cultivadas em câmara B.O.D. (A), sala de crescimento (B), aclimatização em casa-de-sombra (C) e *ex vitro* (D). As setas indicam os estômatos na fase abaxial da folha. Epiderme Adaxial (EAD). Epiderme Abaxial (EAB).

Com relação à espessura das células da epiderme, houve diferença entre os tratamentos (Tabela 1). Verificou-se que nos tratamentos *in vitro* a epiderme adaxial foi menos espessa comparada com as plantas cultivadas *ex vitro*. Segundo Alquini et al. (2003) o maior espessamento da epiderme adaxial é uma característica que confere às plantas cultivadas em ambiente natural, uma proteção extra contra a ação da radiação solar. Para a epiderme abaxial, os três primeiros tratamentos apresentam maior espessura comparada à epiderme adaxial, porém este fato se inverte com as folhas *ex vitro*. Os níveis de luz influenciam significativamente na espessura dos tecidos epidérmicos, plantas cultivadas em pleno sol apresentam epiderme adaxial mais espessa que a epiderme abaxial, devido ao sombreamento das próprias folhas na face abaxial (SALGADO et al, 2012).

Tabela 1. Espessura média dos tecidos da epiderme adaxial e abaxial de *Cariniana legalis* nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Epiderme Adaxial (μm)	Epiderme Abaxial (μm)
B.O.D.	1,854 ab	2,078 ab
Sala de crescimento	1,950 a	2,514 a
Aclimatização	1,500 b	1,826 b
<i>Ex vitro</i>	2,100 a	1,810 b

*Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

4.2.2. Espessura do parênquima paliçádico, lacunoso e mesofilo

Foi observado no corte transversal, que as folhas de jequitibá-rosa, cultivadas nos diferentes ambientes, apresentam organização do mesofilo do tipo dorsiventral, ou seja, o parênquima paliçádico está próximo à epiderme adaxial e o lacunoso próximo à face abaxial (Figura 11). Esses resultados corroboram com Matta (2011), o qual encontrou em 10 espécies de Lecythidaceae o mesmo tipo de organização do mesofilo, com exceção a *Eschweilera atropetiolata* que foi classificada como isolateral.

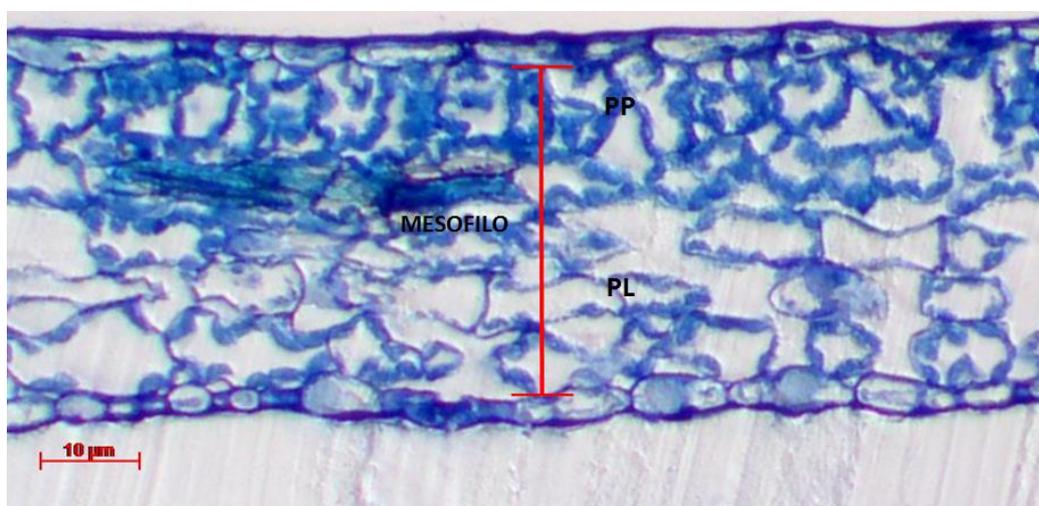


Figura 8. Fotomicrografia de corte transversal, objetiva (10x), do limbo foliar de *Cariniana legalis*. Detalhe da constituição do mesofilo. Parênquima Paliçádico (PP). Parênquima Lacunoso (PL).

Não houve diferença estatística entre os tratamentos na espessura do parênquima paliçádico (Tabela 2).

Para Castro et al. (1998), o ambiente natural e a alta intensidade luminosa proporcionam alongamento do parênquima paliçádico e conseqüentemente aumento na espessura das

folhas. Segundo observações de Fabbri, Sutter e Dunston (1986), as folhas de plantas micro-propagadas tornam-se mais espessas durante a aclimatização devido ao aumento do tamanho das células paliçádicas, e com o passar do tempo, as folhas jovens se tornam similares às aquelas crescidas em campo.

Tabela 2. Espessura média do mesofilo, parênquima paliçádico e lacunoso de *Cariniana legalis* nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Parênquima Paliçádico (μm)	Parênquima Lacunoso (μm)	Mesofilo (μm)
B.O.D.	4,013 a	15,430 a	19,443 a
Sala de crescimento	4,075 a	14,336 ab	18,411 a
Aclimatização	4,469 a	13,808 ab	18,277 a
<i>Ex vitro</i>	4,155 a	12,034 b	16,189 a

*Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

O parênquima lacunoso das folhas do cultivo em B.O.D. apresentou maior espessura comparada aos demais tratamentos. Cutter (1986) e Sert (1992) observaram que as plantas submetidas à baixa intensidade luminosa possuem maior proporção dos espaços intercelulares no tecido parenquimático lacunoso. Isto explica o fato de que as plântulas dos tratamentos *in vitro* não diferiram estatisticamente da planta *ex vitro* em espessura do mesofilo.

4.2.3. Espessura do limbo foliar e nervura central

O limbo foliar é a estrutura que mais se modifica em resposta às alterações ambientais, pois os tecidos como, epiderme e parênquima, se adaptam as essas condições, garantindo maior sobrevivência da planta naquele local. No entanto, não foi observada diferença estatística na espessura do limbo entre os tratamentos (Tabela 3). Resultados semelhantes foram observados por Nery et al. (2007), quando comparou a espessura do limbo foliar de plantas jovens de *C. brasiliense* submetidas a diferentes níveis de sombreamento e não observou diferença na espessura.

Tabela 3. Espessura média do limbo foliar e nervura central de *Cariniana legalis* nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Limbo Foliar (μm)	Nervura Central (μm)
B.O.D.	23,943 a	99,133 c
Sala de crescimento	22,936 a	92,200 c
Aclimação	22,103 a	115,596 b
<i>Ex vitro</i>	21,298 a	139,257 a

*Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

Para a nervura central, houve diferença, onde a maior espessura foi observada nas folhas do cultivo *ex vitro*.

Segundo Nery (2007), plantas cultivadas a pleno sol, a região da nervura central geralmente encontram-se bem lignificada, sendo constatado que as paredes das células dos tecidos dos eixos vasculares apresentam maiores espessuras com a redução dos níveis de sombreamento. Além disso, a idade da planta no momento da coleta das folhas também pode ter influenciado na espessura da nervura central das plantas do cultivo *ex vitro*.

Uma das diferenças observadas na nervura central das folhas cultivadas *in vitro* e *ex vitro* foi à presença do esclerênquima, que envolveu completamente os feixes vasculares das folhas *ex vitro* (Figura 12). O esclerênquima é um tecido que fica próximo ao eixo vascular, responsável por dar maior sustentação às plantas. Soares (2003), também observou essa característica ao comparar folhas de *Inga vera* (ingá) *in vitro* e *ex vitro*, e afirma que a ausência dessa estrutura em folhas micropropagadas as torna menos resistentes e com aparência mais frágil.

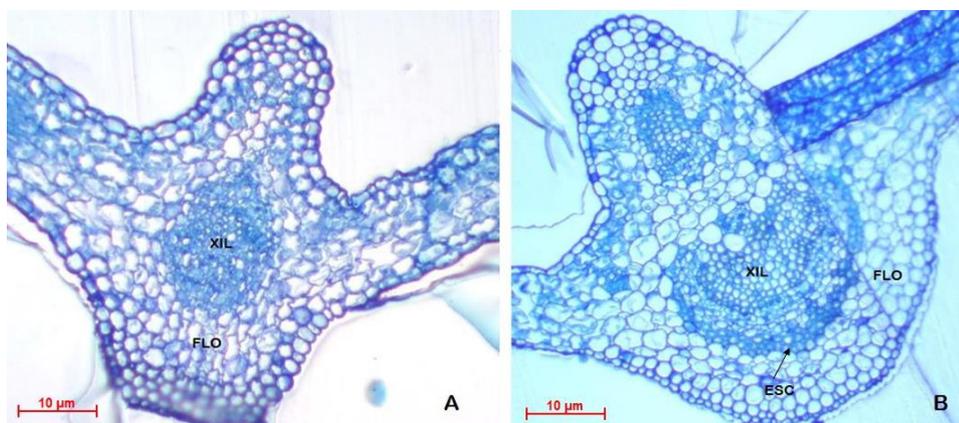


Figura 9. Secções transversais da nervura central de folhas de *Cariniana legalis* cultivadas *in vitro* (A) e em *ex vitro* (B), evidenciando o xilema (XIL), o floema (FLO) e a presença do esclerênquima (ESC).

4.2.4. Densidade, diâmetro polar e equatorial dos estômatos

Através dos cortes paradérmicos, observou-se que o número de estômatos diminuiu conforme se mudou os ambientes no cultivo *in vitro*, sendo encontrado número de estômatos semelhantes nas plântulas aclimatizadas e nas plantas cultivadas *ex vitro* (Tabela 4). A maior densidade foi observada nas plântulas do tratamento na B.O.D.

Tabela 4. Média da densidade, diâmetro polar e equatorial e relação DP\DE dos estômatos das folhas de *Cariniana legalis* nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Densidade Estomática (mm ²)	Diâmetro Polar (µm)	Diâmetro Equatorial (µm)	DP\DE
B.O.D.	8,4 a	17,202 b	15,160 a	1,165 b
Sala de crescimento	8,6 a	17,114 b	12,018 b	1,515 a
Aclimatização	6,8 a	19,760 a	16,209 a	1,207 b
<i>Ex vitro</i>	6,6 a	16,404 b	11,720 b	1,423 a

*Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

A variação no número de estômatos, provavelmente, deve ter sido proporcionada pelo microambiente gerado no cultivo *in vitro*, com alta umidade, temperatura amena e menor intensidade luminosa. Essas condições influenciam as trocas gasosas, provocando alterações no desenvolvimento estomático. Segundo Fráguas (2003) a baixa luminosidade e a troca gasosa do ambiente *in vitro*, provoca o aumento no número de estômatos, pois esses são menos funcionais que os estômatos *ex vitro*.

Para Hazarika (2006), além da intensidade luminosa, o acúmulo de etileno e à elevada concentração de sacarose no meio de cultura, são os principais responsáveis pela elevação na densidade de estômatos, acompanhada da reduzida capacidade de fechamento dos ostíolos. Para esse autor, o reduzido controle estomático tem sido considerado a principal causa da rápida dissecação das plântulas durante a fase de aclimatização.

Esses resultados corroboram com Martinotto (2004) que observou em seu estudo com *E. dysenterica*, que a densidade estomática é maior em folhas de plântulas *in vitro* do que em folhas de plantas cultivados no campo.

Foi observada uma redução no número de estômatos na fase de aclimatização das plântulas. Essa redução era de se esperar, uma vez que, um maior número de estômatos favorece a transpiração e a rápida perda de água. Provavelmente o menor número de estômatos observado nesta fase, esteja relacionado com um ajuste osmótico da planta às condições am-

bientais. Isso demonstra que as folhas de jequitibá-rosa apresentam alta plasticidade, ou seja, capacidade de se adaptar em outros ambientes. Segundo Camargo e Marengo (2011), a densidade estomática é um importante parâmetro ecofisiológico que afeta as trocas gasosas e a fotossíntese. Portanto, qualquer variação em número e/ou tamanho destes pode acarretar em maior ou menor eficiência da planta quanto à taxa fotossintética (SUN et al., 1995).

De forma geral, o tipo de estômato encontrado em todas as folhas dos diferentes tratamentos foi do tipo anomocítico, com células que circundam os estômatos em número indefinido e não diferem das outras células epidérmicas (Figura 13). Matta (2011) encontrou nas espécies *Anasimya lineata* e *Couratari tenuicarpa*, pertencentes à família botânica Lecythidaceae, o mesmo tipo estomático. Segundo esses autores, são raras as espécies de Lecythidaceae que apresentam o tipo anomocítico, uma vez que das 10 espécies investigadas apenas 2 apresentaram este tipo de estômato.

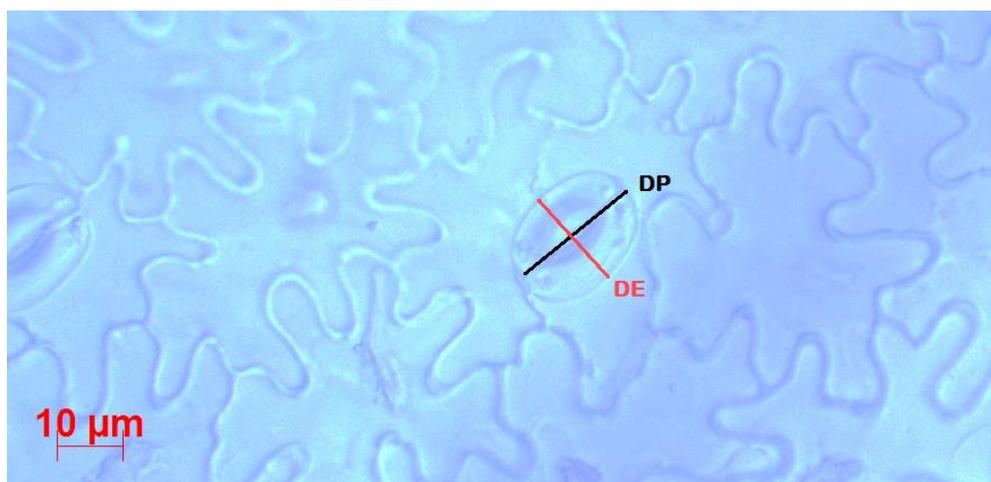


Figura 10. Fotomicrografia da secção paradérmica demonstrando o tipo anomocíticos dos estômatos encontrados nas folhas de *Cariniana legalis* em todas as condições de ambiente avaliadas. Diâmetro Polar (DP). Diâmetro Equatorial (DE).

Tanto a densidade estomática quanto as dimensões dos estômatos podem sofrer variações em folhas de plantas da mesma espécie (OLIVEIRA, 2013).

Os estômatos das plântulas no tratamento de aclimatização apresentaram maior diâmetro polar e equatorial, quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 4). Santana et al. (2008) encontrou nas folhas de *Aristolochia bahiensis*, *Aristolochia cauliflora*, *Annona glabra* e *Annona squamosa*, durante o cultivo *in vitro*, estômatos com menor diâmetro polar. Já

Abbade et al. (2009) observou que os estômatos das folhas *ex vitro* de *Tabebuia roseo-alba* possuem maior diâmetro polar comparado aos de folhas do cultivo *in vitro*.

As medidas do diâmetro polar (DP) e do diâmetro equatorial (DE) podem ser relacionadas com a funcionalidade dos estômatos pela relação entre DP/DE. Segundo Khan et al. (2003), alterações na forma dos estômatos afeta diretamente a funcionalidade dos mesmos, sendo que a forma mais elíptica é característica de estômatos funcionais, enquanto a forma mais esférica é, frequentemente, associada a estômatos com baixa funcionalidade e ambas as formas são obtidas de acordo com o maior ou menor DE .

A maior relação DP/DE foi obtida nos estômatos das folhas oriundas da sala de crescimento e *ex vitro* (Tabela 4), provavelmente isto ocorreu devido ao fato de possuírem as menores espessuras de DE, tornando-os estômatos com forma mais elíptica e, portanto mais funcionais.

Segundo Oliveira (2013), a relação entre o DE e funcionalidade dos estômatos fornece um bom indicativo do formato dos estômatos com a taxa transpiratória das plantas.

De acordo com os resultados, podemos inferir que há uma relação entre a densidade dos estômatos a sua funcionalidade, onde se observa que as folhas que apresentaram o maior número de estômatos e maior espessura de DE, foram também os menos funcionais, podendo apresentar maiores taxas de transpiração, embora não tenha sido testada essa hipótese neste trabalho.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho fazem parte de um projeto de pesquisa que visa avaliar as possíveis alterações anatômicas de três espécies nativas da Mata Atlântica (jequitibá-rosa, braúna e jacarandá-da-bahia) em diferentes meios de cultura e condições de cultivo.

Espera-se poder auxiliar na obtenção de protocolos de cultivo *in vitro* mais eficientes para essas espécies nativas.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados, podemos concluir que sobre as estruturas anatômicas das folhas de jequitibá-rosa:

- ✓ A organização do mesofilo é do tipo dorsiventral, as epidermes são uniestratificadas, as folhas são hipostomáticas e os estômatos do tipo anomocíticos;
- ✓ No cultivo *ex vitro* apresentaram esclerênquima, os quais são ausentes no cultivo *in vitro*;
- ✓ Nas fases do cultivo *in vitro* as folhas apresentaram maior número de estômatos e com os maiores diâmetros polar e equatorial.
- ✓ Na fase da sala de crescimento e no cultivo *ex vitro* os estômatos são mais funcionais, possuem forma elíptica e menor diâmetro equatorial.
- ✓ Pelas alterações anatômicas observadas, as plântulas de jequitibá-rosa demonstraram ter plasticidade para se adaptar as condições ambientais as quais foram submetidas, fato este de grande importância para um bom desenvolvimento *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 442p.

ALQUINI, Y. BONA, C.; BOEGER, M.R.T.; COSTA, C.G. da; BARROS, C.F. 2003. **Epiderme**. In: APPEZZATO-DAGLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Ed.). Anatomia vegetal. Viçosa: UFV, p.87-108.

ABBADE, L. C. **Aspectos do cultivo in vitro de ipê-branco**. Dissertação. UFLA. Lavras-MG, 2008. p. 87.

ABBADE, L. C.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; CASTRO, E. M.; CENTOFANTE, A. R.; OLIVEIRA, C. **Anatomia foliar de ipê Anatomia foliar de ipê-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.) – Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro* e *in vitro***. Acta Scientiarum. Biological Sciences. Maringá, v. 31, n. 3, p. 307-311, 2009.

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

CAMARGO, M.A.B.;MARENCO, R.A. Density, size and distribution of stomata in 35 rain-forest tree species in Central Amazonia. **Acta Amaz.** Manaus, v. 41, n. 2. 2011.

CASTRO, E.M. de; GAVILANES, M. L.; ALVARENGA, . A. de; CASTRO, D. M. de; GALVILANES, T. O. T. **Aspectos da anatomia foliar de mudas de *Guarea guidonea* (L.) Sleumer, sob diferentes níveis de sombreamento.** Daphne, Belo Horizonte, v.8, n.4, p. 31-35, 1998.

CASTRO, E.M. de. **Alterações anatômicas, fisiológicas e fitoquímicas em *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento.** 2002. 221p. Tese (Doutorado em fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

COUTO, J.M.F.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E.P. Desinfestação e germinação in vitro de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.5, p.633-642, 2004.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal:** Parte II: órgãos, experimentos e interpretações. São Paulo: Rocca, 1986. 336 p.

DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira** Vol. 32. n. 72. Colombo, 2012. 453-462 p.

DIGNART, S. L. **Luz e sacarose na micropropagação de *Cattleya walkeriana*: alterações anatômicas e fisiológicas.** Dissertação. UFLA. Lavras-MG, 2006.

FABBRI, A.; SUTTER, E.; DUNSTON, S. K. Anatomical changes in persistente leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.28, n.4, p. 331-337, May 1986.

FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira ‘roxo de valinhos’ em diferentes ambientes.** Lavras. Minas Gerais – Brasil. 2003.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, nov./dez. 2011.

FIDELIS, I. **Micropropagação de *Brosimim guadichaudii* Trec. (Mamacadela) uma espécie considerada medicinal.** 1998. 109p. 1998. Dissertação (Mestrado em fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília-DF: Embrapa, 1998. V.1, p. 183-260.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.108, p.105-120, 2006.

HERNANDEZ, W.; XAVIER, A.; PAIVA, H. N.; WENDLING, I. Propagação vegetativa do jequitibá-rosa (*Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze) por estaquia. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.37, n.5, p.955-967, 2013.

JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. **New York: McGraw Hill Book**, 1940. 523 p.

KHAN, S.V. et al. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v.46, n.2, p.161-166, 2003.

LIMA, E. C. **Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de Sangra d'água (*Croton urucurana* Baill).** 2004. 105 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laure, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, v.30, p.421-427, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil.** 4.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v.1. 368p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 2. ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1998. 368 p.

MARTINOTTO, C. **Cultivo *in vitro* e aspectos morfológicos de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.)**. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2004.

MATTA, L. B. V. **As Lecythidaceae Poit. na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé**. 2011. Dissertação (Mestrado em Botânica). INPA. Manaus, 2011.

MERKLE, S.A.; NAIRN, C.J. Hardwood tree biotechnology. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant***, v.41, p.602-619, 2005.

MORI, S. 1990. Diversificação e conservação das lecythidaceae neotropicais. **The New York Botanical Garden**, Bronx, NY, USA. 45 p.

MURASHIGE, T. e SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. ***Physiologia Plantarum***, Copenhagen, n.1, p. 437-496, 1962.

NEHRA, N. S. et al. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant***, v.41, p.701-717, 2005.

NERY, F. C. Aspectos anatômicos de folhas de plantas jovens de *Calophyllum brasiliense* cambess. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 129-131, jul. 2007.

OLIVEIRA, M.I.; CASTRO, E.M.; COSTA, L.C.B.; OLIVEIRA, C. Características biométricas, anatômicas e fisiológicas de *Artemisia vulgaris* L. cultivada sob telas coloridas. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.11, n.1, p.56-62, 2009.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**. Vol. 33. n. 76. Colombo, 2013. 439-453 p.

OLIVEIRA, E. C.; MIGLIORANZA, E. **Dimensões e densidade estomática em diferentes variedades de mandioca**. Cultivando o saber. v. 6, n. 4, p. 201 – 213. Cascavel, 2013.

PREECE, F. F. COMPTON, M. E. I. Problems with explants exudation in micropropagation. In BAJAM Y. P. S. **Hight-tech and micropropagation**. Berlin, Spring Verlag, 1991, p.168-189.

POOTER, L. 1999. Growth responses of 15 rain-forest tree species to a light gradient: the relative importance of morphological and physiological traits. **Functional Ecology** **13**. P. 396-410.

READ, P. E.; FELLMAN, C.D. Accelerating acclimation of in vitro propagated woody ornamentals. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 166, p. 15-20, 1985.

RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. **Recomposição florestal cultivo do jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*)**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001. 24p.

RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. Efeito do substrato e da temperatura sobre a germinação e vigor de sementes do jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*). **Comunicado Técnico Embrapa**. Colombo, PR. Dezembro, 2004.

ROSAL, L. F. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish)**. 106 p. 2004. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTANA, J. R. F.; OLIVEIRA, L. M.; PAIVA, R.; RESENDE, R. K. S.; CASTRO, E. M. Anatomia foliar de seis espécies de anonáceas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.8, p.2362-2365, nov, 2008.

SALGADO, A. P. S. P.; CARDOSO, M. G.; CASTRO, E. M.; MACHADO, S. M. F.; GUIMARÃES, L. G. L.; ANDRADE, M. A.; PASSOS, L. O. Caracterização química e anatômica de folhas de tomilho provenientes de plantas submetidas a diferentes condições luminosas. **Bioscience Journal**., Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 933, Nov./Dec. 2012.

SERT, M. A. **Anatomia foliar e teores de clorofila em três variedades de soja [*Glycine max* (L.) MEDRILL] e dois níveis de radiação solar**. 1992. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO. **Sistema Nacional de Informações Florestais: espécies florestais**. Disponível em: <<http://www.florestal.gov.br/snif/recursos-florestais/especies-florestais>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

SILVA, R. F.; ANDRADE, B. B. **Técnicas de desinfestação de sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata*) para cultivo “in vitro”**. Centro Universitário de Patos de Minas, Patos de Minas, MG. 2014.

SMITH, W. K.; VOGELMANN, T. C.; DELUCIA, E. H.; BELL, D. T.; SHEPHERD, K. A. Leaf form and photosynthesis: do leaf structure and orientation interact to regulate internal light and carbon dioxide? **Bioscience**, Washington, v. 47, n. 11, p. 785 - 793, 1997.

SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo in vitro do ingazeiro (*Inga vera* Willd, subsp. *Affinis* (DC.) T. D. Penn.)** 2003. 105 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOUSA, V. A.; AGUIAR, A. V. **Programa de melhoramento genético de araucária da Embrapa Florestas: situação atual e perspectivas**. Colombo: Embrapa Florestas, 2012. 40 p.

SOUZA, L. S.; FIOR, C. S.; SOUZA, P. V. D.; SCHWARZ, S. F. Desinfestação de sementes e multiplicação *in vitro* de guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O. Berg) D. Legrand. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 3, p. 691-697, Setembro 2011.

SOUZA, C. M.; PINTO J. E. B. P.; RODRIGUES, B. M.; MORAIS, A. R.; ARRIGONIBLANK, M. F. Influência dos fatores físicos na regeneração de brotos em repolho. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 23, p. 830-835, 1999.

SUN, O. J.; SWEET, G. B.; WHITEHEAD, D.; BUCHAN, G. D. Physiological responses to water stress and waterlogging in nothofagus species. **Tree Physiology**, Victoria, v. 15, n. 10, p. 629-638, Oct. 1995.

WALTER, S. J. et al. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. 3ª ed. Porto Alegre, 2009. 455-457 p.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo: Embrapa Florestas. 2006. 54 p.

XAVIER, A. et al. **Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais**. In: Borém, A. (Ed.). *Biotecnologia Florestal*. Viçosa: Ed. UFV. 2007, 55-74 p.

XAVIER A.; WENDLING L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Cauliflower shootculture: effects of diferente types of ventilation on growth and physiology. **Plant Science**, Clare, v. 141, p. 209-217, 1999.

ANEXOS

ANEXO 1. Composição do meio de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1980).

S.E.	COMPONENTE	FÓRMULA	CONCENTRAÇÃO (mg L ⁻¹)
A	Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	400
	Nitrato de cálcio	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	556
B	Sulfato de potássio	K ₂ SO ₄	990
C	Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	96
D	Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	170
	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2
	Molibdato de sódio	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25
E	Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	22,3
	Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
	Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
F	Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
	Sódio EDTA	Na ₂ EDTA	37,2
G	Vitaminas	Tiamina	1
		Piridoxina HCl	0,5
		Ácido nicotínico	0,5
H		Mio-inositol	20
I		Glicina	40