

Ana Paula Lando

**Efeitos estruturais do cultivo *in vitro* e aclimatização *ex vitro* em raiz e folha de espécies de *Cattleya* Lindl.  
(Orchidaceae)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marisa Santos  
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Jr

Florianópolis, SC  
2015



Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lando, Ana Paula

Efeitos estruturais do cultivo in vitro e aclimatização ex vitro : em raiz e folha de espécies de Cattleya Lindl. (Orchidaceae) / Ana Paula Lando ; orientadora, Marisa Santos ; coorientador, Paulo Cesar Poeta Fermino Jr. - Florianópolis, SC, 2015.

82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Micropropagação. 3. Aclimatização. 4. Anatomia Vegetal. 5. Fisiologia Vegetal. I. Santos, Marisa. II. Fermino Jr, Paulo Cesar Poeta. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

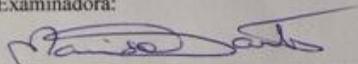
**Efeitos estruturais do cultivo *in vitro* e  
aclimatização *ex vitro* em raiz e folha de  
espécies de *Cattleya Lindl.* (Orchidaceae)**

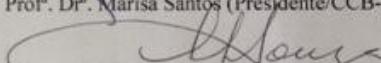
por

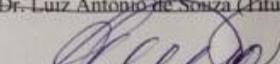
**Ana Paula Lando**

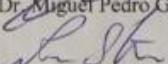
Dissertação julgada e aprovada em 26/02/2015, em sua forma final,  
pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção  
do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos  
Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos  
Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

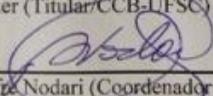
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marisa Santos (Presidente/CCB-UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Antônio de Souza (Titular/UEM-Maringá)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (Titular/CCA-UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Neusa Steiner (Titular/CCB-UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2015

**“Com a ajuda do microscópio não há nada tão pequeno que possa escapar às nossas investigações, portanto há um novo e visível mundo descoberto a ser entendido”.**

Robert Hookie

## AGRADECIMENTOS

Chego ao fim de uma etapa, e como é prazeroso perceber que o longo caminho trilhado, só foi possível pelas inúmeras mãos que encontrei...

Meu muito obrigado a todas!

À minha orientadora Profa. Dra. Marisa Santos, pela confiança e pela maravilhosa orientação no decorrer de todo o trabalho! Agradeço todas as oportunidades, por todas as horas que precisei e me ouviu com sugestões e conselhos, pelo profissionalismo, pelo amor que passas ao falar do mundo microscópico das plantas. Pelo carinho, pela amizade e incentivo, enfim obrigada por tudo nestes dois anos de muito aprendizado e crescimento!

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Jr, pela coorientação, ensinamentos, incentivos pela disponibilidade, e por todo o apoio durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais e minha irmã que mesmo longe sempre se fizeram presentes! Pelo incentivo e amor em todas as horas!

Ao Gabriel companheiro no amor, na vida e nos sonhos! Obrigado pelo apoio, pelo amor e carinho. Por estar do meu lado durante toda a caminhada e incentivo nas próximas etapas que virão! Amo você!

A Marcia Patricia Hoeltgebaum, obrigada por não ter me deixado desistir, por ter me ensinado a ser forte! Amiga linda! Agradeço pelo companheirismo, pela ajuda nos momentos que precisei, por todos os conselhos, incentivos, pelos sorvetes, picolés, cafés, sorrisos, pelo carinho, pelas saídas a campo, por estar sempre na torcida por mim, pelo amor que dedicas à vida, pela sensibilidade, por ter me apresentado a erva-baleeira, bromélias, *Paepalanthus*, por tudo que aprendi contigo! Adoro vc!

A professora Dra. Rosete Pescador por ter cedido gentilmente às orquídeas para o estudo.

A Daniela de Conti e Daniela Werner Ribeiro pela amizade e por todas as vezes que precisei e vocês prontamente me ajudaram.

A Eliana Medeiros pela amizade, carinho e por ter me auxiliado e ensinado o mundo da microscopia eletrônica. Adoro vc!

Aos professores, pelos valiosos ensinamentos: Dr. Miguel Pedro Guerra, Dr. Maurício Sedrez dos Reis, Dr. Rubens Nodari, Dra. Neusa Steiner, Dra. Rosete Pescador, Dra Zenilda Bouzon.

A Tatiane Carine da Silva e Marcelo Borghezan pela amizade, ensinamentos e auxílio nas análises de clorofila.

Aos membros da banca, pela gentileza em aceitar participar da avaliação do presente estudo, e pelas ricas contribuições.

As amigas e parceiras de trabalho: Márcia Wolfart pelas conversas, chimarrão sagrado de todos os dias, pelos sábados, domingos no laboratório, pela ajuda e pela amizade. Thaisy pela amizade, pelas caronas e bate-papos. Camilla Reis, Roberta Royer, Isabel Brandalise, Elisa Filipin pela amizade e parceria em todos os momentos.

Aos amigos do RGV: Lilian, Maiby, Francis, Daniel, Rafaela Liz, Alceu, Rosenilda, Tassiane, Caroline Cristofolini, Samantha.

Aos amigos Simone, Christian e Micheli pela torcida e pela primeira hospedagem.

Aos amigos queridos de Xanxerê que estão sempre na torcida!

A CAPES, pela bolsa concedida nesses dois anos de mestrado, à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela formação e oportunidades.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram e fazem parte deste trabalho.

Agradeço a Deus pela vida e pela saúde!

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** *Cattleya xanthina* Lindl.: **a** Com flores; **b** Epífita sobre forófito (Foto: Fraga *et al.* 2009) .....18
- Fig. 2.** *Cattleya velutina* Rchb. f. com flores. ....19
- Fig. 3.** Plantas de *Cattleya xanthina* (Orchidaceae) submetidas a diferentes condições de cultivo durante o desenvolvimento: **a-b** *in vitro*, utilizando substrato MS/2 em sala de crescimento. **c-d** pré-aclimatizadas *ex vitro*, sob condição de Fitotron em bandejas com substrato à base de casca de pinus, pó de coco e carvão vegetal em atmosfera saturada, por 60 dias. **e-f** aclimatizadas *ex vitro* em casa de vegetação, coberta com sombrite 70% e com irrigação automática duas vezes ao dia, fixadas em fibras de coco com esfagno, por 90 dias.....26
- Fig. 4** Imagens de *Cattleya xanthina* (Orchidaceae) obtidas em microscópio DM 2500 equipado com câmera DFC 295, com a utilização do software Leica Application Suite, para determinação dos dados quantitativos da lâmina foliar: a-b secções transversais da lâmina foliar para medidas da espessura do mesofilo (**a**) e espessura da epiderme (**b**); c-d secções paradermicas da face abaxial para determinação da densidade estomática (**c**) e medidas do diâmetro polar e equatorial dos estômatos (**d**). .....29
- Fig. 5** Eletromicrografia de varredura da superfície epidérmica de *C.xanthina*: **a** aspecto geral da face adaxial; parede periclinal externa levemente convexa com ornamentações epicuticulares estriadas (seta) **b-c** convexidade e deposição de ceras epicuticulares mais acentuada; Barras = 20 µm. **d-f** aspecto geral da face abaxial, *in vitro* alguns estômatos ainda não evidenciavam cutícula rompida (seta), *ex vitro* todos os estômatos com cutícula rompida; Barras = 50 µm. **g** detalhe dos estômatos mais elípticos **h-i** mais esféricos **h** poro estomático amplo e sem borda cuticular **i** borda cuticular mantendo o poro parcialmente obliterado (seta) Barras = 10 µm. ....32
- Fig. 6** Fotomicrografias de secções transversais de lâmina foliar de *C. xanthina*: **a-b-c** Mesofilo tendendo a homogeneidade celular, na condição *in vitro*, e com células alongadas na face adaxial nas condições *ex vitro*. Barras=50 µm. **d** Eletromicrografia de transmissão de células epidérmicas com parede periclinal externa (Pe) espessa revestida por cutícula (Ct); numerosos plasmodesmas (seta). Barra = 5 µm. **e-j** epiderme evidenciando a cutícula com reação positiva ao sudan III Barras =10 µm. **e-g** face adaxial. **h-j** face abaxial. ....34

**Fig. 7:** Massa seca foliar em *C.xanthina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5% ( $p < 0.05$ ) N=10. Barras = DP. .... 35

**Fig. 8:** Suculência Foliar em *C.xanthina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5% ( $p < 0.05$ ). N=10. Barras = DP. .... 35

**Fig. 9:** Concentração de clorofila *a*, *b*, total, e carotenoides na lâmina foliar de *C.xanthina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre as médias, de cada condição de cultivo, para cada clorofila, teste de Tukey (paramétrico) ou Dunn\* (não-paramétrico) ( $p < 0.05$ ). Barras = DP. .... 36

**Fig. 10** Eletromicrografias de transmissão de secções transversais de lâmina foliar de *C.xanthina* cultivadas *in vitro* e *ex vitro*: **a-b-c** observam-se cloroplastos recurvados (seta), organização das membranas internas irregulares, com grana pouco desenvolvida. Barras a= 5µm; b=1µm; c= 0,2µm. **d-e-f** amiloplastos (seta) mitocôndrias (mt) entre amiloplastos e grana (gr) presente perifericamente no plasto. Barras d= 5µm; e=1µm; f= 0,5 µm. **g-h-i** os cloroplastos apresentam grânulos de amido (am), estruturação dos tilacóides em grana bem desenvolvidos, mitocôndrias e peroxissomos (pr) próximos aos cloroplastos e presença de plastoglobulo (pg). Barras g= 2µm; h=0,5µm; i= 0,2µm. .... 37

**Fig. 11** Fotomicrografias de secções transversais de raízes de *C.xanthina* constituída por tecido de revestimento velame, córtex e cilindro central poliarco (**a**) Cultivo *in vitro* (**b**) pré-aclimatizada *ex vitro* em Fitotron (**c**) aclimatizada *ex vitro* em casa de vegetação. Barras = 100 µm. ve-velame; ex-exoderme; ri- região intermediária; en-endoderme; cc- cilindro central. .... 39

**Fig. 12** Fotomicrografias de secções transversais das raízes de *C.xanthina*: **a-b-c** velame (ve) constituído por quatro a cinco camadas de células alongadas longitudinalmente e paredes com barras de espessamento (seta) Barras= 50µm. **d-e-f** Córtex constituído de exoderme (ex), região intermediária (ri), endoderme (en); a exoderme apresenta células mais alongadas com paredes periclinal externa e anticlinal espessadas, mais evidente nos tratamentos *ex vitro*; células de passagem (cp) com protoplasto denso e com vários vacúolos; região intermediária (ri) com paredes plicadas na região mais externa adjacente à exoderme (a,c seta); com espaços intercelulares, mais conspícuos nas condições *ex vitro* (ponta de seta) Barras= 100 µm **g-h-i** a endoderme (en) exibiu espessamento em “O” nas paredes celulares pouco evidente *in vitro*, mais conspícuo nas condições *ex vitro*; células de passagem (cp) adjacentes aos polos de protóxilema (px); o cilindro central (cc) *in*

*vitro* apresenta sete a nove elementos traqueais do metaxilema (mx), aumentando na condição *ex vitro*. Barras= 25 µm. ....40

**Fig. 13** Eletromicrografia de varredura da superfície epidérmica de *C.velutina*: **a-b-c** aspecto geral da face adaxial destaca-se a parede periclinal externa convexa com deposição de ceras epicuticulares *in vitro*, na condição PAC, a convexidade e a deposição de ceras epicuticulares reduziram-se, acentuando-se na AC; Barras = 50 µm. **d-e-f** aspecto geral da face abaxial, *in vitro*, os estômatos mantinham o poro ainda obliterado pela cutícula (seta) PAC os poros mostraram-se abertos (seta) e na AC voltou a ocorrer à presença de muitos estômatos com poro obliterado (seta) Barras = 50 µm. **g-h-i** ; detalhe dos estômatos esféricos nas três condições; h poro mostrou-se aberto (seta); **i** poro parcialmente obliterado pela cutícula (seta) comparado com a condição PAC. Barras = 10 µm.....49

**Fig. 14** Correlação negativa entre a densidade estomática e a área foliar de *C.velutina* .....50

**Fig. 15** Fotomicrografias de seções transversais da lâmina foliar de *C.velutina*: **a-b-c** Epiderme (ep) uniestratificada. Mesofilo (ms) na PAC ocorreu um aumento no número de camadas celulares e alongamento das células da porção intermediária em relação à condição *in vitro* e AC. Barras = 100 µm **d-e** Eletromicrografias de transmissão de células epidérmicas evidenciando a parede periclinal externa espessa (seta) com deposição de cutícula (ct); plasmodesmas (ponta de seta) Barras d= 2 µm e= 5 µm. **f-k** epiderme evidenciando a cutícula com reação positiva ao sudan III Barras = 10 µm. **f-h** face adaxial. **i-k** face abaxial; **(j)** Cutícula extensiva até a parede periclinal interna estômato (seta).....51

**Fig. 16** Massa seca foliar em *C.velutina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5% ( $p < 0.05$ ) N=10. Barras = DP.....52

**Fig. 17** Suculência Foliar em *C.velutina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5% ( $p < 0.05$ ). N=10. Barras = DP.....53

**Fig. 18** Concentração de clorofila *a*, *b*, total, e carotenoides na lâmina foliar de *C.velutina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5% (paramétrico) ou Dunn\* (não-paramétrico) ( $p < 0.05$ ). Barras = DP.....53

**Fig. 19** Eletromicrografias de transmissão de secções transversais da lâmina foliar de *C.velutina* cultivadas *in vitro* e *ex vitro*: **a-b-c** cloroplastos com rompimento da

membrana externa (seta) até a completa desestruturação, com vesículas contornando (setas); em alguns casos o cloroplasto mantinha aspecto organizado apresentava grânulos de amido (am) e plastoglóbulos (pg) Barras a,b=1µm c=0,5 µm **d-e-f** cloroplastos com aspecto mais organizado, presença de grana (gr) pouco constatada. Barras d=1 µm e,f= 0,5 µm **g-h-i** plastoglóbulos de tamanhos maiores, vesículas que estão englobando cloroplasto e plastoglóbulos osmiofílicos, para fusão com o vacúolo (setas). Barras g= 2 µm h=0,5µm i= 1µm. .... 54

**Fig. 20** Fotomicrografias de seções transversais de raízes de *C. velutina*: **a** Cultivo *in vitro*; exoderme (ex) exibiu células de passagem (setas) **b** pré-aclimatizada *ex vitro* em Fitotron; exoderme apresentou espessamento nas paredes periclinal externa e anticlinal, sendo mais evidente que *in vitro* e na AC **c** aclimatizada *ex vitro* em casa de vegetação; velame (ve) apresentou células que se alongaram menos no sentido radial, do que nas outras duas condições de cultivo, ocorrência de células com degradação das paredes (setas) Legenda: ri- região intermediária. en- endoderme. cc- cilindro central. Barras =100 µm. .... 56

**Fig. 21** Fotomicrografias de seções transversais das raízes de *C. velutina*: **a-b-c** velame (ve) constituído por quatro a cinco camadas de células vivas e nucleadas; na PAC não se evidencia células nucleadas; espessamento na parede em forma de rede (seta) Barras a= 50µm b=100 µm c= 20 µm. **d-e-f** região intermediária do córtex com células parenquimáticas com espaços intercelulares (setas) sendo estes menores na condição *in vitro* e mais conspícuos nas raízes *ex vitro*. Barras d=50µm e, f= 100 µm. **g-h-i** endoderme (en) pouco espessamento na condição *in vitro*, acentuando-se nas condições *ex vitro*, onde mostraram espessamento em “O”; células de passagem (ponta de seta), nucleadas e sem espessamento na parede. Cilindro central apresentou medula (md) parenquimática contornada por sistema vascular (seta) *ex vitro* os elementos traqueais do xilema (mx) são bem evidentes, contornados por células de paredes espessadas e lignificadas; cordões de floema (fl) foram evidenciados intercalando com o xilema. Barras=50 µm. .... 57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dados quantitativos dos estômatos em <i>C.xanthina</i> cultivadas <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> .....	32
<b>Tabela 2:</b> Dados quantitativos da lâmina foliar de <i>C.xanthina</i> cultivada <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> . .....	33
<b>Tabela 3:</b> Dados quantitativos da raiz de <i>C.xanthina</i> cultivada <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> . .....	41
<b>Tabela 4:</b> Dados quantitativos dos estômatos em <i>C.velutina</i> cultivadas <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> .....	48
<b>Tabela 5:</b> Dados quantitativos da lâmina foliar de <i>C.velutina</i> cultivada <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> . .....	52
<b>Tabela 6:</b> Dados quantitativos da raiz de <i>C.velutina</i> cultivada <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> . .....	58

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

SMA- Secretaria do Meio Ambiente

IBt- Instituto de Botânica de São Paulo

MS- Meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962)

LFDGV- Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal

CCA- Centro de Ciências Agrárias

UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina

PAC – Pré-aclimatização

AC- Aclimatização

M- Molar

MFM- Massa fresca máxima

MS- Massa seca

A- Área foliar

SF- Suculência Foliar

DMSO- dimetilsulfóxido

ANOVA- Análise da Variância

DP- Desvio padrão

## Resumo

---

A propagação *in vitro* de orquídeas constitui um dos métodos mais conhecidos e utilizados para produção de mudas de alta qualidade e conservação de espécies ameaçadas de extinção, suprindo, assim, os problemas decorrentes da complexidade de germinação a partir de sementes e a exploração sem controle em seu hábitat natural. No cultivo *in vitro* plantas são condicionadas a alta umidade, trocas gasosas restritas e baixa luminosidade, necessitando de aclimatização *ex vitro* para possibilitar alterações estruturais e fisiológicas adaptativas ao novo ambiente, garantindo desenvolvimento e crescimento. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar alterações qualitativas e quantitativas de folhas e raízes de espécies de *Cattleya* (Orchidaceae) cultivadas *in vitro* e aclimatizadas *ex vitro*. Sementes de *C.xanthina* e *C.velutina* foram inoculadas, germinadas e plântulas multiplicadas foram mantidas *in vitro* por 180 dias, em meio MS/2, suplementado com 20 gL<sup>-1</sup> de sacarose, 7 gL<sup>-1</sup> de ágar e 1,5 gL<sup>-1</sup> de carvão ativado. Após, foram pré-aclimatizadas (PAC) *ex vitro* por 60 dias, em caixas com atmosfera saturada, em câmara Fitotron. Depois foram aclimatizadas (AC) *ex vitro* em casa de vegetação por 90 dias. Amostras de folhas e raízes foram processadas e analisadas em microscopias óptica e eletrônicas de varredura e transmissão. Foram também mensurados: suculência, teor de clorofilas, densidade estomática, dimensão dos estômatos e espessura dos tecidos foliares e da raiz. Os dados foram analisados com ANOVA ou Kruskal-Wallis e comparados por teste Tukey ou Dunn. Em folhas de *C. xanthina*, as modificações estruturais decorrentes da aclimatização foram: na epiderme, paredes periclinais externas passaram de retas a convexas e acentuou-se deposição de ceras epicuticulares; estômatos alteraram da forma elíptica a arredondada, sem borda cuticular na PAC e com borda obliterando parcialmente o poro em AC; mesofilo homogêneo *in vitro* mostrou células parenquimáticas mais alongadas adaxialmente e maior número de camadas celulares quando *ex vitro*; aumento de massa seca. Densidade estomática manteve-se. Registrou-se: amiloplastos na PAC e cloroplastos com tilacóides organizados e grana bem desenvolvido na AC. Na raiz, nas condições *ex vitro*, ocorreu expansão do córtex. Em folhas de *C.velutina*, as modificações estruturais foram: redução gradual da densidade estomática; aumento da área foliar e do diâmetro polar dos estômatos; redução das concentrações de clorofila e carotenoides. Mesofilo, na PAC, mostrou células mais alongadas e maior espessura, na condição *in vitro* e na AC foi similar. Massa seca e suculência não sofreram alteração. Cloroplastos *in vitro* exibiram evidências de degradação, com rompimento da membrana externa até completa desestruturação; na PAC, mostraram-se com aspecto mais organizado, porém rara formação de grana; na AC, plastoglóbulos osmiofílicos foram conspícuos e raramente com grana. Observou-se senescência das folhas na AC. A raiz não apresentou alterações na espessura dos tecidos, mas ocorreu maior diferenciação na endoderme e no cilindro vascular. Poucas raízes formaram-se *ex vitro*. Os resultados refletem a plasticidade estrutural de *C. xanthina* no processo de aclimatização assegurando o equilíbrio hídrico e captação de luz tendo em vista as distintas condições de umidade e luminosidade. Entretanto, os dados sobre *C.velutina* indicaram algumas alterações estruturais insuficientes para suportar as condições ambientais de aclimatização.

**Palavras-chave:** micropropagação, aclimatização, plasticidade.

## Abstract

*In vitro* propagation of orchids is one of the most known methods and used for production of high quality seedlings and conservation of endangered species, supplying thus the problems arising from the complexity of germination from seed and exploitation without control their natural habitat. In the *in vitro* culture plants are conditioned to high humidity, gas exchange reduction and low light, requiring acclimatization *ex vitro* to allow structural and physiological changes adaptive to the new environment, ensuring development and growth. The aim of this study was to evaluate qualitative and quantitative changes in leaves and roots of species of *Cattleya* (Orchidaceae) cultured *in vitro* and *ex vitro* acclimatization. *C.xanthina* and *C.velutina* seeds were inoculated germinated seedlings were multiplied and maintained *in vitro* for 180 days in MS/2 medium supplemented with 20 gL<sup>-1</sup> sucrose, 7 gL<sup>-1</sup> agar and 1,5 gL<sup>-1</sup> of activated charcoal. After, were pre-acclimatized (PAC) *ex vitro* for 60 days in boxes with saturated atmosphere in phytotron chamber. After were acclimatized (AC) *ex vitro* in a greenhouse for 90 days. Samples leaves and root were processed and analyzed in optical microscopy and electronic scanning and transmission. Were also measured: succulence, chlorophyll content, stomatal density, stomatal size and thickness of the foliage and root. Data were analyzed with ANOVA or Kruskal-Wallis and compared by Tukey or Dunn test. In leaves of *C. xanthina*, structural modifications due to acclimatization were: in the epidermis, external periclinal walls went from straight to convex and was accentuated deposition of waxes; stomata changed the elliptical form the rounded, without cuticular edge on the CAP and edge partially obliterating the pore in AC; mesophyll homogeneous *in vitro* showed more elongated parenchyma cells adaxialmente and greater number of cell layers when *ex vitro*; increase in dry mass. Stomatal density remained. Was recorded: amiloplasts the PAC and chloroplasts with thylakoids organized and grana well developed in AC. At root, in the *ex vitro* conditions, there was expansion of the cortex. On leaves of *C.velutina*, structural changes were gradual reduction in stomatal density; increased leaf area and the polar diameter of the stomata; reduction the concentrations of chlorophyll and carotenoids. Mesophyll, the PAC, showed more elongated cells and more thickness, in the condition *in vitro* and in the AC was similar. Dry mass and succulence did not change. Chloroplasts *in vitro* showed evidence of degradation with rupture of the outer membrane until complete disintegration; in the PAC, showed up more organized aspect, however rare grana formation; AC, plastoglobulos osmiofilicos were more evident and rarely with grana. Was observed senescence of leaves in AC. The root had no change in tissue thickness, but has occurred greater differentiation in the endoderm and vascular cylinder. Few roots formed *ex vitro*. The results reflect the structural plasticity of *C. xanthina* in the acclimatization process ensuring hydric balance and captation light in view of the different conditions of humidity and light. However, data on *C.velutina* indicated some structural changes insufficient to support the environmental conditions of acclimatization.

**Keywords:** micropropagation, acclimatization, plasticity.

## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	17
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
2.1 MATERIAL VEGETAL E CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	24
2.2 ACLIMATIZAÇÃO - CULTIVO <i>EX VITRO</i> .....	24
3 PREPARO DAS AMOSTRAS E PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE .....	26
3.1 ESTUDOS MICROSCÓPICOS QUALITATIVOS .....	26
3.1.1 Microscopia Óptica .....	26
3.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura .....	27
3.1.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	27
3.2 ESTUDOS QUANTITATIVOS .....	27
3.2.1 Espessuras dos tecidos de folha e raiz .....	27
3.2.2 Densidade estomática .....	28
3.2.3 Dimensões dos estômatos .....	28
3.2.4 Suculência foliar .....	29
3.2.5 Extração e dosagem de clorofilas .....	30
3.2.6 Análises estatísticas .....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
4.1 <i>Cattleya xanthina</i> (Lindl.) Van den Berg .....	31
4.1.1 Folha .....	31
4.1.2 Raiz .....	38
4.1.1.1 <i>Discussão Folha</i> .....	41
4.1.2.1 <i>Discussão Raiz</i> .....	46
4.2 <i>Cattleya velutina</i> Rchb.f. ....	47
4.2.1 Folha .....	47

4.2.2 Raiz .....	55
4.2.1.1 <i>Discussão Folha</i> .....	58
4.2.2.2 <i>Discussão Raiz</i> .....	61
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma grande biodiversidade, abrangendo de 15 a 20% do número total de espécies do nosso planeta, sendo portador da maior diversidade genética vegetal do mundo (Vilela-Morales & Valois 2000, Ministério do Meio Ambiente 2004). Representando um importante componente dessa biodiversidade, Orchidaceae é uma das maiores famílias de Angiospermas em número de espécies, incluindo cerca de 850 gêneros e 20.000 espécies (Souza & Lorenzi 2005).

As espécies epífitas destacam-se por compor grande parte da diversidade florística dos Neotrópicos e apresentam ampla e explosiva especiação dentro de poucas famílias (Benzing 2012). Cerca de 80% das espécies epífitas estão concentradas em apenas quatro famílias: Orchidaceae, Bromeliaceae, Polypodiaceae e Araceae (Gentry & Dodson 1987). No Brasil, são conhecidos aproximadamente 203 gêneros e 2.350 espécies de Orchidaceae formando um rico patrimônio orquidológico de incalculável valor e beleza (Menezes 1987). As orquídeas destacam-se como importantes plantas ornamentais, de grande interesse botânico e econômico, em função da beleza e exuberância de suas flores (Sheehan 1992). Entre as orquídeas, o gênero *Cattleya* tem sido o mais popular, cultivado e comercializado, evidenciando a sua importância econômica (Dignart *et al.* 2009).

*Cattleya* contempla, aproximadamente, 70 espécies, todas epífitas, com proeminentes pseudobulbos, cujos tamanhos variam de 10 cm a 1,3 m. As flores são geralmente grandes, com a terceira pétala transformada em labelo, quase sempre com os bordos franjados. A parte basal, ligada ao resto da flor, normalmente é tubular, envolvendo a coluna (Braga 1987). Menezes (1987) cita *Cattleya* como rainha das orquídeas, pela sua exuberância e tamanho da flor, e Arditti & Ernst (1993) consideram “*Cattleya*” como sinônimo de “orquídea”.

*Cattleya* foi estabelecido originalmente por John Lindley, em 1822, na obra “Collectanea Botanica”, ao descrever a espécie brasileira *Cattleya labiata* Lindley, importada pelo colecionador Willhen Cattley, em 1818 (Braem 1984).

As espécies de *Cattleya* encontram-se distribuídas nas montanhas, paralelamente à costa oriental do Brasil (Berg 1996). Estas montanhas referidas pelo autor correspondem, na sua maior parte, àquelas em que há o predomínio do bioma Mata Atlântica. Como cita Raposo (1993), constitui um dos mais belos ornamentos das matas

tropicais e subtropicais da América, tornando-se o mais popular e o mais cultivado gênero da família das orquídeas. Estes fatores têm contribuído para que muitas espécies deste gênero encontrem-se na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (Brasil 2008), entre elas *C. xanthina* (Lindl.) van den Berg (sob a denominação de *Sophronitis xanthina* (Lindl.) van den Berg & M. W. Chase) e *C. velutina* Rchb. f. (também já mencionada como ameaçadas de extinção no Estado de São Paulo, na Resolução SMA 48, 2004).

*Cattleya xanthina* (Lindl.) van den Berg (Fig. 1a) é uma espécie de orquídea muito procurada por cultivadores para produzir híbridos artificiais amarelos ou verdes. É uma planta preferencialmente epífita (Fraga *et al.* 2009), (Fig. 1b), crescendo cerca de 30 cm de altura. Suas inflorescências apresentam de 1-8 flores, as quais apresentam sépalas e pétalas amarelo claro. Os lobos laterais do labelo, que envolvem a coluna, possuem a coloração amarela mais viva no interior do tubo, com algumas veias púrpuras, enquanto no lobo mediano destacam-se veias púrpuras, da base até as margens do labelo, formando as guias de néctar, que variam de muitas a apenas uma ou nenhuma (Withner 1988). Esta espécie é provavelmente endêmica da região montanhosa central do Espírito Santo (Ruschi 1986, Miranda 1998).



**Fig. 1** *Cattleya xanthina* Lindl.: **a** Com flores; **b** Epífita sobre forófito (Foto: Fraga *et al.* 2009)

*Cattleya velutina* Rchb. f. (Fig. 2) é uma epífita em florestas úmidas ou secas, em locais bem iluminados e ventilados. Distribuição

nos estados ES, MG, RJ, SP, no bioma Mata Atlântica, poucas são as informações disponíveis na literatura sobre esta espécie, sendo que descrições são proporcionadas por orquidófilos. Rosim (2009) refere às dificuldades no cultivo desta espécie, decorrente da sensibilidade na estrutura das raízes e das folhas, apresentando cultivo exigente.



**Fig. 2.** *Cattleya velutina* Rchb. f. com flores.

Fonte: <http://www.colibriorquideas.com/especies/Cattleyavelutina.php>. (Acesso em 20 set. 2014)

A maioria das orquídeas possui sementes extremamente diminutas, com 0,005 a 6 mm de comprimento (Arditti, 1992). Produzem uma grande quantidade de sementes, porém menos de 5% germina em condições naturais (Corrie & Randon 1993). As sementes são destituídas de endosperma (Dressler 1993, Clements 1999), necessitando de fungos micorrízicos para germinar nas condições naturais (Harrison 1977). As sementes geralmente apresentam um padrão bastante uniforme de germinação e desenvolvimento, iniciando-se por intumescimento da semente, que rompe o tegumento seminal, e libera o embrião, desenvolvendo-se uma estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, denominada protocormo (Arditti 1992).

Dessa forma uma ferramenta de grande utilidade para a conservação de orquídeas ameaçadas de extinção, bem como produção de mudas de alta qualidade, é a propagação *in vitro*, já que as sementes podem germinar sem nenhum tipo de relação simbiótica, pois os nutrientes necessários para o desenvolvimento do embrião já estão

presentes no meio de cultura, apresentando, desta forma, um alto potencial de produção de plantas (Arditti *et al.* 1990). A micropropagação tem sido utilizada no Brasil para aumentar a produção de mudas, reduzindo seu custo e contribuindo para sobrevivência das espécies de orquídeas em extinção (Stancato *et al.* 2001). Conforme citam Withers & Williams (1998), técnicas de cultivo *in vitro* são ferramentas importantes para a conservação de germoplasma vegetal, evidenciado pelas oportunidades que se criam para compreender, utilizar e conservar recursos genéticos de plantas. Guerra & Dal Vesco (2010) ressaltam que estas técnicas são úteis para conservação dos recursos genéticos vegetais especialmente para as espécies ameaçadas de extinção. Nesse sentido, enfatiza-se a importância de métodos eficazes de reprodução e de propagação, visando minimizar as perdas, manter a variabilidade genética e favorecer o repovoamento.

Um dos maiores obstáculos para a aplicação dos procedimentos de micropropagação é a dificuldade de transferir com sucesso mudas da condição *in vitro* para *ex vitro*, devido à grande diferença entre as duas condições ambientais (Hazarika 2006, Chandra *et al.* 2010, Kumar & Rao 2012). Isso pode ser um fator limitante, devido à morte das plantas, ocasionada principalmente pela perda excessiva de água e mudança de metabolismo heterotrófico para autotrófico (Barboza *et al.* 2006). O metabolismo heterotrófico decorre do fato de que o meio de cultura proporciona as condições necessárias às plantas, dispensando a fotossíntese.

Segundo George & Debergh (2008), quando o meio de cultura é suplementado com sacarose, ou outra fonte de carbono, as mudas micropropagadas apresentam baixas taxas fotossintéticas, o que resulta num cultivo mixotrófico (fotomixotrófico). Pospíšilová *et al.* (1999) ressaltam que durante as fases da cultura *in vitro*, as plantas crescem sob condições especiais de redução das trocas gasosas, alta umidade do ar, baixa intensidade luminosa e uso de açúcar como fonte de energia. Estas condições podem causar inibição da fotossíntese, estômatos anormais, dificultando a aclimatização, proporcionando perdas elevadas de plantas na transferência para as condições *ex vitro*.

Quando transferidas para a aclimatização<sup>1</sup>, plantas enraizadas *in vitro* são submetidas a uma condição de alta transpiração, que associada

---

<sup>1</sup> Aclimatização e aclimação são termos que apresentam conotações diferentes. Aclimatização refere-se à transferência de plântulas *in vitro* para um ambiente protegido, como em casas de vegetação com telados (ambiente controlado), sendo esse um processo basicamente artificial. A aclimação representa a fase seguinte do processo de adaptação que ocorre, essencialmente, em ambiente natural (Guerra & Nodari 2006). Guerra, M. P.; Nodari, R. O. **Material didático de apoio à disciplina de Biotecnologia**. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina. 2006.

à alta condutividade hídrica, provoca baixa funcionalidade ou ausência de controle sobre o fechamento dos estômatos (Sutter 1988). De acordo com Costa *et al.* (2009), é necessário um período de aclimatização, em razão de alterações fisiológicas e anatômicas, que podem influenciar processos associados principalmente à fotossíntese e às trocas gasosas.

Como estratégias adaptativas, as plantas aclimatizadas devem desenvolver mecanismos de controle da transpiração (Diaz-Perez *et al.* 1995, Pospisilová *et al.* 1999), ativar os mecanismos de controle de perda de água pelas células (Sutter 1988) e aumentar a taxa fotossintética em condições de atmosfera mais rica em CO<sub>2</sub> (Vantelgen *et al.* 1992). Estas estratégias podem ser constatadas pela observação de características estruturais dos órgãos vegetativos (folhas e raízes) em diferentes condições ambientais (*in vitro* e *ex vitro*).

A epiderme foliar pode apresentar modificações estruturais como resposta aos fatores ambientais (Cutter 1978). Nesse sentido, muitas investigações têm concentrado atenção à variação na estrutura celular e intracelular, à espessura da epiderme e cutícula, aos depósitos de ceras epicuticulares e à densidade estomática.

A deposição de ceras epicuticulares constitui importante estratégia para o equilíbrio hídrico (Dickison 2000; Larcher 2000). A perda excessiva de água durante a aclimatização é resultado da reduzida formação de ceras epicuticulares em plantas oriundas do cultivo *in vitro* (Sutter & Langhans 1982, Sciutti & Morini 1995). Assim, o sucesso da aclimatização depende, entre outros fatores, da capacidade da planta em aumentar a deposição de ceras. Diversos estudos, entre eles Sandoval *et al.* (1994), constataram que em folhas de bananeira, na condição *in vitro*, apresentavam reduzida formação de ceras, porém quando transferidas para condição *ex vitro*, a deposição aumentou, constituindo uma camada mais espessa e melhor distribuída.

Os estômatos, estruturas responsáveis pela transpiração, podem ser amplamente influenciados pelas condições ambientais, as quais determinam alterações no desenvolvimento estomático. Os estômatos podem minimizar a perda excessiva de água alterando sua densidade (Murtaza & Paul 1989) ou reduzindo o tamanho das células e do poro estomático (Abrans *et al.* 1992). A distância entre os estômatos influencia na transpiração, sendo que a maior proximidade entre os estômatos leva à redução da transpiração (Larcher 1995), assim favorecendo a economia hídrica.

Aspectos estruturais do mesofilo podem também refletir as variações das condições ambientais no processo de aclimatização. A

acumulação de água nos tecidos é importante estratégia de evitar a dessecação (Larcher 1995, Bacelar *et al.* 2004), protegendo a planta de uma desidratação súbita ou murcha severa das folhas (Larcher 1995). Hazarika (2006) refere que as folhas desenvolvidas *in vitro* apresentam o mesófilo e o sistema vascular simplificado, quando comparados com as folhas desenvolvidas em casa de vegetação. Em estudo ultraestrutural, Wetzstein & Sommer (1982) observaram que o cultivo *in vitro* de *Liquidambar styraciflua* L. levou a formação de cloroplastos sem organização normal de grana, com membranas internas (tilacóides) arranjadas irregularmente, plastoglóbulos osmiofóbicos e ocasionalmente com grânulos de amido, enquanto os cloroplastos de plantas aclimatizadas ou desenvolvidas a campo apresentaram grana desenvolvida, glóbulos osmiofílicos e frequentemente com grânulos de amido. Ziv & Chen (2008), ao estabelecer uma comparação anatômica e histológica entre plantas de diversas espécies cultivadas *in vitro* e aclimatizadas *ex vitro*, destacam que os cloroplastos de culturas *in vitro* têm baixa clorofila, cloroplastos anormais não-funcionais e limitada formação de grana. Entretanto, aqueles formados nas plantas aclimatizadas mostram aumento do conteúdo de clorofila, cloroplastos normais e com típica estrutura de grana.

O crescimento e a adaptação de plantas a diferentes condições ambientais relacionam-se a sua eficiência fotossintética que, por sua vez, está associada, entre outros fatores, tais como teores de clorofila foliar (Batagin 2008). Assim, a determinação do conteúdo de pigmentos foliares, como ressaltam Lambers *et al.* (1998), representa importante ferramenta para a distinção entre tratamentos ou interação entre plantas e fatores ambientais.

Grout (1988) relata que existem dois tipos de plantas com relação à resposta fotossintética *in vitro*. Em um dos tipos, as folhas formadas *in vitro* nunca desenvolvem plenamente a capacidade fotossintética, e ao serem transferidas para casa de vegetação essas folhas servem como fonte de carbono para novas folhas e degeneram. Já o outro tipo de planta, seria aquela que possui folhas persistentes que se adaptam a condição *ex vitro* e vai aumentando a sua atividade fotossintética à medida que se adapta as condições ambientais naturais.

Com relação à estrutura das raízes de plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas *ex vitro* os estudos são bem mais restritos que para folhas, geralmente envolvem espécies arbóreas (Eudicotiledôneas ou Gimnospermas), nas quais se verifica a formação de câmbio vascular e periderme. Ziv & Chen (2008), comparando raízes sob estas duas

condições, mencionam várias características que em síntese refletem um maior desenvolvimento na condição *ex vitro*. Donnelly *et al.* (1985) observaram que raízes de *Rubus idaeus L.* cultivadas *in vitro* são delgadas e recobertas por pelos radiculares diferindo das raízes das plantas desenvolvidas sob condições naturais. McClelland *et al.* (1990) também observaram em plantas lenhosas que as raízes produzidas *in vitro* são fracas e pouco funcionais, com diâmetro mais reduzido, formando apenas tecidos vasculares primários, enquanto as raízes de plantas aclimatizadas *ex vitro* formaram câmbio vascular e tecidos vasculares secundários. Pesquisas comparando espécies de Monocotiledôneas, com formação de raízes adventícias (efêmeras e com vascularização apenas primária), os estudos são raros. Mayer *et al.* (2008), investigando raízes de *Cymbidium Hort.* (Orchidaceae), ressaltam que devido à estrutura anatômica delicada (diâmetro e sistema vascular reduzido) na condição *in vitro*, as plantas aclimatizadas cessaram o desenvolvimento das raízes formadas *in vitro* e novas raízes formaram-se.

Segundo Correia *et al.* (2012), é justamente na etapa da aclimatização que se viabiliza a metodologia de produção *in vitro* de plantas, pois é nela que se obtém o número de plantas aptas ao plantio, ou seja, maior sobrevivência de mudas com qualidade. Hazarika (2006) compila as características morfoanatômicas e fisiológicas já identificadas, em várias espécies, como de relevância para facilitar o desenvolvimento de protocolos eficientes para a transferência das plantas da condição *in vitro* para a condição *ex vitro*.

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos qualitativos e quantitativos de folhas e raízes de *Cattleya xanthina* e *C. velutina* (Orchidaceae) cultivadas *in vitro* e aclimatizadas *ex vitro*, de modo a observar a plasticidade estrutural, como resposta às novas condições de luz e umidade, no processo de aclimatização, assegurando a sobrevivência.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL E CULTIVO *IN VITRO*

Sementes de *Cattleya xanthina* e *Cattleya velutina* foram inoculadas, germinadas e plantas já multiplicadas foram obtidas a partir da coleção viva do Instituto de Botânica de São Paulo (IBt).

Estas plantas (Fig. 3a e 3b) foram mantidas (multiplicadas) *in vitro* por 180 dias em frascos (com capacidade de 100 mL) contendo 25mL de meio de cultura geleificado com ágar (0,7%), composto por MS (Murashige & Skoog 1962) modificado, apresentando metade da concentração dos macro e micronutrientes, adicionado de vitaminas de Morel (1951). O meio foi acrescido de  $20\text{gL}^{-1}$  de sacarose, isento de fitorreguladores, e suplementado com  $1,5\text{gL}^{-1}$  de carvão ativado (Synth). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, por 15min, a  $121^{\circ}\text{C}$  e 1,3atm. Todos os frascos foram fechados com tampa rosca e vedados com papel filme e incubados em sala de cultura com temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16h, a uma intensidade luminosa de  $50\text{-}60\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . O cultivo foi constituído por 16 frascos para *C.xanthina* e 12 para *C.velutina*, e foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV- CCA – UFSC).

### 2.2 ACLIMATIZAÇÃO - CULTIVO *EX VITRO*

Após o cultivo *in vitro*, as plantas (80 plantas- *C.xanthina*; 50 para *C.velutina*) foram transferidas para a pré-aclimatização (PAC) *ex vitro* em Fitotron como forma de simular a condição ambiental, mantendo a temperatura  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16h, umidade de aprox. 80% e intensidade luminosa de  $200\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , no Centro de Ciências Agrárias- UFSC, e mantidas nesta condição por um período de 60 dias. Inicialmente, as plantas foram lavadas em água corrente para retirada do meio de cultura e, posteriormente, transplantadas para bandejas com substrato formulado à base de casca de pinus, pó de coco, carvão e terra vegetal (1:1:1:2), as bandejas foram colocadas em caixas e recobertas com filme de polietileno transparente (atmosfera saturada) (Fig. 3c e 3d).

Após, as plantas foram aclimatizadas (AC) *ex vitro* em casa de vegetação (Fig.3e), no Departamento de Botânica, simulando o

ambiente natural da planta, com algumas variações, condições controladas de luminosidade e irrigação. Sendo coberta com sombrite 70%, intensidade luminosa de 1041,03 lux, mantendo sistema de irrigação acionado automaticamente duas vezes ao dia, 5 min pela manhã e 5 min pela noite. Devido às espécies em questão serem epífitas, optou-se por pendurá-las (Fig. 3e), para que não houvesse o encharcamento das raízes e apodrecimento. As mesmas foram colocadas sob uma pequena quantidade de esfagno (manter umidade sem excesso) e fixadas em pedaços de fibras de coco (Fig. 3f), e mantidas nesta condição por um período de 90 dias.



**Fig. 3.** Plantas de *Cattleya xanthina* (Orchidaceae) submetidas a diferentes condições de cultivo durante o desenvolvimento: **a-b** *in vitro*, utilizando substrato MS/2 em sala de crescimento. **c-d** pré-aclimatizadas *ex vitro*, sob condição de Fitotron em bandejas com substrato à base de casca de pinus, pó de coco e carvão vegetal em atmosfera saturada, por 60 dias. **e-f** aclimatizadas *ex vitro* em casa de vegetação, coberta com sombrite 70% e com irrigação automática duas vezes ao dia, fixadas em fibras de coco com esfagno, por 90 dias.

### 3 PREPARO DAS AMOSTRAS E PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE

#### 3.1 ESTUDOS MICROSCÓPICOS QUALITATIVOS

Foram realizadas coletas para as avaliações estruturais, aos 180 dias de cultivo *in vitro*, após 60 dias de pré-aclimatização *ex vitro* em Fitotron e após 90 dias de aclimatização *ex vitro* em casa de vegetação. Foram coletadas, de cada espécie, nove folhas expandidas, sendo a terceira folha da base para o ápice, e nove raízes adventícias a partir de indivíduos distintos.

Foi utilizado o terço médio das lâminas foliares, em seções transversais, na porção central entre bordos; e seções transversais de raízes adventícias distante 2 cm da base.

Foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2 lavadas no mesmo tampão e desidratadas em série até etanol 70° GL (Ruzin, 1999).

##### 3.1.1 Microscopia Óptica

Para os estudos histológicos, as amostras conservadas em etanol 70°GL foram desidratadas em série até etanol 96°GL e infiltradas em hidroxietilmetacrilato (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha), conforme Gerrits & Smid (1983). Seções de 5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo RM 2125 RT (Leica, Nussloch, Alemanha) e distendidas sobre lâminas contendo água em chapa aquecedora (42° C). Em seguida, as lâminas foram coradas com azul de toluidina em tampão fosfato 0,2M a pH 6,8 (O'Brien *et al.* 1965) para caracterização histológica e também para identificar lignina (reação mostra paredes lignificadas esverdeadas). Para identificar substâncias

lipofílicas (como cutina e ceras epicuticulares) foi utilizado o reagente sudan III (Costa, 1982). Lâminas permanentes foram confeccionadas com verniz vitral incolor 500® (Paiva *et al.* 2006) e as imagens foram capturadas com microscópio óptico DM 2500 (Leica, Wetzlar, Alemanha), equipado com câmera DFC 295 (Heerbrugg, Alemanha) e software (Leica Application Suite 3.7.0, Suíça).

### **3.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura**

Amostras conservadas em etanol 70°GL foram desidratadas até 100°GL e submetidas à secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub> EM-CDP-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha), conforme metodologia de Horridge & Tamm (1969). Após, as amostras secas foram montadas sobre suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face e recobertas por uma camada de 30nm de ouro paládio em metalizador EM SCD 500 (Leica, Viena, Áustria). As imagens foram capturadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol XL30 (Tokio, Japão).

### **3.1.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Amostras foram retiradas da porção mediana de quatro folhas de cada tratamento, fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, em pH 7,2, após lavagem na mesma solução tampão, foram pós-fixadas em Tetróxido de ósmio, seguindo com a desidratação e infiltração em resina Spurr (Bozzola & Russel 1991). O material foi seccionado em ultramicrotomo UC7 (Leica, Viena, Áustria) alocado sobre grades de cobre contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo. O material foi observado e documentado em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol JEM-1011 (Tokio, Japão).

## **3.2 ESTUDOS QUANTITATIVOS**

### **3.2.1 Espessuras dos tecidos de folha e raiz**

Para determinação da espessura dos tecidos foram utilizadas nove repetições por tratamento, cada repetição foi constituída de mensurações de 12 seções.

Foi considerada a espessura do mesofilo (Fig. 4a), epiderme - face abaxial (Fig. 4b) e adaxial - e cutícula separadamente com aplicação do reagente sudan III (Costa 1982). Para raiz foi considerada a espessura do córtex, cilindro central e velame.

Também foi realizada a medida da espessura total em folhas e raízes frescas, com uso de micrômetro digital.

De cada seção analisada, em microscópio óptico DM 2500 (Leica, Wetzlar, Alemanha), foram capturadas imagens com câmera DFC 295 (Heerbrugg, Alemanha). As estruturas foram mensuradas, a partir de imagens adquiridas com o auxílio do software (Leica Application Suite 3.7.0, Suíça).

### **3.2.2 Densidade estomática**

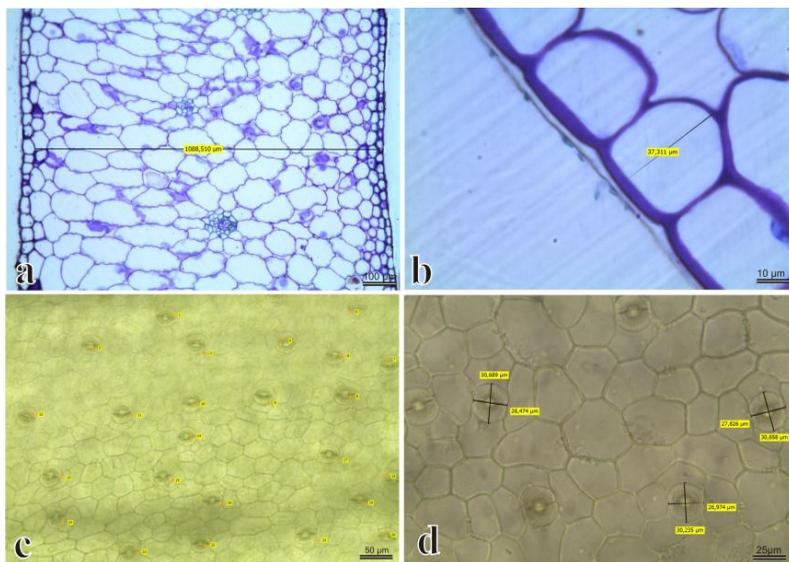
Para a determinação da densidade estomática foi selecionado o terço médio das folhas, utilizadas para a extração dos pigmentos foliares, sendo feito a confecção de lâminas semipermanentes, com gelatina glicerina (Gerlach 1984). Foram feitas nove repetições por tratamento, cada repetição cinco campos visuais por lâmina.

As análises foram realizadas com o auxílio do software (Leica Application Suite 3.7.0, Suíça), a partir de imagens (Fig. 4c) adquiridas em microscópio óptico DM 2500 (Leica, Wetzlar, Alemanha), equipado com câmera DFC 295 (Heerbrugg, Alemanha) numa área total conhecida, no aumento de (200x). Para estimar o número de estômatos por  $\text{mm}^2$  da folha foi determinada a razão entre o número total de estômatos pela área total estabelecida.

### **3.2.3 Dimensões dos estômatos**

Para a determinação das dimensões dos estômatos, em vista frontal da superfície epidérmica, foi considerado o diâmetro polar e equatorial (Fig. 4d). Foram empregadas nove repetições por tratamento, cada repetição com mensurações de cinco estômatos.

As dimensões foram obtidas utilizando o software (Leica Application Suite 3.7.0, Suíça), a partir de imagens adquiridas em microscópio DM 2500 (Leica, Wetzlar, Alemanha), equipado com câmera DFC 295 (Heerbrug, Alemanha), no aumento de (400x).



**Fig. 4** Imagens de *Cattleya xanthina* (Orchidaceae) obtidas em microscópio DM 2500 equipado com câmera DFC 295, com a utilização do software Leica Application Suite, para determinação dos dados quantitativos da lâmina foliar: a-b seções transversais da lâmina foliar para medidas da espessura do mesofilo (a) e espessura da epiderme (b) c-d seções paradérmicas da face abaxial para determinação da densidade estomática (c) e medidas do diâmetro polar e equatorial dos estômatos (d).

### 3.2.4 Suculência foliar

Para a suculência foliar foram utilizadas 10 folhas por tratamento.

As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos umedecidos e mantidos em refrigerador, a 4°C, por 12 horas, para permitir a embebição de água (Araus & Hogan 1994). Posteriormente, foi determinada a massa fresca máxima (MFM) das folhas. A seguir, as folhas foram colocadas em estufa, a 60°C, por um período superior à 48h para obter uma massa seca constante (MS). A área foliar (A) foi

determinada com o uso do medidor de área foliar portátil AM 300 ADC Scientific (Hoddesdon, Inglaterra). Foi adotada a fórmula proposta por Mantovani (1999) para determinação da suculência foliar:  $SF = (MFM - MS) / A$ .

### 3.2.5 Extração e dosagem de clorofilas

Para medidas do teor de clorofila foram utilizadas cinco repetições, para cada tratamento. Amostras de 100 mg de folhas frescas foram maceradas em Nitrogênio líquido e incubadas em banho-maria com 7 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) por duas horas a 65°C. Após filtragem, o volume total foi corrigido para 10 mL. Os valores foram obtidos por meio de espectrofotometria considerando-se a densidade ótica medida a 480 nm, 649 nm e 665 nm, conforme descrito por Hiscox & Israelstam (1979). Foram utilizadas as fórmulas de Wellburn (1994), sendo os dados expressos em mg/g de matéria fresca:

Clorofila a =  $[12,19 * (A_{665}) - 3,45 * (A_{649})]$ ;

Clorofila b =  $[21,99 * (A_{649}) - 5,32 * (A_{665})]$ ;

A clorofila total foi determinada a partir da soma da “Chl a” e “Chl b”.

### 3.2.6 Análises estatísticas

Foi avaliada a normalidade dos dados com o teste Shapiro-Wilk. Após, foram aplicadas transformações, quando necessário, e os dados obtidos foram comparados por análise de variância ANOVA (one-way), seguido por teste Tukey ( $p < 0.05$ ), quando paramétricos ou por análise Kruskal-Wallis seguido de teste Dunn, quando não paramétricos, através dos programas computacionais Assistat versão 7.7 beta (Silva & Azevedo 2009) e BioEstat 5.0, respectivamente. Correlação de Pearson (Statistica 7.0)

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos estruturais apresentados por folha e raízes na transferência da condição *in vitro* para *ex vitro*, pelas espécies em estudo, são descritos e discutidos separadamente por espécie.

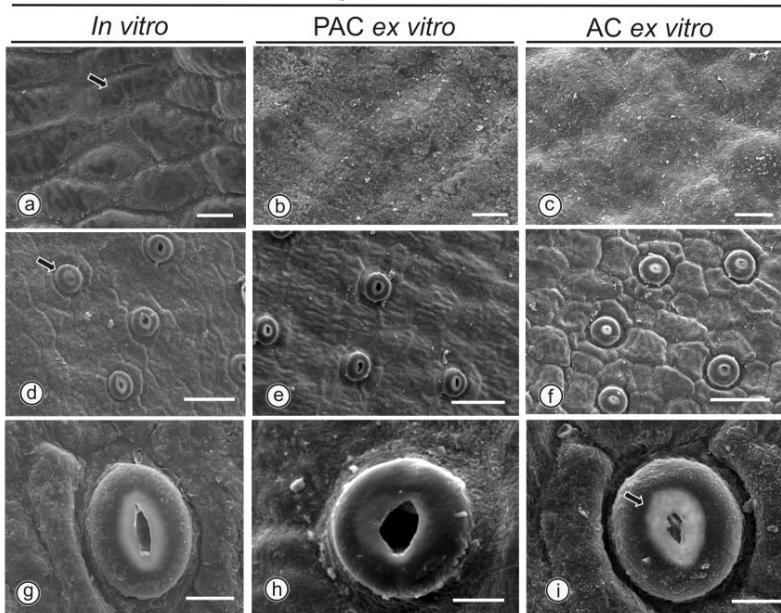
## 4.1 *Cattleya xanthina* (Lindl.) Van den Berg

### 4.1.1 Folha

A superfície epidérmica, na condição *in vitro*, apresentou face adaxial contendo células com a parede periclinal externa levemente convexa e ornamentações epicuticulares estriadas (Fig. 5a). Na condição *ex vitro* (Fig. 5b, 5c), tanto em plantas PAC quanto nas AC, a convexidade das paredes celulares acentuou-se e ocorreu deposição de ceras epicuticulares, mais conspícuas nas plantas AC.

Os estômatos (Fig. 5d-f) mostraram-se restritos à face abaxial, dessa forma, classificou-se a folha como hipoestomática, com estômatos do tipo tetracítico (Fig. 4d). Na condição *in vitro*, os estômatos exibiram forma elíptica (Fig. 5d, 5g), porém quando em condição *ex vitro* tornaram-se mais esféricos (Fig. 5e-f, 5h-i), decorrente do aumento do diâmetro equatorial e manutenção do diâmetro polar (Tab. 1). Na condição *in vitro*, a maioria dos estômatos já evidenciava rompimento de cutícula na região do poro, porém alguns ainda mantinham o poro estomático obliterado pela cutícula (Fig. 5d, seta). Na condição PAC, o poro estomático apresentou-se amplo e sem borda cuticular (Fig. 5h), enquanto, na condição AC, a borda cuticular manteve o poro estomático parcialmente obliterado (Fig. 5i, seta). A densidade estomática manteve-se nas três condições ambientais (Tab.1).

## Condição Ambiental



**Fig. 5** Eletromicrografia de varredura da superfície epidérmica de *C.xanthina*: **a** aspecto geral da face adaxial; parede periclinal externa levemente convexa com ornamentações epicuticulares estriadas (seta) **b-c** convexidade e deposição de ceras epicuticulares mais acentuada; Barras = 20  $\mu$ m. **d-f** aspecto geral da face abaxial, *in vitro* alguns estômatos ainda não evidenciavam cutícula rompida (seta), *ex vitro* todos os estômatos com cutícula rompida; Barras = 50  $\mu$ m. **g** detalhe dos estômatos mais elípticos **h-i** mais esféricos **h** poro estomático amplo e sem borda cuticular **i** borda cuticular mantendo o poro parcialmente obliterado (seta) Barras = 10  $\mu$ m.

Tabela 1: Dados quantitativos dos estômatos em *C.xanthina* cultivadas *in vitro* e *ex vitro*

Condição Ambiental	Diâmetro Equatorial ( $\mu$ m)	Diâmetro Polar ( $\mu$ m)	Densidade Estomática ( $\text{mm}^2$ )
<i>In Vitro</i>	28,4 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	29,8 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	76,2 $\pm$ 11,9 <sup>a</sup>
PAC. <i>Ex vitro</i>	31,5 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	30,2 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	67,8 $\pm$ 14,4 <sup>a</sup>
AC. <i>Ex vitro</i>	31,2 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	30,5 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	62,6 $\pm$ 8,8 <sup>a</sup>

Os dados representam à média ( $\pm$  DP). Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

A epiderme, em ambas as faces, mostrou-se uniestratificada (Fig. 6a-c), apresentando a parede periclinal externa espessa e revestida por cutícula (Fig. 6d, 6d-j).

Observou-se um grande número de plasmodesmas entre as células epidérmicas (Fig. 6d). As células epidérmicas mantiveram a espessura na face adaxial, entretanto na PAC ocorreu uma elevação na espessura em relação à condição *in vitro*, porém, na AC, a espessura apresentou valores intermediários às outras duas condições (Tab. 2). Na condição de PAC, na face adaxial, a espessura da cutícula não se alterou na face abaxial, porém, na face adaxial, na condição de PAC verificou-se uma menor espessura que nas condições *in vitro* e AC (Tab. 2).

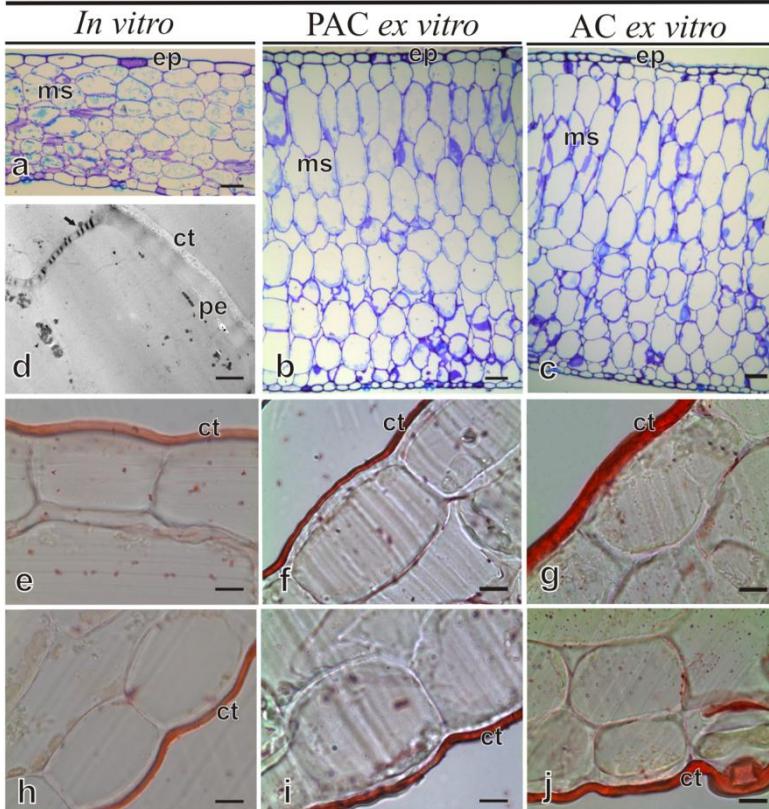
O mesofilo mostrou-se constituído por células parenquimáticas clorofiladas, com células mais compactas adaxialmente e com presença de espaços intercelulares mais conspícuos na face abaxial (Fig. 6a-c). Nas condições de cultivo *ex vitro* (PAC e AC), o mesofilo, assim como a folha fresca, apresentou maior espessura do que na condição *in vitro* (Tab. 2), refletindo a alteração estrutural da constituição histológica. Nas condições *ex vitro*, o mesofilo apresentou-se com células mais alongadas, adaxialmente, e maior número de camadas celulares, evidenciando uma tendência à dorsiventralidade (Fig. 6b-c).

Tabela 2: Dados quantitativos da lâmina foliar de *C.xanthina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*.

Condição Ambiental	<i>In Vitro</i>	PAC. <i>Ex vitro</i>	AC. <i>Ex vitro</i>
Epiderme Face adaxial (µm) *	32,12 ± 5,94 <sup>a</sup>	38,17 ± 2,11 <sup>a</sup>	36,80 ± 2,64 <sup>a</sup>
Epiderme Face abaxial (µm)	27,41 ± 5,03 <sup>b</sup>	32,61 ± 1,65 <sup>a</sup>	29,33 ± 1,96 <sup>ab</sup>
Cutícula Face adaxial (µm)	3,78 ± 0,98 <sup>a</sup>	2,60 ± 0,51 <sup>b</sup>	3,78 ± 0,91 <sup>a</sup>
Cutícula Face abaxial (µm)	4,32 ± 1,54 <sup>a</sup>	4,32 ± 1,03 <sup>a</sup>	4,50 ± 1,09 <sup>a</sup>
Mesofilo (µm)	281,80 ± 109,32 <sup>b</sup>	709,04 ± 227,70 <sup>a</sup>	841,76 ± 307,48 <sup>a</sup>
Espessura Folha (mm)	0,79 ± 0,19 <sup>b</sup>	1,19 ± 0,22 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,22 <sup>a</sup>

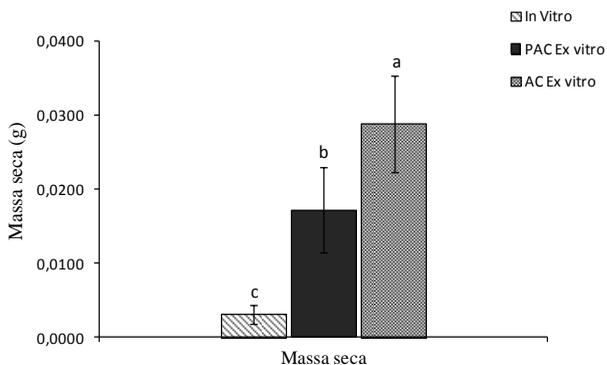
Os dados representam à média (± DP). Letras diferentes comparadas horizontalmente indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, pelo teste de Tukey (paramétrico) ou Dunn\* (não-paramétrico) ( $p < 0.05$ ).

## Condição Ambiental



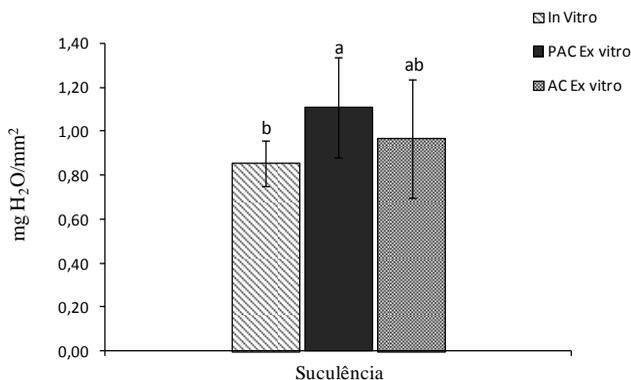
**Fig. 6** Fotomicrografias de seções transversais de lâmina foliar de *C. xanthina*: **a-b-c** Mesofilo, delimitado por epiderme, tendendo a homogeneidade celular, na condição *in vitro*, e com células alongadas na face adaxial nas condições *ex vitro*. Barras=50  $\mu$ m. **d** Eletromicrografia de transmissão de células epidérmicas com parede periclinal externa (Pe) espessa revestida por cutícula (Ct); numerosos plasmodesmas (seta). Barra = 5  $\mu$ m. **e-j** epiderme evidenciando a cutícula com reação positiva ao sudan III Barras =10  $\mu$ m. **e-g** face adaxial. **h-j** face abaxial.

As folhas de *C. xanthina* apresentaram maior massa seca à medida que as plantas foram sendo aclimatizadas (Fig. 7).



**Fig. 7:** Massa seca foliar em *C.xanthina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5% ( $p < 0.05$ ) N=10. Barras = DP.

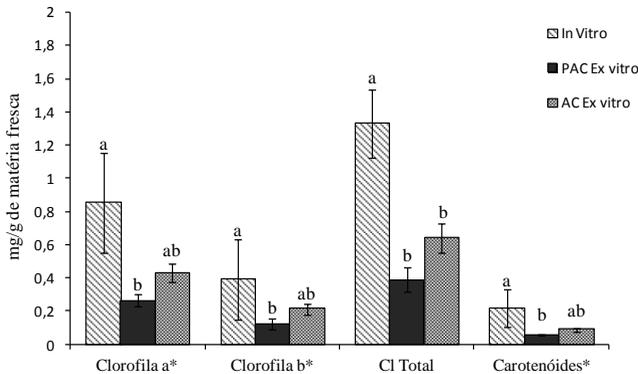
Os valores para a suculência foliar mostraram diferenças somente entre a condição *in vitro* e PAC (Fig.8).



**Fig. 8:** Suculência Foliar em *C.xanthina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5% ( $p < 0.05$ ). N=10. Barras = DP.

As determinações quantitativas de clorofila por grama de matéria fresca apresentaram os teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides com a

mesma quantificação no cultivo *in vitro* e na AC, a diferença ocorreu entre a condição *in vitro* e PAC; a clorofila total foi maior na condição *in vitro* do que nas condições *ex vitro* (Fig.9).



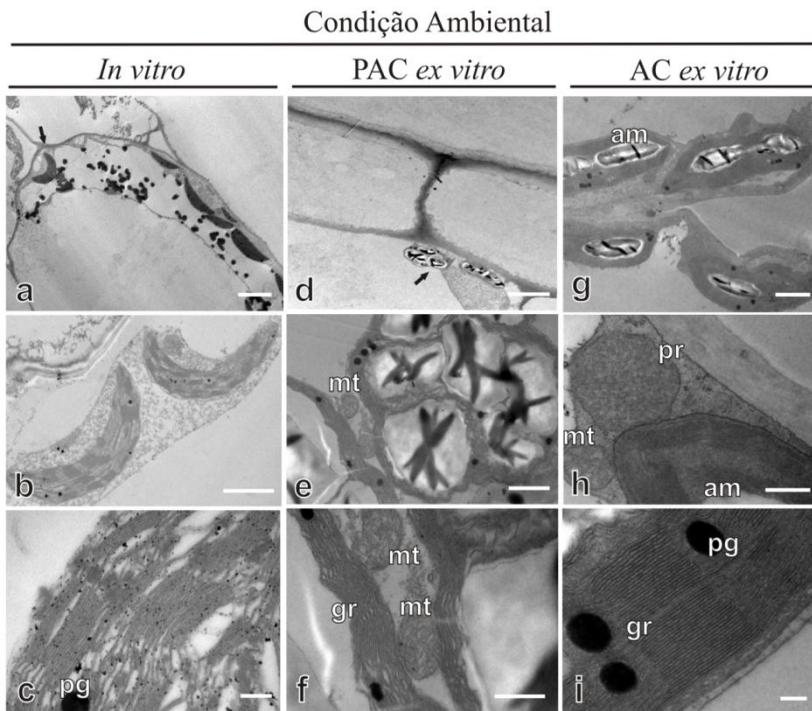
**Fig. 9:** Concentração de clorofila *a*, *b*, total, e carotenoides na lâmina foliar de *C.xanthina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre as médias, de cada condição de cultivo, para cada clorofila, teste de Tukey (paramétrico) ou Dunn\* (não-paramétrico) ( $p < 0.05$ ). Barras = DP.

Os cloroplastos de *C. xanthina* na condição de cultivo *in vitro* mostraram-se recurvados, com tilacoides organizados irregularmente, formando grana pouco desenvolvida (Fig. 10a-c). Alguns plastoglóbulos osmiofílicos foram observados nos cloroplastos sob esta condição de cultivo (Fig.10c).

Na condição de PAC, nas células parenquimáticas subepidérmicas foram registrados muitos amiloplastos (Fig. 10d-e), com tilacoides entre os grânulos de amido e grana praticamente só presente perifericamente no plasto (Fig. 10e-f). Entre os amiloplastos ainda foram constatadas mitocôndrias (Fig. 10f).

Na condição de AC, os cloroplastos apresentam grânulos de amido (Fig. 10g), em menor quantidade e tamanho que na condição PAC, por isto não caracterizado como amiloplastos. Os tilacoides mostraram-se bem organizados e com grana bem desenvolvido (Fig. 10h-i). Como na condição *in vitro*, também foram constatados

plastoglóbulos. Próximo aos cloroplastos visualizou-se a presença de peroxissomos (Fig.10 h) e muitas mitocôndrias.



**Fig. 10** Eletromicrografias de transmissão de seções transversais de lâmina foliar de *C.xanthina* cultivadas *in vitro* e *ex vitro*: **a-b-c** observam-se cloroplastos recurvados (seta), organização das membranas internas irregulares, com grana pouco desenvolvida. Barras a= 5 $\mu$ m; b=1 $\mu$ m; c= 0,2 $\mu$ m. **d-e-f** amiloplastos (seta) mitocôndrias (mt) entre amiloplastos e grana (gr) presente perifericamente no plasto. Barras d= 5 $\mu$ m; e=1 $\mu$ m; f= 0,5  $\mu$ m. **g-h-i** os cloroplastos apresentam grânulos de amido (am), estruturação dos tilacoides em grana bem desenvolvidos, mitocôndrias e peroxissomos (pr) próximos aos cloroplastos e presença de plastoglóbulo (pg). Barras g= 2 $\mu$ m; h=0,5 $\mu$ m; i= 0,2 $\mu$ m.

### 4.1.2 Raiz

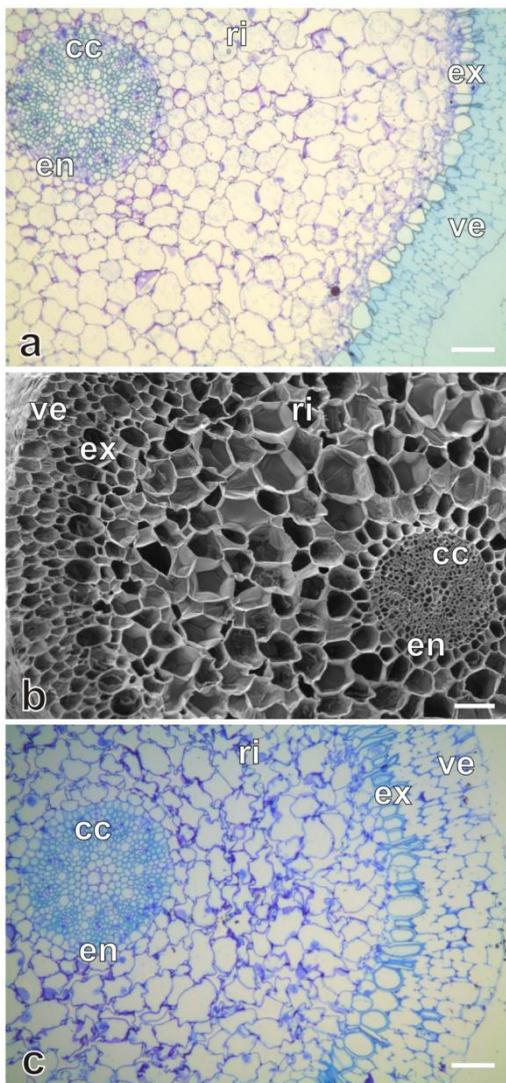
A raiz mostrou-se constituída por tecido de revestimento (velame), córtex e cilindro central, nas três condições de cultivo (Fig.11 a-c).

O velame apresentou-se constituído por quatro a cinco camadas de células alongadas radialmente (Fig. 12a-c), com barras de espessamento (Fig. 12b seta) nas paredes celulares.

No córtex, distinguiram-se exoderme, região intermediária e endoderme (Fig 12d-e). A exoderme estava formada por células alongadas radialmente, com parede periclinal externa e anticlinais espessadas, mais evidente nos tratamentos *ex vitro* (Fig. 12e, 12c) do que *in vitro* (Fig. 12a). Registraram-se, ainda, células de passagem na exoderme, com protoplasto denso e numerosos vacúolos (Fig. 12a, 12c, 12e). A região intermediária, constituída por células parenquimáticas (Fig. 12d-f), mostrou paredes plicadas na região mais externa (adjacente à exoderme, Fig. 12a, 12c seta) e com espaços intercelulares, mais conspícuos nas condições *ex vitro* (Fig 12e-f ponta de seta) do que *in vitro* (Fig. 12d). A endoderme exibiu espessamento em “O” nas paredes celulares, pouco evidente na condição *in vitro* (Fig. 12g), porém mais conspícuo nas condições *ex vitro* (Fig. 12 h-i). Células de passagem (Fig. 12g-i) foram observadas adjacentes aos polos de protoxilema.

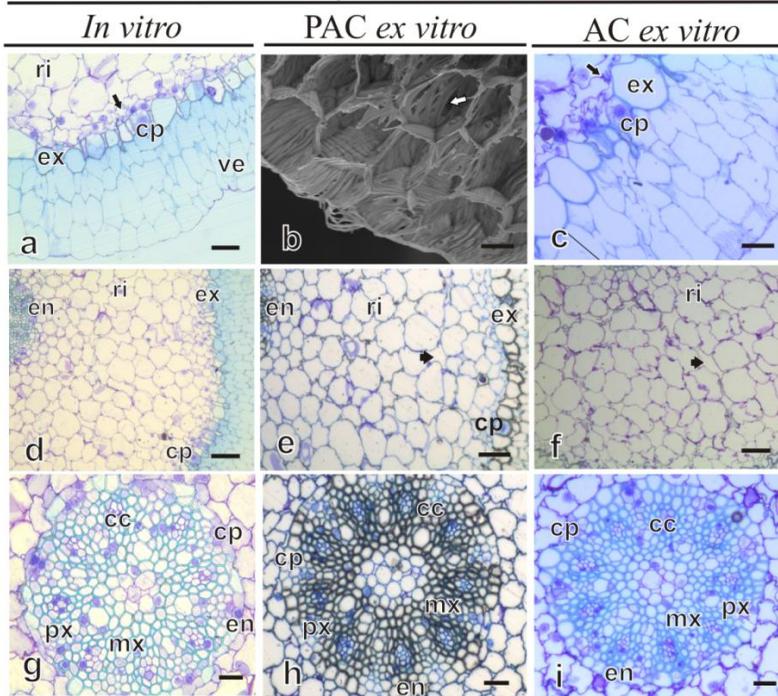
O cilindro central apresentou-se poliarco com medula parenquimática (Fig. 12g-i). Constatou-se, com base nas observações de várias amostras de seções transversais de raízes, que *in vitro* ocorrem de sete a nove elementos traqueais de metaxilema, havendo um incremento vascular nas condições *ex vitro*, elevando este número a onze elementos traqueais.

A raiz teve o diâmetro aumentado nas condições *ex vitro*, determinado pela expansão do córtex, visto que o velame e o cilindro central não apresentaram diferenças na espessura (Tab. 3).



**Fig. 11** Fotomicrografias de seções transversais de raízes de *C.xanthina* constituída por tecido de revestimento velame, córtex e cilindro central poliarco (a) Cultivo *in vitro* (b) pré-aclimatizada *ex vitro* em Fitotron (c) aclimatizada *ex vitro* em casa de vegetação. Barras = 100  $\mu$ m. ve-velame; ex-exoderme; ri-região intermediária; en-endoderme; cc- cilindro central.

## Condição Ambiental



**Fig. 12** Fotomicrografias de seções transversais das raízes de *C.xanthina*: **a-b-c** velame (ve) constituído por quatro a cinco camadas de células alongadas longitudinalmente e paredes com barras de espessamento (seta) Barras= 50µm. **d-e-f** Córtex constituído de exoderme (ex), região intermediária (ri), endoderme (en); a exoderme apresenta células mais alongadas com paredes periclinal externa e anticlinal espessadas, mais evidente nos tratamentos *ex vitro*; células de passagem (cp) com protoplasto denso e com vários vacúolos; região intermediária (ri) com paredes plicadas na região mais externa adjacente à exoderme (a,c seta); com espaços intercelulares, mais conspícuos nas condições *ex vitro* (ponta de seta) Barras= 100 µm **g-h-i** a endoderme (en) exibiu espessamento em “O” nas paredes celulares pouco evidente *in vitro*, mais conspícuo nas condições *ex vitro*; células de passagem (cp) adjacentes aos polos de protoxilema (px); o cilindro central (cc) *in vitro* apresenta sete a nove elementos traqueais do metaxilema (mx), aumentando na condição *ex vitro*. Barras= 25 µm.

Tabela 3: Dados quantitativos da raiz de *C.xanthina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*.

Condição Ambiental	<i>In Vitro</i>	PAC. <i>Ex vitro</i>	AC. <i>Ex vitro</i>
Tecido Revestimento (µm)	176,60 ± 22,48 <sup>a</sup>	184,18 ± 21,83 <sup>a</sup>	187,42 ± 31,63 <sup>a</sup>
Cortéx (µm)	593,13 ± 40,61 <sup>b</sup>	732,23 ± 69,73 <sup>a</sup>	709,05 ± 101,46 <sup>a</sup>
Cilindro Central (µm)	266,66 ± 43,21 <sup>a</sup>	257,35 ± 32,98 <sup>a</sup>	246,23 ± 45,66 <sup>a</sup>
Diâmetro Raiz (mm)	1,85 ± 0,21 <sup>b</sup>	2,19 ± 0,27 <sup>a</sup>	2,26 ± 0,17 <sup>a</sup>

Os dados representam à média (± DP). Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

#### 4.1.1.1 Folha

Durante o cultivo *in vitro*, as plantas desenvolveram-se em condições de baixa luminosidade, alta umidade e com fonte de carbono no meio de cultura. Esses fatores ressaltam Hazarika (2003), contribuem para o desenvolvimento de um fenótipo que não sobrevive às condições ambientais se transferidos diretamente para o campo. Portanto, complementa o autor, as características fisiológicas e anatômicas de plantas micropropagadas exigem que elas sejam gradualmente aclimatizadas ao ambiente (estufa ou campo). Resultados positivos no processo de aclimatização irão depender da plasticidade morfoanatômica e fisiológica da espécie. Uma maior plasticidade das espécies está relacionada, entre outros fatores, a respostas às alterações da intensidade luminosa do ambiente sobre a estrutura e disposição dos componentes da lâmina foliar (Strauss-Debenedetti & Berlyn 1994, Oguchi *et al.* 2003, Silva *et al.* 2010). Diversos autores (Haberlandt 1914, Volgeman & Martin 1993, Vogelmann *et al.* 1996, Silva *et al.* 2010) relacionam a curvatura da parede periclinal externa à capacidade de captura de luz, aumentando a probabilidade de interceptação pelos cloroplastos e utilização no processo fotossintético. Em *C. xanthina* observou-se que a convexidade acentuou-se nas paredes periclinais das células da epiderme adaxial, nas condições *ex vitro*, possivelmente contribuindo na intensificação da captura da luz difusa que chega à lâmina foliar e amplificando a transmissão da mesma ao clorênquima.

Depósitos de ceras epicuticulares auxiliam na reflexão do excesso de irradiação solar, impermeabilizando a epiderme, de modo a reduzir a perda hídrica interna, e, também, exercendo controle sobre a quantidade de luz que segue para o interior da folha (Fahn 1978, Reed & Tukey

1981, Gutschick 1999, Dickison 2000). Na condição *ex vitro*, a presença de ceras epicuticulares deve ter contribuído no processo de aclimatização, evitando a perda excessiva de água nesta condição de transferência. A redução na espessura da cutícula na face adaxial, na condição de PAC, considerada isoladamente poderia contrariar o esperado, porém constatou-se um maior investimento em ceras epicuticulares, acentuando-se mais na condição de AC, favorecendo o controle hídrico e de luz para uma aclimatização que assegurasse a sobrevivência.

Outra estratégia observada em *C. xanthina*, na condição de AC, para evitar a perda excessiva de água, foi a presença de borda cuticular no poro estomático, criando um microclima entre o interior e exterior da folha, devido à mesma estar mais exposta às condições naturais de menor umidade do ar e maior irradiação solar. Estômatos posicionados na face abaxial da lâmina foliar, bem como aprofundados e/ou constituindo depressões da superfície através de papilas ou outras ornamentações cuticulares podem favorecer a redução da perda hídrica durante a abertura estomática em ambientes secos (Wilkinson 1979, Fahn & Cutler 1992, Dickison 2000, Larcher 2000). Fermino Jr. *et al.* (2004) referem a existência de franja cuticular, obliterando parcialmente o poro estomático, como adaptação ao excesso de exposição à irradiação solar em espécie florestal pioneira. Dessa forma, a maior dimensão do poro observada na PAC, ocasionada pelo aumento do diâmetro do estômato, foi compensada pelo avanço da cutícula reduzindo o poro na condição AC e, assim, exercendo um controle hídrico.

Dados da literatura indicam que a estrutura dos estômatos de plantas cultivadas *in vitro* apresentam defeitos estruturais, não possuindo ou perdendo constituintes da parede celular (Gaspar *et al.* 1987). Alguns estudos referem que as paredes celulares não apresentavam orientação normal de microfibrilas de celulose típicos de células-guarda de plantas cultivadas a campo (Ziv *et al.* 1987, Marin *et al.* 1988, Ziv & Ariel 1992, 1994) e dessa forma os estômatos mantinham-se abertos na transferência para a condição *ex vitro*, tornando as plantas mais suscetíveis à desidratação. Em *C. xanthina* observou-se alteração na forma dos estômatos entre as distintas condições de cultivo, o que pode ter determinado a abertura do poro estomático ao passar da condição *in vitro* para *ex vitro*. A forma dos estômatos da espécie em estudo foi diferente dos dados da literatura, com estômatos arredondados nas condições *ex vitro* em decorrência do aumento do diâmetro equatorial. Os trabalhos geralmente relacionam

que folhas sadias de diferentes espécies, em condições *ex vitro* apresentam estômatos elípticos, e em folhas *in vitro* arredondados (Wetzstein & Sommer 1983, Blanke & Belcher 1989, Capellades *et al.* 1990, Ziv & Ariel 1994, Brutti *et al.* 2002, Khan *et al.* 2003, Hazarika 2006, Ziv & Chen 2008). Contudo, cada espécie e condição de cultivo podem apresentar um resultado específico.

Na espécie em estudo na condição de cultivo *in vitro* os estômatos estavam mais elípticos. Abrams *et al.* (1994) relacionam estômatos de maiores dimensões, com menor resistência estomática, permitindo maior influxo e assimilação de CO<sub>2</sub>. Nesse sentido, em *C. xanthina* possivelmente as maiores dimensões dos estômatos nas condições *ex vitro* favorecem maior captação de gás carbônico para a fotossíntese, agora num padrão metabólico exclusivamente autotrófico.

A maior intensidade luminosa nas condições de cultivo *ex vitro* (PAC e AC) de *C. xanthina* estimulou o alongamento das células do parênquima clorofilado, acentuando o aspecto em paliçada do mesófilo. De acordo com Lambers *et al.* (2008), o aumento da espessura do parênquima paliçádico é em grande parte devido à formação de células mais longas, fato que aumenta a superfície interna das células, gerando mais espaço para maior número de cloroplastos por unidade de área foliar. De acordo com Terashima *et al.* (1984), as células em paliçada atuam como guias de luz, transmitindo-a através dos vacúolos tubiformes e dos espaços de ar intercelulares. Nas células do clorênquima, o vacúolo central, em forma de tubo, pressiona o protoplasto para a periferia, definindo o posicionamento dos cloroplastos (Kasahara *et al.* 2002, Oguchi *et al.* 2003, 2005).

A relação entre espessura do parênquima paliçádico e mesófilo com a intensidade luminosa também foi destacada por Rôças *et al.* (2001), para *Alchornea triplinervia*, por Marques *et al.* (1999), para *Sebastiania myrtilloides*, por Marques *et al.* (2000), para duas espécies de *Miconia* e por Rossato & Kolb (2010), para *Gochnatia polymorpha*. Estes autores, para estas diferentes espécies, constataram que os indivíduos de ambientes que receberam maior luminosidade mostraram maior espessamento do parênquima paliçádico e mesófilo. Diversos autores mencionam que a espessura do mesófilo, como resultado da maior intensidade luminosa, decorre da expansão do parênquima paliçádico. Costa *et al.* (2009) constataram a diferenciação no parênquima paliçádico de bananeira, com alongamento das células e formação de um segundo estrato celular, em resposta à aclimatização. Resultados semelhantes já haviam sido descritos por

Fabbri *et al.* (1986) e Calvete *et al.* (2002) em morangueiro, com maior desenvolvimento do parênquima paliçádico em condições *ex vitro* após a transferência do cultivo *in vitro*. Em estudos de micropropagação de *Piper hispidinervum* e *P. aduncum* da Amazônia Ocidental, as folhas cultivadas *ex vitro*, após a transferência do cultivo *in vitro*, também desenvolveram parênquima paliçádico mais espesso (Maciel *et al.* 2014). Outro aspecto fisiológico, relacionado ao alongamento das células do mesofilo é a maior proximidade dos cloroplastos à membrana plasmática, o que favorece a maior difusão de gás carbônico (Oguchi *et al.* 2003, 2005, Gonçalves *et al.* 2008, Flexas *et al.* 2012).

Com a variação de luminosidade, tanto em condições naturais, como experimentais, as plantas apresentam estratégias para o aproveitamento da energia luminosa que chega até as mesmas, assegurando à planta condições adequadas de funcionamento.

O aumento na espessura da folha resulta em maior massa seca e acúmulo de compostos fotossintéticos por unidade de área foliar (Niinemets 1999). Em *C. xanthina*, essa relação entre a espessura da folha e a massa seca foliar foi verificada, sendo maior nas condições de cultivo *ex vitro* (PAC e AC) do que no cultivo *in vitro*. As células do mesofilo, no cultivo *ex vitro*, também exibiram maior deposição de amido em amiloplastos. Parte dos carboidratos gerados na fotossíntese é utilizada para satisfazer as necessidades biossintéticas das células foliares, sendo que a parcela excedente de carboidratos pode ser exportada das células fotossintéticas na forma de sacarose, ou ser armazenada no cloroplasto na forma de amido (Peng *et al.* 2011). A alta produção de biomassa pode desempenhar papéis importantes para as plantas, oferecendo energia até elas serem capazes de produzir novos órgãos *ex vitro* (Van Huylenbroeck & Debergh 1996).

Outro fator importante no processo de aclimatização é a suculência foliar, que apresentou um aumento na PAC. Tais resultados indicam estratégia adaptativa de aumento no armazenamento de água em folhas no início do procedimento de aclimatização (*ex vitro*), caracterizado pela abrupta mudança de redução na umidade do ar e possivelmente nas relações hídricas da planta. Esta forma de armazenar água pode proteger a planta de uma desidratação súbita e de murcha das folhas (Larcher 2000, Bacelar *et al.* 2004).

De uma forma geral, as plantas *in vitro* são cultivadas em baixa luminosidade quando comparadas com o cultivo *ex vitro*, no qual as plantas são submetidas à luz natural (George & Debergh 2008). Dignart

(2006), trabalhando com *Cattleya walkeriana* Gardner, observou maiores teores de clorofilas em cultivos *in vitro*. Diversos autores (Engel & Poggiani 1991, Atroch *et al.* 2001, Paulilo 2000, Taiz & Zeiger 2009) relacionam esses resultados com o fato de que em intensidades mais baixas de luz ocorre aumento na concentração total de clorofilas, garantindo, assim, absorção mais eficiente da irradiação luminosa.

Entretanto, ressalta-se também que nas condições de cultivo *in vitro*, o meio de cultura, além de todos os nutrientes minerais necessários, é suplementado com uma fonte de açúcar. Esta, desde que não esteja em concentrações muito elevadas, auxilia na síntese de clorofila. Na espécie em estudo verificou-se que os teores de clorofilas totais, no cultivo *in vitro*, foram superiores aos obtidos nas condições *ex vitro*. Entretanto, na condição *in vitro* observou-se que o maior teor de clorofila não correspondeu a formação de grana nos cloroplastos, pois nestes as tilacoides não mostraram-se empilhadas. Assim, pode-se inferir que ocorreu baixa assimilação de carbono determinando baixas taxas fotossintéticas.

As concentrações de clorofila *a*, *b* e carotenoides reduziram quando as plantas foram transferidas da condição *in vitro* para a pré-aclimatização, refletindo assim o efeito da transição do meio de cultura para a nova condição. Entretanto, posteriormente, na fase de aclimatização, houve recuperação, com incremento nas concentrações de clorofilas *a*, *b* e carotenoides e com organização das tilacoides nos cloroplastos, evidenciando-se grana estruturada. Estes efeitos apresentados permitiram a sobrevivência e desenvolvimento das mudas advindas da propagação *in vitro*.

Na caracterização ultraestrutural dos cloroplastos de células parenquimáticas de folhas, observou-se que, no cultivo *in vitro*, as membranas internas estão dispostas irregularmente, com grana menos desenvolvido, e ausência de grânulos de amido. Após a transferência para condição *ex vitro*, com o aumento da luminosidade, os cloroplastos apresentaram grande quantidade de amido armazenado, e grana estruturada. Estes resultados corroboram com aqueles constatados por Lee *et al.* (1985), Wetztein & Sommer (1982, 1983), Sáez *et al.* (2012) e Kapchina-Toteva *et al.* (2014) com relação a ultraestrutura dos cloroplastos de plantas cultivadas *in vitro* e *ex vitro*.

O sucesso da transferência de plantas regeneradas a partir de cultivo *in vitro* para a estufa é um passo essencial para sistemas de micropropagação de sucesso, os resultados obtidos indicam que para

garantir melhores taxas de sobrevivência na transferência do cultivo *in vitro* para *ex vitro*, é necessário oferecer condições graduais de umidade, luminosidade e um substrato que permita absorção dos nutrientes (sem compactação), por um período inicial (pré-aclimatização) para que as plantas se fortaleçam (enrijecer) as novas condições. Isto foi realizado mantendo-as cobertas com sacos de polietileno transparente, com uma lamina de água no interior da bandeja contendo uma mistura de substratos (mantendo a porosidade) em sala, com aumento da luminosidade. Conforme cita Desjardins *et al.* (1992) Grattapaglia & Machado (1998) Hazarika (2006) técnicas que são mais satisfatórias as mudanças necessárias para a aclimatização bem sucedida requerem uma manutenção gradual da umidade relativa, maior nível de luminosidade e o crescimento autotrófico.

#### 4.1.2.1 Raiz

Nas raízes das plantas na condição PAC, em relação à condição *in vitro* de *C.xanthina* destacou-se o espessamento do córtex, aumento dos elementos traqueais do metaxilema e espessamento das paredes da exoderme. Estas alterações indicam que ocorreu plasticidade estrutural que favoreceu a absorção de água e nutrientes a partir da nova condição de substrato da condição *ex vitro*. A água é transportada através do parênquima cortical da raiz até a endoderme, assim, esse parênquima cortical funciona como uma reserva hídrica, diminuindo as variações de curto prazo do fluxo de água proveniente do solo (Larcher 2006). De acordo com as informações deste autor e com as observações feitas em *C. xanthina*, pode-se deduzir que o espessamento do córtex na condição *ex vitro* seria uma estratégia de controlar o fluxo de água.

A exoderme é importante barreira apoplástica ao refluxo de água e entrada de patógenos. Durante as fases do cultivo *in vitro*, as plantas crescem sob condições de saturação de vapor d'água, baixa incidência de fótons fotossinteticamente ativos, e utilizam a sacarose como fonte de carbono, que, por sua vez, é altamente assimilável (Castro 2009). Assim, o espessamento das paredes da exoderme, na condição *ex vitro* de *C.xanthina*, pode ter corroborado com o controle do refluxo de água. A baixa diferenciação da exoderme de *C. xanthina* em condições *in vitro* pode estar relacionada com a elevada umidade relativa do ambiente, que após um período de pré- aclimatização, as células

apresentaram-se com as paredes periclinais espessadas. O que também foi observado por Mayer *et al.* (2008) em raiz de *Cymbidium*.

A permanência da raiz formada *in vitro* parece depender da continuidade do funcionamento do sistema vascular. Nos resultados obtidos, pode-se visualizar o aumento dos elementos de condução do xilema nas condições *ex vitro* de *C.xanthina*. Possivelmente, no ambiente de maior irradiação e maior temperatura, tais fatores favorecem maior fluxo transpiratório. De acordo com Larcher (2006), plantas com altas taxas de transpiração apresentam elevada área de condução, que se refere à soma da área transversal de todos os elementos do xilema. Pode-se inferir que um maior número de polos de xilema contribui para maior condutividade hidráulica da raiz, o que acarreta em translocação de maior volume de água.

Em videiras, a maioria das raízes formadas *in vitro* sobreviveu, após a transferência para o solo e continuou a crescer durante a aclimatização *ex vitro*, mostrando que muitas vezes as raízes formadas *in vitro* são funcionais e sustentam a formação de novas raízes (Gribaudo *et al.* 1995). Resultado semelhante em *C.xanthina*, as raízes advindas da condição *in vitro* apresentaram crescimento e desenvolvimento, dando suporte para que novas raízes e folhas se formassem, garantindo a sobrevivência das mudas micropropagadas. De acordo com Nowak e Shulaev (2003), o desenvolvimento de um sistema radicular funcional é um dos passos essenciais para que uma plântula tenha capacidade de absorção de água e de nutrientes minerais, garantindo a sobrevivência na condição *ex vitro*.

## 4.2 *Cattleya velutina* Rchb.f.

### 4.2.1 Folha

A superfície epidérmica, nas três condições de cultivo, mostrou parede periclinal externa convexa e deposição de ceras epicuticulares (Fig. 13a-c). Entretanto, constatou-se que, ao passar da condição *in vitro* (Fig. 13a) para a PAC (Fig. 13b), a convexidade reduziu, assim como a deposição de ceras tornou-se menos evidente. Porém, as plantas da condição AC (Fig. 13c) exibiram novamente acentuada convexidade, mais conspícua que na condição *in vitro* (Fig. 13a), aumentando também a deposição de ceras epicuticulares.

Os estômatos, restritos a face abaxial (Fig. 13d-f), estavam com forma esférica (Fig. 13g-i). Na condição *in vitro*, observou-se que

muitos estômatos mantinham o poro ainda obliterado pela cutícula (Fig. 13d), mas na PAC todos os poros mostraram-se abertos (Fig. 13e, 13h). Porém, na AC, voltou a ocorrer à presença de muitos estômatos com poro obliterado (Fig. 13f) ou parcialmente obliterado pela cutícula (Fig. 13i), comparado com a condição PAC (Fig. 13h).

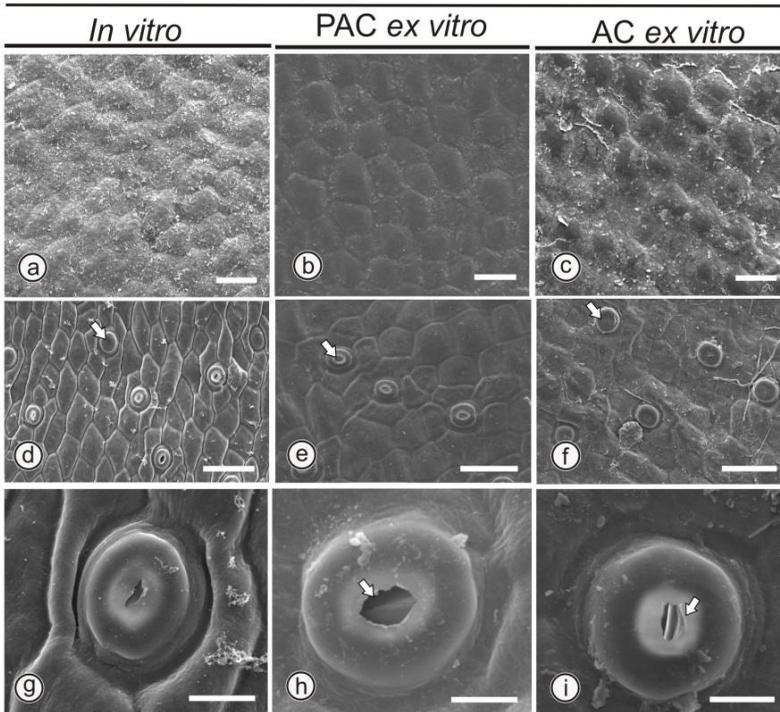
O formato das células epidérmicas ordinárias apresentou-se mais alongado na condição *in vitro* (Fig. 13a) do que nas condições *ex vitro* (Fig. 13b-c) mostrando células maiores nestas últimas. A determinação dos diâmetros polar e equatorial dos estômatos (Tab. 4) confirma que as células epidérmicas tiveram aumento em apenas um dos eixos, pois o diâmetro polar na condição *ex vitro* foi maior que na condição *in vitro*, enquanto manteve-se o diâmetro equatorial. O crescimento celular também refletiu na redução da densidade estomática entre a condição *in vitro* e AC, sendo que a condição PAC mostrou valores intermediários (Tab. 4). Esta evidência foi reforçada pela correlação negativa constatada entre densidade estomática e área foliar (Fig. 14), ou seja, com a expansão celular ocorreu expansão da folha, conduzindo à menor número de estômatos por área.

Tabela 4: Dados quantitativos dos estômatos em *C. velutina* cultivadas *in vitro* e *ex vitro*

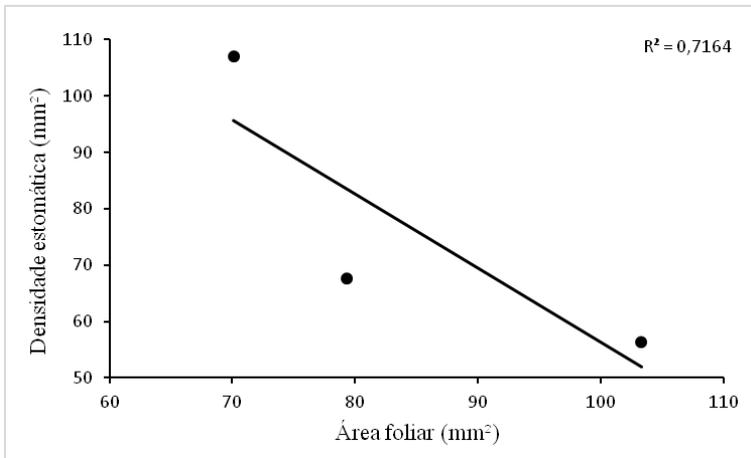
Condição Ambiental	Diâmetro Polar ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro Equatorial ( $\mu\text{m}$ )	Densidade Estomática ( $\text{mm}^2$ )
<i>In Vitro</i>	$26,8 \pm 3,1^b$	$28,5 \pm 2,4^a$	$103,3 \pm 26,1^a$
PAC. <i>Ex vitro</i>	$30,6 \pm 2,8^a$	$30,4 \pm 3,1^a$	$79,3 \pm 25,9^{ab}$
AC. <i>Ex vitro</i>	$30,8 \pm 2,2^a$	$29,6 \pm 2,2^a$	$70,1 \pm 20,9^b$

Os dados representam à média ( $\pm$  DP). Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## Condição Ambiental



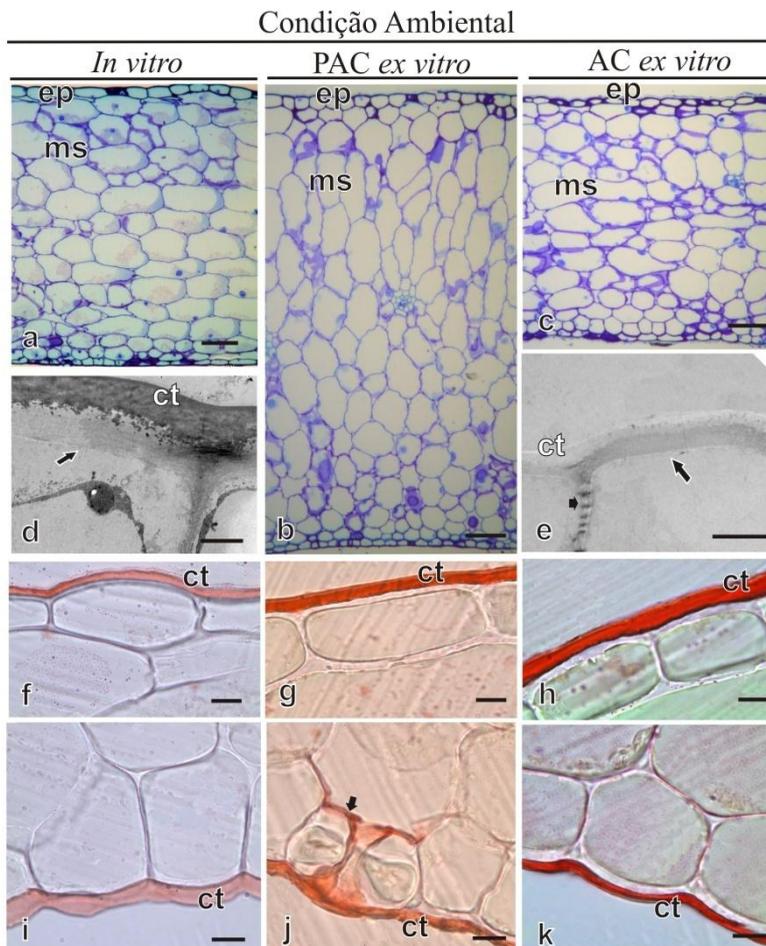
**Fig. 13** Eletromicrografia de varredura da superfície epidérmica de *C. velutina*: **a-b-c** aspecto geral da face adaxial destaca-se a parede periclinal externa convexa com deposição de ceras epicuticulares *in vitro*, na condição PAC, a convexidade e a deposição de ceras epicuticulares reduziram-se, acentuando-se na AC; Barras = 50  $\mu$ m. **d-e-f** aspecto geral da face abaxial, *in vitro*, os estômatos mantinham o poro ainda obliterado pela cutícula (seta) PAC os poros mostraram-se abertos (seta) e na AC voltou a ocorrer à presença de muitos estômatos com poro obliterado (seta) Barras = 50  $\mu$ m. **g-h-i**; detalhe dos estômatos esféricos nas três condições; **h** poro mostrou-se aberto (seta); **i** poro parcialmente obliterado pela cutícula (seta) comparado com a condição PAC. Barras = 10  $\mu$ m.



**Fig. 14** Correlação negativa entre a densidade estomática e a área foliar de *C. velutina*. Cada símbolo representa média de 10 repetições ( $p < 0.05$ ).

A epiderme uniestratificada (Fig. 15 a-c) estava constituída por células com paredes periclinais externas espessas e revestida por cutícula (Fig. 15d-k). A cutícula, na condição *ex vitro*, mostrou-se extensiva até a parede periclinal interna dos estômatos, inclusive na câmara subestomática (Fig. 15j seta). Entre as células epidérmicas foram registrados muitos plasmodesmas (Fig. 15e). A espessura da epiderme e da cutícula não sofreu alterações entre as condições de cultivo (Tab. 5).

O mesofilo apresentou-se constituído por células parenquimáticas clorofiladas (Fig. 15a-c). Na PAC ocorreu um aumento no número de camadas celulares e alongamento das células da porção intermediária do mesofilo (Fig. 15b) em relação à condição *in vitro* (Fig. 15a). As folhas analisadas da AC (Fig. 15c) mostraram mesofilo com aspecto similar à condição *in vitro*. A determinação da espessura do mesofilo confirma estas constatações (Tab. 5).



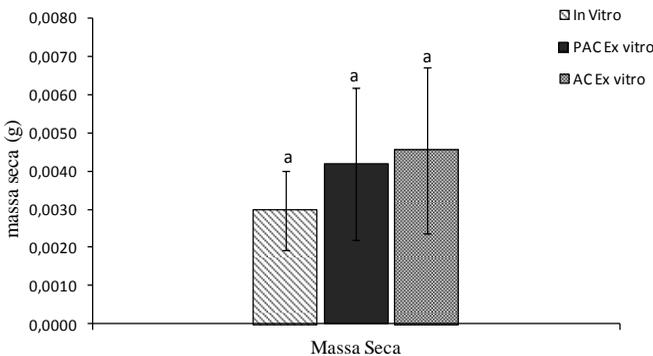
**Fig. 15** Fotomicrografias de seções transversais da lâmina foliar de *C. velutina*: **a-b-c** Epiderme (ep) uniestratificada. Mesofilo (ms) na PAC ocorreu um aumento no número de camadas celulares e alongamento das células da porção intermediária em relação à condição *in vitro* e AC. Barras = 100  $\mu$ m **d-e** Eletromicrografias de transmissão de células epidérmicas evidenciando a parede periclinal externa espessa (seta) com deposição de cutícula (ct); plasmodesmas (ponta de seta) Barras d= 2  $\mu$ m e= 5  $\mu$ m. **f-k** epiderme evidenciando a cutícula com reação positiva ao sudan III Barras = 10  $\mu$ m. **f-h** face adaxial. **i-k** face abaxial; (**j**) Cutícula extensiva até a parede periclinal interna estômato (seta).

Tabela 5: Dados quantitativos da lâmina foliar de *C. velutina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*.

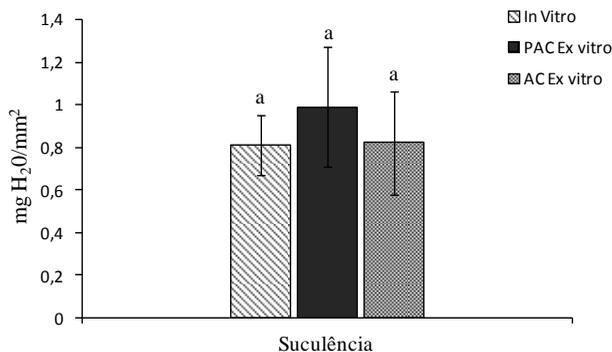
Condição Ambiental	<i>In vitro</i>	PAC. <i>Ex vitro</i>	AC. <i>Ex vitro</i>
Epiderme Face adaxial	27,54 ± 4,70 <sup>a</sup>	30,79 ± 4,24 <sup>a</sup>	28,02 ± 5,16 <sup>a</sup>
Epiderme Face abaxial	24,75 ± 4,99 <sup>a</sup>	23,67 ± 3,84 <sup>a</sup>	24,62 ± 4,52 <sup>a</sup>
Cutícula Face adaxial	4,45 ± 0,89 <sup>a</sup>	3,54 ± 0,71 <sup>a</sup>	3,68 ± 1,14 <sup>a</sup>
Cutícula Face abaxial	4,26 ± 1,05 <sup>a</sup>	3,53 ± 0,50 <sup>a</sup>	3,80 ± 0,83 <sup>a</sup>
Mesofilo (µm)	487,96 ± 167,06 <sup>b</sup>	812,45 ± 218,23 <sup>a</sup>	393,10 ± 69,71 <sup>b</sup>

Os dados representam à média (± DP). Letras diferentes comparadas horizontalmente indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

As folhas de *C. velutina* não sofreram alteração na quantidade de massa seca (Fig.16) o que também foi observado para a suculência (Fig. 17).

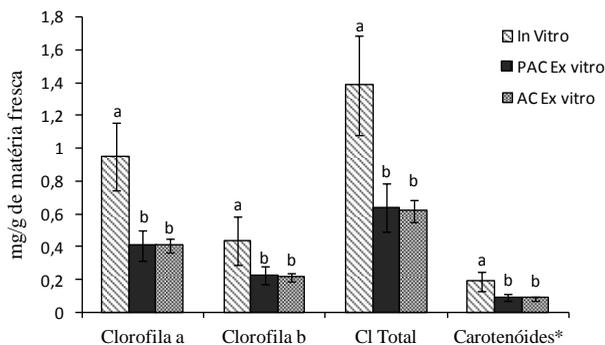


**Fig. 16** Massa seca foliar em *C. velutina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5% ( $p < 0.05$ ) N=10. Barras = DP.



**Fig. 17** Suculência Foliar em *C. velutina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5% ( $p < 0.05$ ). N=10. Barras = DP.

As concentrações de Clorofila *a*, *b*, total e carotenoides sofreram redução da condição *in vitro* para a condição *ex vitro* (Fig.18).

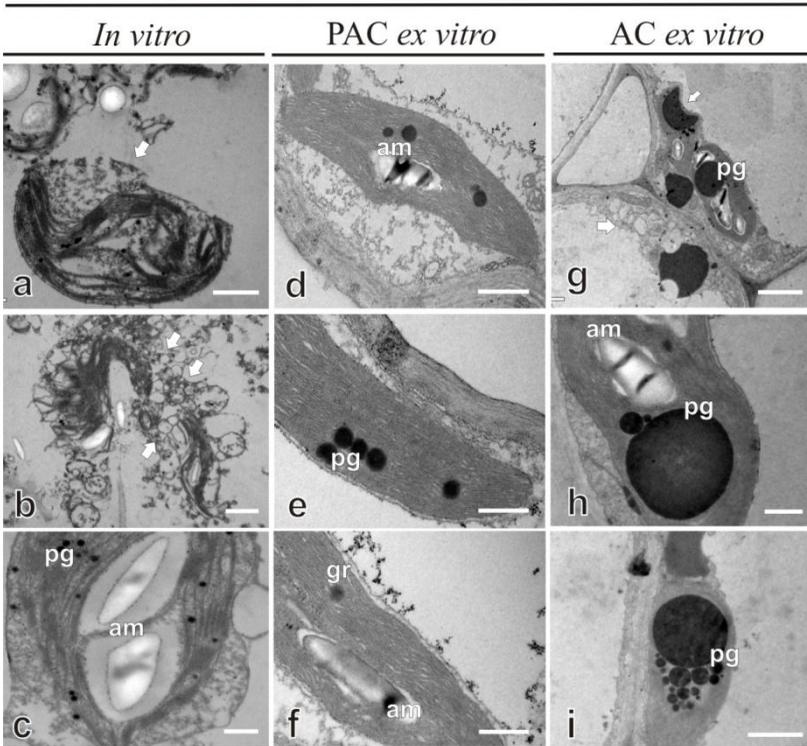


**Fig. 18** Concentração de clorofila *a*, *b*, total, e carotenoides na lâmina foliar de *C. velutina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5% (paramétrico) ou Dunn\* (não-paramétrico) ( $p < 0.05$ ). Barras = DP.

Os cloroplastos de *C. velutina*, na condição de cultivo *in vitro*, apresentaram-se geralmente com evidências de degradação, desde

rompimento da membrana externa (Fig. 19a seta) até a completa desestruturação, observam-se vesículas contornando os cloroplastos (Fig. 19b setas). Embora também tenha sido observado, raramente, cloroplastos com aspecto estruturado, com tilacóides organizados, formando grana, entre os quais ocorriam grânulos de amido e plastoglóbulos osmiofílicos (Fig.19c).

### Condição Ambiental



**Fig. 19** Eletromicrografias de transmissão de seções transversais da lâmina foliar de *C. velutina* cultivadas *in vitro* e *ex vitro*: **a-b-c** cloroplastos com rompimento da membrana externa (seta) até a completa desestruturação, com vesículas contornando (setas); em alguns casos o cloroplasto mantinha aspecto organizado apresentava grânulos de amido (am) e plastoglóbulos (pg) Barras a,b=1 $\mu$ m c=0,5  $\mu$ m **d-e-f** cloroplastos com aspecto mais organizado, presença de grana (gr) pouco constatada. Barras d=1  $\mu$ m e,f= 0,5  $\mu$ m **g-h-i** plastoglóbulos de tamanhos maiores, vesículas que estão englobando cloroplasto e plastoglóbulos osmiofílicos, para fusão com o vacúolo (setas). Barras g= 2  $\mu$ m h=0,5 $\mu$ m i= 1 $\mu$ m.

A desestruturação dos cloroplastos não foi observada na PAC. Nesta condição de cultivo, os cloroplastos mostraram-se com aspecto mais organizados (Fig. 19d-f), embora a presença de grana tenha sido pouco constatada. Na condição AC, os cloroplastos apresentaram-se com plastoglóbulos osmiofílicos de tamanhos maiores (Fig. 19g-i), raramente com grana (Fig. 19g-i). Nesta condição também observam-se vesículas que estavam englobando o cloroplasto e os plastoglóbulos osmiofílicos, para fusão com o vacúolo (Fig. 19g setas).

#### 4.2.2 Raiz

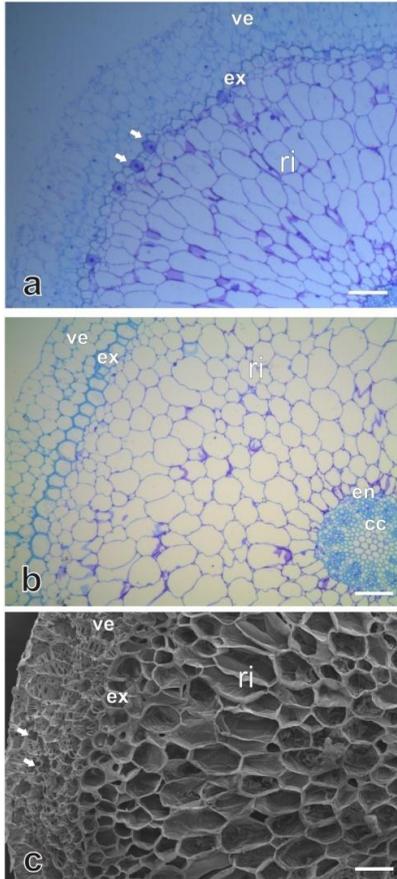
A raiz de *C. velutina* apresentou-se constituída por tecido de revestimento (velame; Fig. 20a-c), córtex e cilindro central, nas três condições de cultivo.

O velame *in vitro* (Fig. 20a, 21a) mostrou-se formado por três a cinco camadas de células vivas e nucleadas. Na PAC (Fig. 20b, 21b), não foi evidenciada a presença de células nucleadas. Na AC (Fig. 20c) foi constatado que as células alongaram-se menos no sentido radial, do que nas outras duas condições de cultivo, e era frequente a ocorrência de células com degradação das paredes. As paredes celulares deste tecido, nas três condições, apresentou espessamento na parede forma de rede (Fig. 20c, 21c).

No córtex distinguiram-se exoderme, região intermediária e endoderme (Fig 20b). A exoderme, na condição *in vitro*, exibiu células de passagem (Fig. 20a), com protoplasto denso e vacúolos, isto foi raramente constatado na condição PAC. As células deste tecido apresentaram espessamento nas paredes periclinal externa e anticlinal, sendo mais acentuado nas raízes de PAC do que na condição *in vitro* (Fig. 20a-b). Na AC as características foram muito similares às observadas na condição *in vitro*. A região intermediária do córtex (Fig. 21d-f) constituiu-se de células parenquimáticas com espaços intercelulares, sendo estes menores na condição *in vitro* e mais conspícuos nas raízes *ex vitro*. As células da endoderme exibiram pouco espessamento na condição *in vitro* (Fig. 21g), acentuando-se nas condições *ex vitro*, onde mostraram espessamento em “O” (Fig. 21h-i). Nas três condições, foram observadas células de passagem, nucleadas e sem espessamento na parede (Fig. 21g).

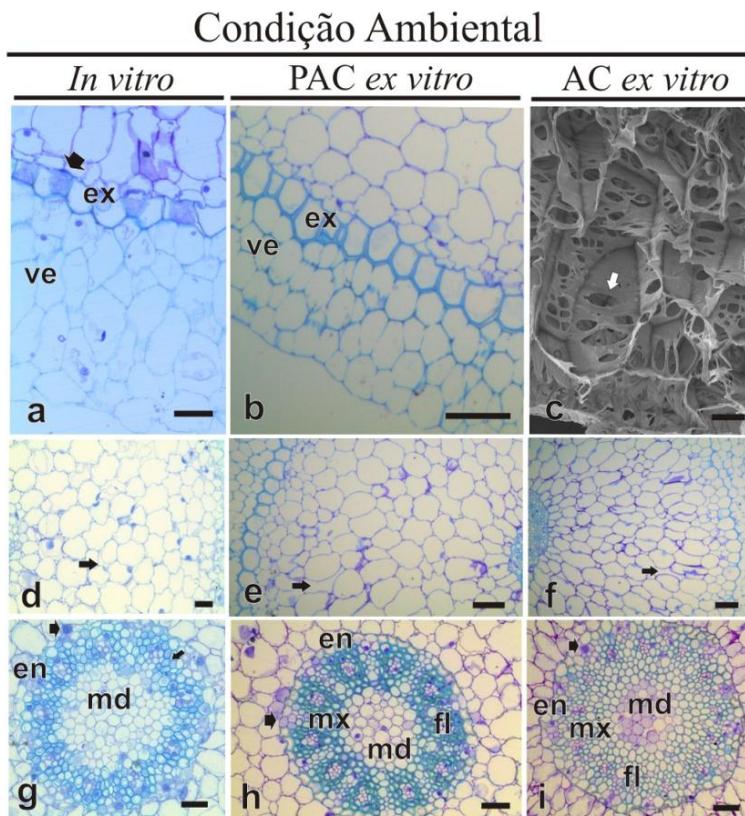
O cilindro central apresentou medula parenquimática contornada por sistema vascular (Fig. 21g-i). Este último mostrou-se distinto

quando comparadas às condições *in vitro* (Fig. 21g) e *ex vitro* (Fig. 21h-i), sendo que na primeira os elementos do xilema e do floema não são tão distintos, ocorrendo muitas células ainda provasculares, com citoplasma denso e núcleos conspícuos. Nas condições *ex vitro* (Fig. 21h-i), os elementos traqueais do xilema são bem evidentes, contornados por células de paredes espessadas e lignificadas (paredes apresentaram coloração esverdeada, decorrente da reação com azul de toluidina); cordões de floema foram evidenciados intercalando com o xilema.



**Fig. 20** Fotomicrografias de seções transversais de raízes de *C. velutina*: **a** Cultivo *in vitro*; exoderme (ex) exibiu células de passagem (setas) **b** pré-aclimatizada *ex vitro* em Fitotron; exoderme apresentou espessamento nas paredes periclinal externa e anticlinalis, sendo mais evidente que *in vitro* e na AC **c** aclimatizada *ex vitro* em casa

de vegetação; velame (ve) apresentou células que se alongaram menos no sentido radial, do que nas outras duas condições de cultivo, ocorrência de células com degradação das paredes (setas) Legenda: ri- região intermediária. en- endoderme. cc- cilindro central. Barras =100  $\mu$ m.



**Fig. 21** Fotomicrografias de seções transversais das raízes de *C. velutina*: **a-b-c** velame (ve) constituído por quatro a cinco camadas de células vivas e nucleadas; na PAC não se evidencia células nucleadas; espessamento na parede em forma de rede (seta) Barras a= 50 $\mu$ m b=100  $\mu$ m c= 20  $\mu$ m. **d-e-f** região intermediária do córtex com células parenquimáticas com espaços intercelulares (setas) sendo estes menores na condição *in vitro* e mais conspícuos nas raízes *ex vitro*. Barras d=50 $\mu$ m e, f= 100  $\mu$ m. **g-h-i** endoderme (en) pouco espessamento na condição *in vitro*, acentuando-se nas condições *ex vitro*, onde mostraram espessamento em “O”; células de passagem (ponta de seta), nucleadas e sem espessamento na parede. Cilindro central apresentou medula (md) parenquimática contornada por sistema vascular (seta) *ex*

*in vitro* os elementos traqueais do xilema (mx) são bem evidentes, contornados por células de paredes espessadas e lignificadas; cordões de floema (fl) foram evidenciados intercalando com o xilema. Barras=50  $\mu$ m.

Dados visando avaliar a espessura total da raiz e das suas distintas regiões (Tab. 6) revelaram que não ocorreu alteração entre as condições de cultivo.

Tabela 6: Dados quantitativos da raiz de *C. velutina* cultivada *in vitro* e *ex vitro*.

Condição Ambiental	<i>In Vitro</i>	PAC. <i>Ex vitro</i>	AC. <i>Ex vitro</i>
Tecido Revestimento ( $\mu$ m)	185,68 $\pm$ 68,18 <sup>a</sup>	210,09 $\pm$ 61,59 <sup>a</sup>	157,46 $\pm$ 81,01 <sup>a</sup>
Cortéx ( $\mu$ m)	746,34 $\pm$ 206,64 <sup>a</sup>	831,08 $\pm$ 119,72 <sup>a</sup>	768,45 $\pm$ 59,78 <sup>a</sup>
Cilindro Central* ( $\mu$ m)	249,57 $\pm$ 68,80 <sup>a</sup>	261,71 $\pm$ 59,06 <sup>a</sup>	258,20 $\pm$ 86,35 <sup>a</sup>
Diâmetro Total ( $\mu$ m)	2098,81 $\pm$ 586,89 <sup>a</sup>	2344,06 $\pm$ 351,98 <sup>a</sup>	2110,01 $\pm$ 319,08 <sup>a</sup>

Os dados representam à média ( $\pm$  DP). Letras diferentes comparadas horizontalmente indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, pelo teste de Tukey (paramétrico) ou Dunn\* (não-paramétrico) ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.1.1 Folha

Os resultados para *C. velutina* não se apresentaram satisfatórios para o desenvolvimento das plantas após o transplante da condição *in vitro* para *ex vitro*. Nas folhas após a transferência para as condições *ex vitro* observou-se redução gradual da densidade estomática e aumento no diâmetro polar dos estômatos, relacionado com a expansão da área foliar, dessa forma dificultando a aclimatização. Larcher (2000) comenta que a distância entre os estômatos influencia na transpiração, sendo que a maior densidade estomática reduz a transpiração, devido à formação de arcos de transpiração, mais próximos entre si, o que retém maior umidade na área estomática. Uma maior densidade estomática pode permitir uma abertura em um espaço de tempo menor, permitindo uma captação adequada de CO<sub>2</sub> e reduzindo o tempo em que esses estômatos ficam abertos, reduzindo, conseqüentemente, a transpiração (Cerqueira 1992). Diversos autores já registraram redução na densidade estomática em folhas aclimatizadas, em relação àquelas *in vitro* (Lee *et al.* 1985, 1988, Scuitti & Morini 1995, Tichá *et al.* 1998, Khan *et al.* 2003, Soares

2005). Entretanto, muitos não mencionam se obtiveram sucesso na aclimatização, embora, Tichá *et al.* 1999, Scuitti & Morini (1995) e Soares (2005) relatam que a aclimatização foi bem sucedida, mesmo com a redução da densidade estomática. Entretanto, o diâmetro dos estômatos era menor nas condições *ex vitro*. Khan *et al.* 2003 observaram que ocorreu murcha e a consequente dessecação das folhas, que atribuíram à alta densidade e funcionalidade insuficiente dos estômatos, devido ao acúmulo de etileno e presença de açúcar no meio. Em *C. velutina* observou-se, também redução da densidade estomática durante a aclimatização, não se obtendo sucesso, pois o distanciamento entre os estômatos pode ter sido responsável por um desequilíbrio hídrico interno, decorrente do favorecimento na transpiração, levando ao estresse hídrico e dificuldade de sobrevivência.

Ainda neste contexto, registrou-se que a espessura da cutícula não se alterou, o que contribui também para o estresse hídrico, pois a espessura da membrana cuticular desempenha importante papel na redução da irradiação incidente na folha (Dickison, 2000, Larcher, 2000), e relaciona-se à redução da perda de água (Haberlandt 1928, Gutschick 1999). Dessa forma a espécie não apresentou plasticidade para aclimatizar-se.

Com o aumento da luminosidade na PAC constatou-se maior espessamento do mesofilo, o que também foi observado por diversos autores para outras plantas, entre eles, Costa *et al.* (2009), Dousseau *et al.* (2008), Maciel *et al.* (2014). Entretanto, na condição de AC, as folhas analisadas apresentaram mesofilo com aspecto similar à condição *in vitro*. Conforme a literatura, a espessura da folha resulta em maior acúmulo de compostos fotossintéticos, os valores para massa seca em *C. velutina* não sofreram alteração, evidenciando-se que a planta provavelmente não estava acumulando compostos fotossintéticos, o que se torna ruim num processo de aclimatização, sem suporte para formação de novos órgãos.

Na condição de AC visualizou-se em ultraestrutura um aumento considerável de plastoglóbulos osmiofilicos nos cloroplastos, que conforme informações da literatura estão associados ao processo de senescência, o que foi observado nas folhas nesta condição; durante a senescência foliar, cloroplastos são transformados em chamados gerontoplastos, com um sistema de tilacoides reduzido e muitos plastoglóbulos (Kutik 1998, Larcher (2000), Krupinska 2007, Lichtenthaler 2013) (ANEXO 1). O desenvolvimento de gerontoplastos além de estarem sob controle genético, fatores ambientais também

influenciam, entre eles, a alta irradiância, a radiação ultravioleta, poluentes atmosféricos, herbicidas, metais pesados, e estresse hídrico (Mostowska 1997, Austin *et al.* 2006, Krupinska 2007, Lichtenthaler 2013).

Uma das mudanças mais frequentes que ocorrem nos cloroplastos durante a senescência é o aumento no número e tamanho dos plastoglobulos (Biswal & Biswal, 1988; Guiamet *et al.* 1999; Krupinska 2007, Lichtenthaler 2013). Na análise ultraestrutural das células do mesófilo de *C. velutina* também se constatou indícios de um possível caminho de degradação dos cloroplastos em células senescentes. Conforme Krupinska (2007), cloroplastos senescentes podem liberar material no citoplasma, sendo englobados pelo vacúolo central, ou podem ser incluídos em autofagossomas que se fundem com o vacúolo (ANEXO 2). O autor ainda esclarece que, durante a senescência, há ruptura da membrana do cloroplasto liberando gotículas para o citoplasma, as quais contêm material derivado de tilacoides, incluindo clorofila.

A cultura *in vitro* convencional pode acelerar os processos de senescência, o que pode ser favorecido pela concentração de etileno nos frascos de cultivo, conforme relatado por alguns autores (Chanemougasoundharam *et al.*, 2004, Lucchesini *et al.* 2006). A disfunção hormonal, principalmente ligada ao aumento da concentração de etileno nas folhas, induz, além da perda de clorofila, a senescência (Taiz & Zeiger 2009). Redução do teor de clorofila da planta é acompanhada por uma menor eficiência de PS II e senescência (Ehsanzadeh *et al.* 2009).

Segundo Fabbri *et al.* (1986), durante a aclimatização, as folhas formadas *in vitro* podem persistir ou sofrer senescência. A persistência das folhas depende da espécie e das condições do ambiente durante a aclimatização. As plantas cultivadas *in vitro* podem apresentar um aparato fotossintético competente ou não. Nas culturas não competentes, como *Fragaria X ananassa* Duch, as folhas deterioram rapidamente durante a aclimatização, contribuindo somente com os nutrientes preexistentes (Grout & Millam, 1985). De acordo com Grout (1988) existem dois tipos de plantas com relação à resposta fotossintética *in vitro*. Em um, as folhas formadas *in vitro* nunca desenvolvem plenamente a capacidade fotossintética e, ao serem transferidas para casa de vegetação, essas folhas servem como fonte de carbono para novas folhas e degeneram. Já o outro tipo de planta seria aquela que possui folhas persistentes que se aclimatizam à condição *ex vitro* e vai

aumentando a sua atividade fotossintética à medida que se adapta às condições ambientais naturais. Em *C. velutina*, observou-se que as folhas formadas no cultivo *in vitro* persistiram após a transferência para condições *ex vitro*, mas logo em seguida, as folhas não suportaram as condições ambientais naturais e apresentaram sinais de senescência, estando dentro do contexto do primeiro tipo de espécie apresentando por Grout (1988).

De um modo geral, os resultados obtidos para *C. velutina* indicaram que a espécie suportou as alterações ambientais quando expostas a condição *ex vitro* na PAC, pois não ocorreu mortalidade e sofreu algumas alterações estruturais, mas não foram suficientes para fortalecê-las de modo a ter habilidade para condição seguinte. Assim, ao serem conduzidas para a condição AC, revelaram não ter plasticidade para suportar as condições ambientais impostas, verificando-se senescência das folhas persistentes e, praticamente sem formação de novas folhas. O estresse gerado pelo ambiente de cultivo *in vitro* pode influenciar os padrões fisiológicos de maneira positiva (incrementando a atividade fisiológica da planta e favorecendo o crescimento e o desenvolvimento vegetal) ou negativa (promovendo danos celulares e prejudicando o desenvolvimento vegetal) (Gaspar *et al.* 2002). Destaca-se que já na condição *in vitro*, as plantas de *C. velutina* apresentavam sinais de debilidade (visualizado nas imagens de ultraestrutura degradação nos cloroplastos). Isto pode ter sido ocasionado por sucessivos subcultivos, o que foi verificado, no início do experimento, que a espécie já havia passado por alguns subcultivos. Não se apresentava uma homogeneidade no tamanho e morfologia das plantas. Assim, ao serem transferidas para aclimatização, as dificuldades se tornam mais acentuadas, e as plantas não conseguem crescimento e desenvolvimento.

#### 4.2.2.2 Raiz

Díaz-Pérez *et al.* (1995) sugerem que plântulas da cultura de tecido comportam-se como unidades hidraulicamente integradas, nas quais deve haver uma coordenação entre o controle de perda de água pela parte aérea e absorção de água pela raiz para manter o equilíbrio de água na planta favorável. Em *C. velutina*, na condição de AC, isto não se concretizou, as folhas apresentaram-se senescentes e as raízes com degradação das paredes celulares no velame.

*Laelia purpurata* var. cárnea cultivada *in vitro*, quando transferidas para casa de vegetação, apresentaram aumento significativo no número de camadas de células do velame, exoderme com paredes periclinais externas e anticlinais espessadas, estando alternadas com células de passagem, e cilindro vascular com maior diâmetro e espessamento das paredes nos elementos de condução xilema e floema (Silva Jr. *et al.* 2012). Nas raízes de *C. velutina*, o espessamento das paredes das células da endoderme tornou-se mais acentuado nas condições *ex vitro*. Este é um processo usual de diferenciação celular, com espessamento posterior. Isto fica reforçado pela maior diferenciação do sistema vascular, o que também foi observado nas condições *ex vitro*, indicando que a raiz estava em busca de nutrientes/água, o que antes facilmente estava disponível no meio de cultura.

Em experimentos de enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de *Fragaria X ananassa* Duch, Borkowska (2001) observou que o sistema radicular formado *in vitro* consistia somente em raízes principais (sem raízes laterais) sendo elas finas, frágeis e facilmente quebráveis durante a retirada do ágar e plantio, apresentando diferenciação na condição *ex vitro*; muitas raízes formadas *in vitro* morrem e novas são formadas quando transferidas para o campo. Contudo, é possível que as raízes formadas *in vitro* possam servir de sustentação e reserva de nutrientes até que novas raízes sejam formadas (Debergh & Maene, 1981). Durante a fase de aclimatização muitas vezes é necessário que haja emissão de novas raízes para que ocorra a absorção de água e sais minerais de forma mais eficiente, pois a deficiência de água dificulta o enraizamento e atrasa o desenvolvimento das plantas (Cunha, 2003). Para *C. velutina* as raízes formadas *in vitro* persistiram após o transplante, embora não tenham observadas diferenças na espessura dos tecidos da raiz, indicando que não deve ter ocorrido aporte de novas células, apenas diferenciação celular, o que juntamente com poucas raízes formadas *ex vitro*, pode ter dificultando o crescimento das plantas nestas condições.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies estudadas mostraram respostas diferenciadas ao processo de transferência das condições *in vitro* para *ex vitro*. O processo de aclimatização de *C. xanthina* pode ser considerado bem sucedido, pois houve plasticidade de reversão das características estruturais a favor das novas condições ambientais. Entretanto, *C. velutina* embora tenha mostrado algumas modificações estruturais, estas foram insuficientes para suportar as novas condições *ex vitro*, resultando em mortalidade.

Antes da transferência as plantas de *C. xanthina*, no cultivo *in vitro*, apresentaram-se homogêneas no tamanho e na quantidade de folhas e raízes. O processo gradual de aclimatização realizado para *C. xanthina*, foi satisfatório, com um período de pré-aclimatização, para ajuste gradual na diminuição da umidade e aumento da luminosidade, favorecendo as modificações estruturais necessárias para a sobrevivência nas condições ambientais naturais. Assim, ao serem transferidas para casa de vegetação, as plantas já passaram para um período mais crítico, mas já fortalecidas estrutural e fisiologicamente, resultando em desenvolvimento e crescimento satisfatório.

*Cattleya velutina* já mostrava sinais de debilidade na condição *in vitro*, o que pode ter resultado dos sucessivos subcultivos a que havia sido submetida. Com isto, foram utilizadas plantas heterogêneas para prosseguir com o processo de aclimatização *ex vitro*. Assim, quando submetidas às condições *ex vitro*, não estavam aptas a alterar-se estrutural e fisiologicamente, o que elevou ao estresse, culminando com a impossibilidade de sobrevivência.

Os resultados indicam que mais estudos sobre o processo de aclimatização ainda são necessários, pois as respostas podem ser distintas para espécies distintas. Porém, independente da espécie, também o material a ser usado pode ser determinante do sucesso ou insucesso. Por exemplo, sugere-se evitar uso de plantas resultantes de muitos subcultivos, de forma a manter a multiplicação das plantas com qualidade e homogeneidade no tamanho e morfologia. Uma aclimatização mais gradual, com intensidades luminosas progressivas e por um período maior em cada etapa também pode compensar a debilidade de algumas espécies na obtenção de resultados positivos na transferência da condição *in vitro* para *ex vitro*.

Análises para avaliar atividade fotossintética e determinação de enzimas antioxidativas no cultivo *in vitro* e na aclimatização seriam importantes para verificar o potencial fotossintético das culturas e os fatores envolvidos com o estresse no cultivo *in vitro* e *ex vitro*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrams, M.D.; Kubiske, M.E. & Mostoller, S.A. 1994. Relating wet and dry year ecophysiology to leaf structure in contrasting temperature tree species. **Ecology Durham** **75**: 123-133.

Abrams MC; Kloeppe BD & Kubiske ME. 1992. Ecophysiological and morphological responses to shade and drought in two contrasting ecotypes of *Prunus serotina*. **Tree Physiology** **10**: 343-355.

Araus JL & Hogan KP. 1994. Leaf structure and patterns of photoinhibition in two neotropical palms in clearing and forest understory during the dry season. **American Journal of Botany** **81**: 726-738.

Arditti J & Ernst R. 1993. **Micropropagation of orchids**. John Wiley, New York. 682p.

Arditti, J. 1992. Fundamentals of orchid biology. New York: John Wiley & Sons.

Arditti J; Ernst R; Yam TW & Glabe C. 1990. The contributions of orchid mycorrhizae fungi to seed germination: a speculative review. **Lindleyana** **5**: 249-255.

Atroch, E.M.A.C. et al. 2001. Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de biomassa e características anatômicas de plantas de *Bauhinia forficata* submetidas a diferentes condições de sombreamento. **Revista Ciência e Agrotecnologia** **25**: 853-862.

Austin JR, Frost E, Vidi PA, Kessler F & Staehelin LA. 2006. Plastoglobules Are Lipoprotein Subcompartments of the Chloroplast That Are Permanently Coupled to Thylakoid Membranes and Contain Biosynthetic Enzymes. **The Plant Cell** **18**: 1693–1703.

Bacelar EA; Correia CM; Moutinho-Pereira JM; Gonçalves BC; Lopes JI & Torres Pereira JMSG. 2004. Sclerophylly and leaf anatomical traits of five field-grown olive cultivars growing under drought conditions. **Tree Physiology** **24**: 233-239.

- Barbosa, D. C. A. 1991. Crescimento de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan (Leguminosae –Mimosoideae). **Phyton** **52**: 51-62.
- Barboza SBSC; Graciano-Ribeiro D; Teixeira JB; Portes TA & Souza LAC. 2006. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **41**: 185-194.
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I and Wilhelmi H 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal Of The Linnean Society** **126**: 237–60
- Barthlott, W. 1990. Scanning electron microscopy of the epidermal surface in plants. **Scanning Electron Microscopy in Taxonomy and Functional Morphology** **41**: 69-83.
- Batagin KD. 2008. **Análises Anatômo- fisiológicas de folhas de pupunheiras cultivadas *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo* visando otimizar o protocolo de aclimatização**. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba. 107p.
- Benzing DH. 2012. **Air plants: epiphytes and aerial gardens**. Cornell University Press. New York. 240p.
- Berg CVD. 1996. **Estudos dos padrões de variabilidade intra e interespecífica em espécies brasileiras de *Cattleya Lindley* (Orchidaceae-Laeliinae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Biswal UC & Biswal B .1988. Ultrastructural modifications and biochemical changes during senescence of chloroplasts. **International Review Of Cytology** **13**: 271–321.
- Blanke M.M. & Belcher A.R. 1989. Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** **19**: 85-89.
- Borkowska B. 2001. Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted *in vitro* or *ex vitro*. **Scientia Horticulturae** **89**: 195-206.
- Bozzola JJ & Russel LD. 1991. **Electron microscopy**. Jones and Bartlett Publishers. Boston. 542p.

Braem GJ. 1984. **Die bifoliaten Cattleyen Brasiliens**. Brücke verlag, Kurt Schmerson, Hildesheim. Alemanha. 94p.

Braga, PIS. 1987. Orquídeas. Biologia floral. **Ciência Hoje 5**: 53-55.

Brasil-MMA - Ministro de Estado do Meio Ambiente. **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**. Instrução Normativa nº. 6 de 23 de setembro de 2008. DOU 24.09.2008.

Brutti, C., Rubio, E., Llorente, B., Apóstolo, N., 2002. Artichoke leaf morphology and surface features in different micropropagation stages. **Biologia Plantarum 45**: 197–204.

Calvete EO, Azevedo M, Bordignon MH & Suzin M. 2002. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira 20**: 649-653.

Capellades M., Fontarnau R, Carulla C & Debergh P. 1990. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. **Journal Of The American Society For Horticultural Science 115**: 141–145.

Castro, E.M. et al. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 2009. 234p.

Cerqueira, Y. M. 1992. Efeito da deficiência de água na anatomia foliar de cultivares de mandioca *Manihot esculenta* Crantz. I- densidade estomática. **Sitientibus**: 103-115.

Chandra S; Bandopadhyay R; Kumar V & Chandra R. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters 32**: 1199–1205.

Chanemougasoundharam A, Sarkar D, Pandey SK, AlBiski F, Helali O & Minhas JS. 2004. Culture tube closure-type affects potato plantlets growth and chlorophyll contents. **Biologia Plantarum 48**: 7-11.

Correia D; Araujo JDM; Nascimento EHS DO; Silva Júnior JMTD & Bessa MC. 2012. Otimização da Produção de Mudanças de *Cattleya labiata*: Efeito da Sacarose no Crescimento In Vitro e na Aclimatização. **Circular Técnica 38**, Embrapa.

Corrie S & Tandon P. 1993. Propagation of *Cymbidium giganteum* Wall. through high frequency conversion of encapsulated protocorms under in vivo and in vitro conditions. **Indian Journal of Experimental Biology** **31**: 61-64.

Costa AF. 1982. **Farmacognosia**. Vol.III. Farmacognosia Experimental. 2ª ed.Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. 1032p.

Costa FHS; Pereira JES; Pasqual M; Castro EM & Santos AM. 2009. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Revista Ciência Rural** **39**:742-748.

Clements, M.A. 1999. **Embryology**. In.: Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W. (eds.). Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. Oxford: Oxford University Press, 38-58.

Cunha, GAP. 2003. **Nova tecnologia para o controle da fusariose do abacaxizeiro**. Cruz das Almas-BA: Embrapa. 4p

Cutter EG. 1978. **Plant Anatomy. Part 1: Cells and tissues**. 2ªEd. William Clowes & Sons, Limited. London. 315p.

Debergh PC & Maene LJ. 1981. A scheme for commercial propagation for ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae** **14**: 335-345.

Desjardins DYY, Lamarre M & Gosselin A. 1992. Photosynthesis and transpiration of in vitro cultured asparagus plantlets. **Scientia Horticulturae** **49**: 9- 6.

Dhawan V., Bhojwani, S.S., 1987. Hardening in vitro and morpho-physiological changes in the leaves during acclimatization of micropropagated plants of *Leucaena leucocephala* (Lam)de wit. **Plant Science** **53**: 65-72.

Díaz-Pérez JC; Sutter EG & Shacke KA. 1995. Acclimatization and subsequent gas-exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum** **95**: 225-232.

Dickison, W.C. 2000. **Integrative Plant Anatomy**. USA, Academic Press. 533p.

Dignart SL, Castro EM de, Pasqual M, Ferronato A, Braga FT & Paiva R. 2009. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência Agrotécnica** **33**: 780-787.

Donnelly DJ & Vidaver WE. 1984. Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. **Journal Of The American Society For Horticultural Science** **109**: 177-181.

Donnelly DJ, Vidaver WE & Lee KY. 1985. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell Tissue Organ Culture** **4**: 43-50.

Dousseau S, Alvarenga AA de, Castro EM de, Soares RP, Emrich EB & Melo LAD. 2008. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia** **32**: 1694- 1700.

Dressler R. L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides Press.

Engel VL & Poggiani F. 1991. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e no espectro de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **3**:39-45.

Fabbri A, Sutter E & Dunston SK. 1986. Alterações anatômicas em folhas persistentes do morangueiro cultivadas de tecidos após a remoção da cultura. **Scientia HORTICULTURAE** **28**: 331—337.

Fahn A & Cutler, DF. 1992. **Xerophytes**. Gebrüder Borntraeger, Germany. 176p.

Fahn A. 1978. **Anatomia Vegetal**. Madrid, H. Blume Ediciones. 643p.

Fermino Jr. PCP, Paulilo MTS, Reis A, Santos M. 2004. Espécies pioneiras e climácicas da floresta ombrófila densa: anatomia foliar comparada. **Insula** **33**: 21-37.

Flexas J, Barbour MM, Brendel O, Cabrera HM, Carriquí M, Díaz-Espejo A, Douthe C, Dreyer E, Ferrio JP, Gago J, Gallé A, Galmés J, Kodama N, Medrano H, Niinemets Ü, Peguero-Pina JJ, Pou A, Ribas-Carbó M, Tomás M, Tosens T, Warren CR. 2012. Mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub>: An unappreciated central player in photosynthesis. **Plant Science** **193**: 70– 84

Fraga CN; Fontana AP; Saddi EM; San Martin-Gajardo IC; Simonelli M; Bocayuva MF; Constantino PAL; Borges RAX; Machado SL; Murrieta R; Monnerat M & Paes JE. 2009. **Plano de ação para as orquídeas em risco de extinção**. Relatório Final, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A.M. de Mello – CENPES/Petrobras. 522p.

Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF & Dommes J .2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant growth regulation** **37**:263-285.

Gaspar T, Kevers C, Debergh PC, Maene L, Paques M & Boxus P .1987. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: Bonga, J.M., Durzan, D.J. (Eds.), **Cells and Tissue Culture in Forestry**, vol. I. Martinus Nijhoff Publication, pp. 152–166.

Gentry AH & Dodson CH. 1987. Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. **Annals Of The Missouri Botanical Garden** **74**: 205-233.

George EF & Debergh PC. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. In: George, E.F. *et al.* (Ed). **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht: Springer, V.1, p. 29- 64.

Gerlach D. 1984. **Botanische mikrotechnik**. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 311p.

Gerrits, P.O. & Smid, L. 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy** **132**:81-85.

Ghosh, S., Mahoney, S.R., Penterman, J.N., Peirson, D., Dumbroff, E.B. 2001. Ultrastructure and biochemical changes in chloroplasts during *Brassica napus* senescence. **Plant Physiology And Biochemistry** **39**: 777-784.

Gonçalves, B., Correia, C.M., Silva, A.P., Bacelar, E.A., Santos, A., Moutinho-Pereira, J.M., 2008. Leaf structure and function of sweet cherry tree (*Prunus avium* L.) cultivars with open and dense canopies. **Scientia Horticulturae** **116**: 381–387.

Grattapaglia, D & Machado, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p.183-260.

Gribov, I.; Morte, M. A.; Schubert, A. 1995. Use of gentian Violet to differentiate *in vitro* and *ex vitro* formed roots during acclimatization of grapevine. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** **41**: 187-188.

Grout BWW. 1988. Photosynthesis of regenerated plantlets in vitro and the stresses of transplanting. **Acta Horticulturae** **230**: 129-135

Grout, BWW & Millam S. 1985. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. **Annals of Botany** **55**:129-131.

Guerra MP & Dal Vesco LL. 2010. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In.: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press Springer 589: 47-66.

Guiamet JJ, Pichersky E & Noodén LD .1999. Mass exodus from senescing soybean chloroplasts. **Plant Cell Physiol** **40**: 986–992.

Gutschick VP. 1999. Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure. **New Phytologist** **143**: 3-18.

Haberlandt G. 1914. **Physiological plant anatomy**. Macmillan, London.

- Harrison, CR. 1977. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). **Botanical Gazette** **138**: 41-45.
- Hazarika BN. 2006 Morphophysiological disorders *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae** **108**:105-120.
- Hazarika, B. N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science** **85**: 1704-1712.
- Hiscox JD & Israelstam GF. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany** **57**: 1332-1334.
- Horridge GA & Tamm SL. 1969. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science** **163**:817-818
- Kapchina-Toteva V, Dimitrova MA, Stefanova M, Koleva D, Kostov K, Yordanova Zh P, Stefanov D & Zhiponova MK. 2014. Adaptive changes in photosynthetic performance and secondary metabolites during White dead nettle micropropagation. **Journal of Plant Physiology** **171**: 1344–1353.
- Kasahara M, Kagawa T, Oikawa K, Suetsugu N, Miyao M & Wada M. 2002. Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. **Nature** **420**: 829-832.
- Khan, S., Kozai, T., Nguyen, Q., Kubota, C., Dhawan, V. 2003. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum** **46**:161–166.
- Krupinska K. 2007. Fate and Activities of Plastids During Leaf Senescence. In: Robert R. Wise and J. Kenneth Hooper (eds.), **The Structure and Function of Plastids**. p. 433–449.
- Kumar K & Rao IU. 2012. Morphophysiologicals Problems in Acclimatization of Micropropagated Plants in - Ex Vitro Conditions- A Reviews. **Journal of Ornamental and Horticultural Plants** **4**: 271-283.

Kutík J. 1998. The development of chloroplast structure during leaf ontogeny. **Photosynthetica** **35**: 481-505.

Lambers J; Chapin FS & Pons TL. 1998. **Plant physiological ecology**. Springer Verlag. New York .540p

Lambers, H.; F.S. Chapin & T.L. Pons. 2008. **Plant physiological ecology**. Springer, New York.

Larcher W. 1995. **Physiological Plant Ecology**, 3rd edition. Springer Verlag, Berlin, 506p.

Larcher, W. 2000. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos, Rima Artes e Textos. 531p.

Larcher, W. 2006. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RIMA Artes e Textos. 532p.

Lee N, Wetzstein HY & Sommer H.E. 1985. Effect 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 Physiology** **78**: 637-641.

Lee N, Wetzstein Y, Sommer HE. 1988. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of in vitro-and in vivo developed Sweetgum Leaves. **Journal of the American Society of Horticultural Science** **113**: 167-171.

Lichtenthaler HK. 2013. Plastoglobuli, Thylakoids, Chloroplast Structure and Development of Plastids. In: B. Biswal, K. Krupinska and U.C. Biswal (eds.), **Plastid Development in Leaves During Growth and Senescence, Advances in Photosynthesis and Respiration** **36**, pp. 337–361.

Louro R.P., Dos Santos A.V. & Machado R.D. 1999. Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. I. Shoots cultivated in vitro in multiplication and elongation-rooting media. **International Journal Of Plant Sciences** **160**: 217-227.

Lucchesini M, Monteforti G, Mensuali-Sodi, A & Serra, G. 2006. Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different in vitro culture conditions. **Biologia Plantarum**. **50**: 161-168.

Maciel SA, Teixeira RB, Raposo A, Fermino Junior PP. 2014. Anatomia comparada de folhas de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) e pimenta de macaco (*Piper aduncum* L.) cultivadas in vitro, ex vitro e in vivo. **Biotemas** **27**: 11-19.

Mantovani A. 1999. A Method to Improve Leaf Succulence Qualification. **Brazilian Archives and Biology and Tecnology** **42**: 9-14.

Marin JA, Gella R & Herrero M. 1988. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. **Annals Of Botany** **62**: 663-670.

Marques, A.R.; Garcia, Q.S. & Fernades, G.W. 1999. Effects of Sun and shade on leaf structure and sclerophylly of *Sebastiania myrtilloides* (Euphorbiaceae) from Serra do Cipó, Minas Gerais, Brazil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** **18**: 21-27.

Marques, A.R.; Garcia, Q.S.; Rezende, J.L.P. & Fernandes, G.W. 2000. Variations in leaf characteristics of two species of *Miconia* in the Brazilian cerrado under the different light intensities. **Tropical Ecology** **41**: 47-60.

Mayer JLS; Ribas LLF; Bona C; & Quoirin M. 2008. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasilica** **22**: 323-332.

McClelland MT, Smith MAL. & Carothers ZB. 1990. The effects of in vitro and ex vitro root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. **Plant Cell Tissue Organ Culture** **23**: 115-123.

Menezes LC. 1987. *Cattleya labiata* Lindley. Orquídeas Brasileiras. Expressão e Cultura. Rio de Janeiro.

Ministério Do Meio Ambiente. 2004. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade Brasileira**. Brasília: MMA/SBF. 398p.

Minotta, G. & Pinzauti, S. 1996. Effects of light and soil fertility on growth, leaf chlorophyll content and nutrient use efficiency of beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings. **Forest Ecology and Management** **86**: 61-71.

Miranda FEL. 1998. Present status of Brazilian Laelia species. 57-61 In: Pereira CEB. Proceedings of the 15th World Orchid Conference, Rio de Janeiro. **Naturalia Publications**, Turriers.

Morel GM & Wetmore RH. 1951. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany** **38**:138–140.

Mostowska A .1997. **Environmental factors affecting chloroplasts**.In: Pessarakli M (ed) Handbook of photosynthesis. Marcel Dekker, New York Basel Hong Kong, p 407–426

Murashige T & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** **15**: 473–497.

Murtaza MG & Paul NK. 1989. Effect of nitrogen nutrition on the stomatal and anatomical characteristics of leaf of rape (*Brasica campestris* L.). **Bangladesh Journal of Botany** **18**: 39-44.

Niinemets U. 1999.Components of leaf dry mass per area –thickness and density – alter leaf photosynthetic capacity in reverse directions in woody plants. **New Phytologist** **144**: 35–47

Nowak J & Shulaev V. 2003. Priming for transplant stress resistance in in vitro propagation. **In Vitro Cell. Development Biol. Plant**, **39**: 107-124.

O'brien TP; Feder N & Mccully ME. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma** **59**: 368-373.

Oguchi, R., Hikosaka, K., & Hirose, T. 2005. Leaf anatomy as a constraint for photosynthetic acclimation: differential responses in leaf anatomy to increasing growth irradiance among three deciduous trees. **Plant Cell Environmental** **28**: 916- 927.

Oguchi, R., Hikosaka, K., Hirose, T. 2003. Does the photosynthetic light acclimation need change in leaf anatomy? **Plant, Cell and Environmental** **26**: 505–512.

Paiva, JGA, Fank-de-Carvalho, SM, Magalhães MP & Graciano-Ribeiro D. 2006. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasilica** **20**: 257-264.

Paulilo MTS. 2000. Ecofisiologia de plântulas e plantas jovens de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae): Comportamento em relação à variação de radiação solar. **Sellowia** **52**: 93-105.

Peng, C. C.; Xu, Y. H.; Xi, R. C.; Zhao, X. L. 2011. Expression, subcellular localization and phytohormone stimulation of a functional sucrose transporter (MdSUT1) in apple fruit. **Scientia Horticulture** **128**: 206-212.

Pospisilová J; Tichá I; Kadlecek P; Haisel D & Plzaková S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum** **42**: 481-497.

Raposo JGCMF. 1993. **A etimologia a serviço dos orquidófilos**. Ave Maria, São Paulo. 308p.

Reed, DW. & Tukey, Jr. HB. 1981. Permeability of Brussels sprouts and carnation cuticles from leaves developed in different temperatures and light intensities. In: Cutler, D.F.: Alvin, K.L. & Price, C.E. (eds.) 1981. **The Plant Cuticle**. London, Academic Press, Linnean Society Symposium Series. N° 10. pp. 267-278.

Rôças, G.; Scarano, F.R. e Barros, C.F. 2001. Leaf anatomical variation in *Alchornea triplinervia* (Spreng.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) under distinct light and soil water regimes. **Botanical Journal of the Linnean Society** **136**: 231-238.

Rosim, M. 2009. *Cattleya velutina* Lindl. [http://www.yoshis-travels.com/orchid\\_articles/c\\_velutina/Cattleya\\_velutina.pdf](http://www.yoshis-travels.com/orchid_articles/c_velutina/Cattleya_velutina.pdf). Acesso em: 10 out. 2014.

Rossatto DR. & Kolb RM. 2010. *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera (Asteraceae) changes in leaf structure due to differences in light and edaphic conditions. **Acta Botanica Brasilica** **24**: 605-612

Ruschi A.1986. Orquídeas de Estado do Espírito Santo. **Expressão e Cultura**, Rio de Janeiro.

Ruzin SE. 1999. **Plant Microtechnique and Microscopy**. Oxford University Press. New York. 322p.

Sáez PL, Bravo LA, Latsague MI, Sánchez ME, Ríos DG. 2012. Increased light intensity during *in vitro* culture improves water loss control and photosynthetic performance of *Castanea sativa* grown in ventilated vessels. **Scientia Horticulturae** **138**: 7–16.

Sandoval- Fernandez, JA; Muller, LE & Weberling, F. 1994. Foliar morphology and anatomy of *Musa* cv. Grande Naine (AAA) plants grown *in vitro* and during hardening as compared to field-grown plants. **Fruits** **49**: 37-46.

Sarijeva G, Knap M & Lichtentahler HK. 2007. Differences in photosynthetic activity, chlorophyll and carotenoid levels, and in chlorophyll fluorescence parameters in green sun and shade leaves of Ginkgo and Fagus. **Journal of Plant Physiology** **164**: 950-955.

Sciutti R & Morini S. 1995. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. **Journal Of Horticultural Science** **70**: 221-228.

Secretaria Do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. 2004. Lista oficial **das espécies da flora do Estado de São Paulo ameaçadas de extinção**. Resolução 48 de 22 de setembro de 2004.

Shapiro SS & Wilk MB. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika** **52**: 591-611.

Sheehan TJ. 1992. Orchids. In: LARSON, R.A. (Ed.). **Introduction to floriculture**. Academic Press. San Diego. 246p.

Silva AS, Oliveira JG, da cunha M & Vitória AP. 2010. Photosynthetic performance and anatomical adaptations in *Byrsonima sericea* DC. under contrasting light conditions in a remnant of the Atlantic forest. **Braz. Journal Plant Physiology** 22: 245-254.

Silva FAS & Azevedo CAV. 2009. **Principal Components Analysis in the Software Assistat- Statistical Attendance**. In: World Congress on Computers in Agriculture,7,Reno-NV-USA. American Society of Agricultural and Biological Engineers.

Silva Júnior JM, Castro EM, Rodrigues M, Pasqual M & Bertolucci SKV. 2012. Variações anatômicas de *Laelia purpurata* var. cárnea cultivada *in vitro* sob diferentes intensidades e qualidade spectral de luz. **Ciência Rural** 42: 480-486.

Soares, FP. **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.

Souza VC & Lorenzi H. 2005. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 604p.

Stancato GC; Bemelmans PF & Vegro CLR. 2001. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** 7: 25-33.

Strauss-Debenedetti, S. & Berlyn, G.P. 1994. Leaf anatomical responses to light in five tropical Moraceae of different successional status. **American Journal of Botany** 81:1582-1591.

Sutter E & Langhans RW. 1982. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. **Canadian Journal of Botany** 60: 2896-2902.

Sutter E. 1988. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of American Society for Horticultural Science** **113**: 234-238

Taiz L. & Zeiger E. 2009. *Fisiologia Vegetal*. 4. ed. Porto Alegre, Artmed.

Terashima I. & Inoue Y. 1984. Palisade tissue chloroplasts and spongy tissue chloroplasts in spinach: biochemical and ultra-structural differences. **Plant and Cell Physiology** **26**: 63-75.

Tichá I, Čáp F, Pacovská D, Hofman P, Haisel D, Čapková V & Schäfer C. 1998. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. **Physiol. Plant.** **102**: 155-162.

Vantelgen HJ; Vanmil A & Kunneman B. 1992. Effect of propagation and rooting condition on acclimatization of micropropagated plants. **Acta Botanica Neerlandica** **41**: 453-459.

Van Huylenbroeck JM & Debergh PC. 1996. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. **Physiologia Plantarum** **96**: 298-304.

Vilela-Morales EA & Valois ACC. 2000. Recursos Genéticos Vegetais autóctone e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Caderno de Ciência & Tecnologia** **17**: 11-42.

Vogelmann, TC, Bomman, JF. & Yates DJ. 1996. Focusing of light by leaf epidermal cells. - **Physiol, Plant** **98**: 43-56.

Volgemann TC & Martin G. 1993. The functional significance of palisade tissue: Penetration of directional vs diffuse light. **Plant Cell Environmental** **16**: 65-72.

Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology** **144**: 307-3013.

Wetzstein H.Y. & Sommer H.E. 1982. Leaf anatomy of tissue cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. **American Journal of Botany** **69**: 1579-1586.

Wetzstein HY & Sommer HE. 1983. Scanning electron microscopy of in vitro cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. **Journal Of The American Society For Horticultural Science** **108** : 475-480.

Wilkinson HP. 1979. The plant surface. Part I. Stomata. In: Metcalfe, C.R. & Chalk, L. (Ed.). **Anatomy of the Dicotyledons**. Vol. I. 2<sup>a</sup>. Ed. Oxford, Clarendon Press. pp. 97-117.

Withers LA & Williams JT. 1998. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília, Embrapa-CBAB. 1: p.297-330.

Withner CL. 1988. The Cattleyas and their relatives. I. **The Cattleyas**. Oregon: Timber Press.

Zanenga-Godoy R. & Costa, CG. 2003. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. **Acta Botanica Brasília** **17**: 101-118.

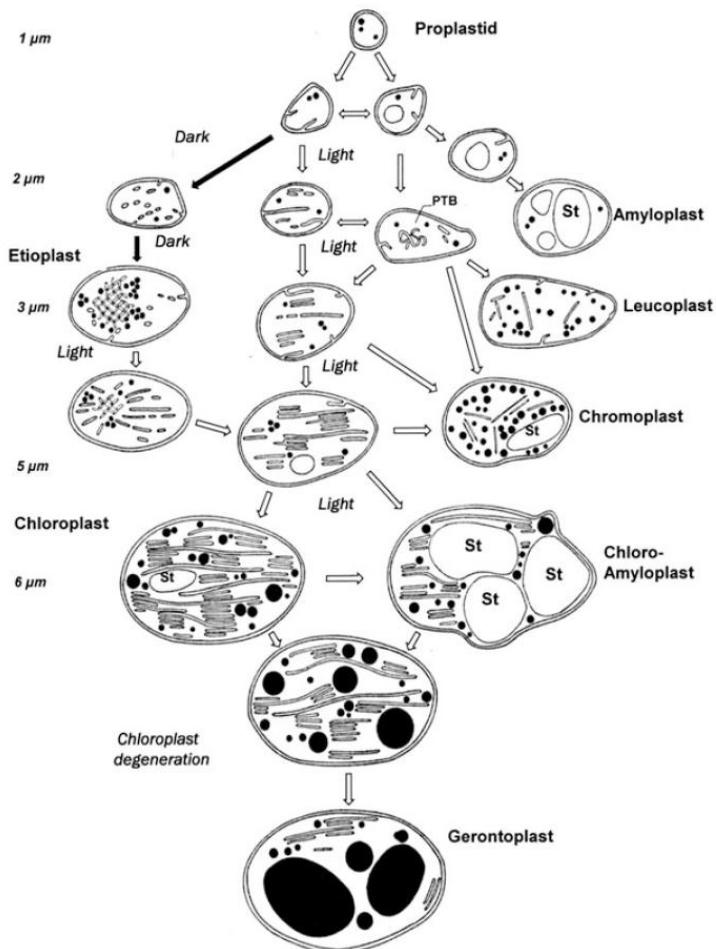
Ziv M & Ariel T. 1994. Vitrification in relation to stomatal deformation and malfunction in carnation leaves *in vitro*. pp. 143-154 in Lumsden P.J., Nicholas J.R. and Davies W.J.(eds.), **Physiology, Growth and Development of Plants in Culture**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Ziv M & Chen J. 2008. The anatomy and morphology of tissue cultured plants. In: GEORGE, E.F. *et al.* (Ed). **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht: Springer, V.1, p.465-478.

Ziv M, Schwarts A & Fleminger D. 1987. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *In Vitro*: implications for hardening. **Plant Science** **52**: 127-134.

Ziv M. & Ariel T. 1992. On the relation between vitrification and stomatal cell wall deformity in carnation leaves in vitro. **Acta Horticulturae 314**: 121-129.

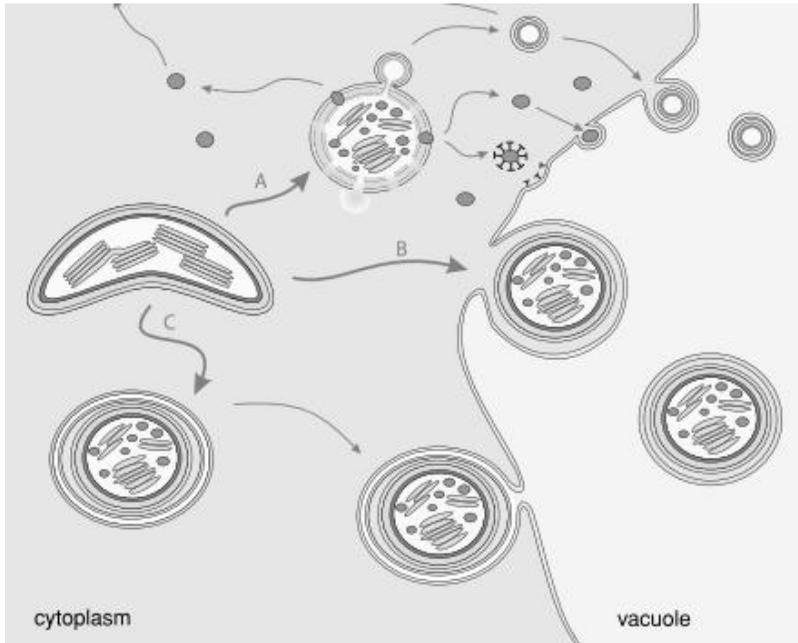
## ANEXO 1



Esquema de plastídios e desenvolvimento de cloroplastos nos tecidos vegetais mostrando o tamanho e a frequência de plastoglobulos osmiofilicos e também a biosíntese de tilacóides induzida pela luz. PTB corpo protubular de pró-cloroplastos. St amido.

(Lichtenthaler 2013)

## ANEXO 2



Modelo de três percursos diferentes pelos quais os cloroplastos podem ser degradados em células do mesófilo senescentes. Cloroplastos senescentes pode libertar o material no citoplasma (A), pode ser englobadas pelo vacúolo central, (B) ou podem ser incluídos em autofagossomas que podem fundir com o vacúolo (C). Material é degradado por enzimas do vacúolo.

(Krupinska 2007)