



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CAMPUS DE CURITIBANOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOSISTEMAS AGRÍCOLAS E NATURAIS

Ana Paula Caetano

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA COMPARATIVA DE FOLHAS DE *Acca
sellowiana* NO CULTIVO IN VITRO, EX VITRO E IN VIVO**

Curitibanos

2021

Ana Paula Caetano

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA COMPARATIVA DE FOLHAS DE *Acca
sellowiana* NO CULTIVO IN VITRO, EX VITRO E IN VIVO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais (PPGEAN) da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior, Dr.

Coorientador: Prof. Miguel Pedro Guerra, Dr.

Curitibanos

2021

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

Caetano, Ana Paula

Caracterização anatômica comparativa de *Acça sellowiana*
no cultivo invitro, ex vitro e in vivo / Ana Paula Caetano
; orientador, Paulo Cesar Poeta Fermino Junior,
coorientador, Miguel Pedro Guerra, 2021.
60 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós-Graduação em
Ecossistemas Agrícolas e Naturais, Curitibanos, 2021.

Inclui referências.

1. Ecossistemas Agrícolas e Naturais. 2. Ecossistemas
Agrícolas e Naturais. 3. Goiabeira-serrana. 4.
Micropropagação. 5. Plasticidade. I. Fermino Junior, Paulo
Cesar Poeta. II. Guerra, Miguel Pedro. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Ecossistemas Agrícolas e Naturais. IV. Título.

Ana Paula Caetano

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA COMPARATIVA DE FOLHAS DE *Acca
sellowiana* NO CULTIVO IN VITRO, EX VITRO E IN VIVO**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior

Universidade Federal de Santa Catarina

Orientador / Presidente

Profa. Dra. Rosete Pescador

Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciência.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior

Orientador

Curitiba, 2021.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço a Deus, pela dádiva da vida e por me permitir continuar com força e determinação até aqui.

Agradeço também a minha família, em especial a minha mãe Neiva de Fátima Vacario Caetano, por me ensinar a ser uma mulher forte e perseverante, aos meus pais João Ademir Caetano (em memória) que é meu ponto de luz, e também ao meu pai de coração Osmar da Cunha Maciel que me acolheu desde o momento que cheguei em sua vida. Agradeço por todas as lições de amor, companheirismo, caridade, compreensão, respeito e perdão que vocês me dão a cada dia. Obrigada! Vocês são fundamentais em cada passo da minha vida.

Ao meu irmão Guilherme Vacario Maciel, que está sempre do meu lado, me apoia e me dá força em tudo nesta vida.

Ao meu namorado André Luis Dacol, por todo apoio e compreensão durante esta caminhada, obrigada por permanecer ao meu lado durante toda a minha trajetória até aqui.

Agradeço imensamente ao Professor Paulo Cesar Poeta Fermino Junior pela orientação, competência e tempo dedicado a mim, obrigada por todas as vezes que nos reunimos, pelas palavras de incentivo que me estimularam a chegar até aqui. Também agradeço ao meu coorientador Miguel Pedro Guerra pela oportunidade de aprendizado e por acreditar na minha capacidade para realizar e prosseguir o presente estudo. Obrigada por acreditarem em mim, tenho certeza que não chegaria até aqui sem o incentivo de vocês.

Agradeço a colaboração do meu colega Guillermo, que se tornou um grande companheiro de laboratório. Agradeço também a Dara, que com as rotinas laboratoriais se tornou além de minha colega uma grande amiga, obrigada por todo incentivo, companheirismo e disponibilidade de horários que sem dúvida nenhuma foi essencial para a concretização dessa dissertação.

A todos os meus amigos, que mesmo distantes se fizeram presentes com palavras de incentivo e força, obrigada pela amizade e companheirismo incondicional.

Agradeço a todos do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais, pela dedicação e competência e todo conhecimento compartilhado.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina e seus colaboradores em geral, que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo. Aos técnicos de laboratório que sempre se mostraram dispostos a ajudar sempre que solicitado. Sem dúvidas vocês são parte fundamental na minha caminhada até aqui.

Agradeço a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) de São Joaquim –SC, pelo material disponibilizado e por acreditarem na importância deste estudo.

A UNIEDU pela bolsa de estudos a mim concedida, esse auxílio foi de fundamental importância para que eu pudesse concluir o mestrado.

Por fim, gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, e que acrescentaram em minha vida de alguma forma, o meu sincero agradecimento.

RESUMO

A goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret), pertencente à família Myrtaceae, é uma espécie frutífera nativa no sul do Brasil e no Uruguai. A propagação vegetativa convencional dessa espécie por estaquia apresenta baixa eficiência, sendo a cultura de tecidos vegetais uma alternativa viável, com protocolo já estabelecido. O cultivo *in vitro* pode causar alterações anatômicas, morfológicas e fisiológicas nas plantas, prejudicando a aclimatização das plantas micropropagadas. O modo heterotrófico de nutrição e a falta de mecanismos de controle de perda de água estabelecem plantas vulneráveis ao choque no transplantio para a casa de vegetação (*ex vitro*) ou campo. O objetivo do trabalho foi descrever e comparar aspectos anatômicos, relacionados a respostas fisiológicas das folhas de duas cultivares de *A. sellowiana* no cultivo *in vitro* (Sistema convencional de micropropagação e Sistema natural de ventilação), *ex vitro* e *in vivo*. Secções paradermicas e transversais da lâmina foliar no cultivo *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*, foram feitas à mão-livre e em lâminas permanentes para a medição das estruturas anatômicas em microscópio de luz. Também foram realizadas a extração e dosagem de clorofila a, b e carotenoides no cultivo *in vitro*. A densidade dos estômatos teve maior média de estômatos/mm² no sistema de ventilação natural, assim como dimensão estomática polar (comprimento do estômato) e do poro estomático (comprimento do poro). A concentração de clorofila a em folhas foi maior no sistema de ventilação natural. A espessura do mesofilo, do parênquima paliçádico, do parênquima esponjoso e do perímetro do xilema e a cutícula abaxial foram menores em folhas de plantas no cultivo em sistema de ventilação natural. A densidade estomática não apresentou diferença estatística entre o cultivo *ex vitro* e *in vivo*, no entanto ambas foram superiores ao cultivo *in vitro*. Com relação a largura do estômato o tratamento *in vitro* apresentou maior dimensão em relação as demais. O comprimento do estômato e do poro estomático foi menor no cultivo *ex vitro* em relação ao cultivo *in vitro*. A espessura da cutícula nas faces adaxial e abaxial foram maiores no cultivo *ex vitro* e menores no cultivo *in vitro*. A espessura da epiderme na face abaxial e adaxial, espessura da lamina foliar, perímetro do xilema foi menor no cultivo *in vitro* do que nos demais cultivos. O índice de plasticidade fenotípica (IP) em folhas de *A. sellowiana* indica que a densidade estomática e o perímetro do xilema apresentam maior índice (0,52), enquanto que o comprimento do poro estomático apresenta o menor índice (0,003). O sistema de ventilação natural no cultivo *in vitro* promoveu ajustes morfofisiológicos que devem favorecer a transição do cultivo *in vitro* para o *ex vitro* (aclimatização). A plasticidade nos tecidos foliares na comparação do cultivo *in vitro* para o *ex vitro* indicam que houve ajustes morfofisiológicos essenciais para sobrevivência da espécie no processo de micropropagação.

Palavras-chave: Goiabeira-Serrana, Micropropagação, Plasticidade.

ABSTRACT

The Pineapple Guava (*Acca sellowiana* (Berg) Burret), belonging to the Myrtaceae family, is a fruit species native to southern Brazil and Uruguay. The conventional vegetative propagation of this species by cuttings has low efficiency, and the culture of plant tissues is a viable alternative, with an already established protocol. *In vitro* cultivation can cause anatomical, morphological and physiological changes in plants, impairing the acclimatization of micropropagated plants. The heterotrophic mode of nutrition and the lack of water loss control mechanisms establish plants vulnerable to shock when transplanted to the greenhouse (*ex vitro*) or field. The objective this work was to describe and compare anatomical aspects, related to the physiological responses of the leaves of two cultivars of *A. sellowiana* in *in vitro* culture (Conventional micropropagation system and Natural ventilation system), *ex vitro* and *in vivo*. Paradmal and cross sections of the leaf blade in *in vitro*, *ex vitro* and *in vivo* cultivation were made by hand and in permanent slides for the measurement of anatomical structures under a light microscope. Chlorophyll a, b and carotenoids were also extracted and dosed in *in vitro* culture. Stomatal density had a higher average stomata/mm² in the natural conformity system, as well as polar stomatal dimension (stoma length) and stomatal pore (pore length). The concentration of chlorophyll a in leaves was higher in the natural compliance system. The thickness of the mesophyll, the palisade parenchyma, the spongy parenchyma and the xylem perimeter and the abaxial cuticle were smaller in plant leaves in cultivation under a natural regulation system. Stomatal density showed no statistical difference between *ex vitro* and *in vivo* culture, however both were superior to *in vitro* culture. Regarding the width of the stoma, the *in vitro* treatment presented a larger dimension in relation to the others. Stomatal and stomatal pore length was shorter in *ex vitro* culture compared to *in vitro* culture. The cuticle thickness on the adaxial and abaxial surfaces were higher in *ex vitro* culture and lower in *in vitro* culture. The thickness of the epidermis on the abaxial and adaxial surface, the thickness of the leaf blade, the perimeter of the xylem was less in *in vitro* culture than in other cultures. The phenotypic plasticity index (PI) in leaves of *A. sellowiana* indicates that the stomatal density and the perimeter of the xylem have the highest index (0.52), while the length of the stomatal pore has the lowest index (0.003). The system of natural conditions in *in vitro* culture promoted the morphophysiological adjustments that should favor a transition from *in vitro* culture to *ex vitro* culture (acclimatization). The plasticity in leaf tissues when comparing *in vitro* to *ex vitro* cultivation indicates that there were essential morphophysiological adjustments for the areas of the species in the micropropagation process.

Keywords: Pineapple-Guava, Micropropagation, Plasticity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) espécie <i>Acca sellowiana</i> ; (B) Flor; (C) fruto da goiabeira-serrana.	17
Figura 2. Mapa da localização geográfica, na cor vermelha, de Curitiba- SC, onde foram realizadas as análises deste estudo.	23
Figura 3. Aspectos dos frascos utilizados para cultivo da <i>Acca sellowiana</i> (O.Berg.) Burret considerando o sistema convencional e o sistema de ventilação natural.	25
Figura 4. Enraizamento <i>ex vitro</i> de <i>Acca sellowiana</i> (O.Berg.) Burret. (A) Bases dos microbrotos imersas em AIB em Becker de 50 ml; (B) Transplântio das microstacas para potes de polipropileno.....	26
Figura 5. Plantas transferidas do cultivo <i>in vitro</i> para tubetes plásticos com substrato Mecplant®, levadas a casa de vegetação	26
Figura 6. Processo para realização das lâminas permanentes. (A) Blocos de resina contendo material vegetal; (B) Micrótopo de rotação em que foram seccionados os blocos de resina; (C) Lâminas em que os cortes foram distendidos em água; (D) material corado em azul de toluidina 0,25% aquoso.	28
Figura 7. Vista frontal da epiderme da face abaxial de folhas de <i>Acca sellowiana</i> (O.Berg.) Burret no cultivo <i>in vitro</i> evidenciando os estômatos (seta). (A) Sistema convencional de micropropagação; (B) Sistema de ventilação natural. Barras= 20 µm.	31
Figura 8. Concentração de pigmentos fotossintéticos em folhas de <i>Acca sellowiana</i> (O.Berg.) Burret em sistema convencional e sistema de ventilação natural no cultivo <i>in vitro</i> . Valores em mg/100mg de massa fresca.....	33
Figura 9. Secções transversais de folha de <i>Acca sellowiana</i> (O.Berg.) Burret em sistema convencional e sistema de ventilação natural no cultivo <i>in vitro</i> . Sistema de ventilação natural (A) e Sistema convencional de micropropagação (B). Legenda: ED = Epiderme adaxial; EB = Epiderme abaxial; PP = parênquima paliçádico; PE = Parênquima esponjoso; CTD = cutícula adaxial; CTB= Cutícula abaxial; DG= ductos glandulares. Barras= 20 µm.....	35
Figura 10. Secções transversais da nervura principal <i>Acca sellowiana</i> (O.Berg.) Burret em sistema de ventilação natural (A) e convencional (B) no cultivo <i>in vitro</i> . Legenda: XL = xilema. Barras= 20 µm.	37

Figura 11. Vista frontal da epiderme na face abaxial de folhas de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret no cultivo *in vitro* (A), *ex vitro* (B) e *in vivo* (C). Barras= 20 μm 40

Figura 12. Secções transversais da espécie de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret, no cultivo *in vitro* (A), *ex vitro* (B) e *in vivo* (C). Legenda: ED = Epiderme adaxial; EB = Epiderme abaxial; PP = parênquima paliçádico; PE = Parênquima esponjoso; CTD = cutícula adaxial; CTB= Cutícula abaxial. Barra = 20 μm 43

Figura 13. Secção transversal da nervura principal de folhas de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret no cultivo, *in vitro* (A), *ex vitro* (B) e *in vivo* (C). Legenda: ED = Epiderme adaxial; EB = Epiderme abaxial; PP = Parênquima esponjoso; XL = xilema. Barra = 20 μm 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Densidade e dimensões estomáticas em folhas de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret em sistema convencional e sistema de ventilação natural no cultivo in vitro. Legenda: SCM= Sistema Convencional de Micropropagação; SVN= Sistema de Ventilação Natural..... 30

Tabela 2. Características morfométricas de tecidos foliares de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret em sistema convencional e sistema de ventilação natural no cultivo in vitro. Legenda: SCM= Sistema Convencional de Micropropagação; SVN= Sistema de Ventilação Natural; ELF = Espessura da lamina foliar; EAB = Espessura da epiderme abaxial; EAD = Espessura da epiderme adaxial; EMF = Espessura do mesofilo; EPP = Espessura do parênquima paliçádico; EPE = Espessura do parênquima esponjoso; CTD = Espessura da cutícula adaxial; CTB = Espessura da cutícula abaxial; PX = Perímetro do xilema. 36

Tabela 3. Densidade e Dimensões estomáticas das folhas de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret no cultivo in vitro, *ex vitro* e *in vivo*. 39

Tabela 4. Espessura da lâmina foliar, células epidérmicas, mesofilo, parênquimas paliçádico e esponjoso, cutícula e perímetro da área de xilema para folhas de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret no cultivo *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*. ELF = Espessura da lamina foliar; EAB = Espessura da epiderme abaxial; EAD = Espessura da epiderme adaxial; EMF = Espessura do mesofilo; EPP = Espessura do parênquima paliçádico; EPE = Espessura do parênquima esponjoso; CTD = Espessura da cutícula adaxial; CTB = Espessura da cutícula abaxial; PX = Perímetro da área do xilema. 46

Tabela 5. Índice de Plasticidade Fenotípica - IP de características morfométricas em folhas de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret desenvolvidas em cultivo in vitro, *ex vitro* e *in vivo*..... 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIB Ácido indolbutírico

CAT Carotenóides totais

CHLA Clorofila a

CHLB Clorofila b

CHLT Clorofilas totais

CO2 Gás carbônico

CTB Espessura da cutícula abaxial

CTD Espessura da cutícula adaxial

DMSO Dimetilsulfóxido

EAB Espessura da epiderme abaxial

EAD Espessura da epiderme adaxial

ELF Espessura da lamina foliar

EMF Espessura do mesofilo

EPAGRI Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A

EPE Espessura do parênquima esponjoso

EPP Espessura do parênquima paliçádico

IP Índice de plasticidade fenotípica

PX Perímetro do xilema.

SCM Sistema convencional de micropropagação

SVN Sistema de ventilação natural

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

UNIEDU Programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina

WPM Wood Plant Medium

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 <i>Objetivo geral</i>	15
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i>	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO E USOS DA ESPÉCIE.....	16
2.2 PROPAGAÇÃO DA <i>A. sellowiana</i>	18
2.3 ANATOMIA DE PLANTAS <i>IN VITRO</i> E <i>EX VITRO</i>	19
2.4 PLASTICIDADE FENOTÍPICA	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 LOCAL E MATERIAL DE ESTUDO	23
3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO	24
3.2.1 <i>Estabelecimento e cultivo in vitro da espécie</i>	24
3.2.2 <i>Aclimatização (cultivo ex vitro) e cultivo in vivo de cultivares</i>	26
3.3 PREPARAÇÃO DE LAMINAS E ANÁLISES MORFOANATOMICAS.....	27
3.4 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE CLOROFILAS E CAROTENÓIDES	28
3.5 ÍNDICE DE PLASTICIDADE FENOTÍPICA.....	29
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 CULTIVO <i>In vitro</i> EM SISTEMA CONVENCIONAL E DE VENTILAÇÃO NATURAL	30
4.1.1 <i>Densidade e dimensão dos estômatos</i>	30
4.1.2 <i>Pigmentos fotossintéticos</i>	33
4.1.3 <i>Epiderme, tecidos do mesofilo e xilema</i>	34
4.2 CULTIVO <i>In vitro</i> , <i>Ex vitro</i> e <i>In vivo</i>	38
4.2.1 <i>Densidade e dimensão dos estômatos</i>	38
4.2.2 <i>Epiderme, tecidos do mesofilo e xilema</i>	42
4.3 ÍNDICE DE PLASTICIDADE FENOTÍPICA	48
5 CONCLUSÃO	51
REFERENCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret conhecida popularmente como Goiabeira-serrana ou feijoa, é uma espécie arbustiva nativa do planalto meridional brasileiro e do leste uruguaio (MORETTO et al. 2018). Adaptada ao frio e com maior ocorrência em áreas acima de 800 metros, a espécie se classifica como perenifólia e atinge de 2 a 10 metros de altura, raramente ultrapassando os 5 metro de altura (LEGRAND; KLEIN, 1977; DOS SANTOS et al. 2011).

Pertencente à família Myrtaceae, a goiabeira serrana, assim como todas as espécies desta família, tem grande importância econômica, tanto para fins ornamentais como também por possuir frutos comestíveis (LEGRAND; KLEIN, 1977). A espécie segundo Dos Santos et al., (2011) vem sendo avaliada e classificada pelo Ministério do Meio Ambiente como uma espécie nativa potencialmente importante, atualmente a Colômbia e a Nova Zelândia são os principais produtores da goiabeira serrana.

A exploração desta espécie segundo Pereira (2016) pode oferecer uma nova alternativa de frutos ao paladar da população. Além disso, a espécie é importante em outros setores, como para a recuperação de áreas degradadas (GOMES et al. 2016), mata ciliares além de também poder compor sistemas Agroflorestais (DOS SANTOS, 2014).

No estado de Santa Catarina, a espécie é pesquisada desde 1980 pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. (Epagri), juntamente com a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), devido ao seu potencial organoléptico e também por ser uma espécie adaptada as condições edafoclimáticas das regiões com temperaturas mais baixas do sul do Brasil. Também se leva em consideração que a espécie tem ocorrência natural no Bioma Mata Atlântica e Pampa, onde os mesmos vêm sofrendo com pressões antrópicas o que acaba resultando na perda de área e também de diversidade (CIOTTA et al. 2018).

Nos últimos anos a procura por frutos diferentes vem trazendo uma maior busca e também valorização dos mesmos, no entanto a produção da goiabeira serrana do ponto de vista agrônômico ainda é bastante rustico, assim como a seleção de suas características determinantes (PEREIRA, 2016). O cultivo e a exploração comercial da espécie é dependente do aperfeiçoamento de técnicas de propagação e também da implementação de tecnologias para a agricultura familiar (PAVEI et al. 2018).

Para a espécie os métodos de propagação vegetativa convencional (enxertia e

estaquia) são pouco satisfatórias, assim como a viabilidade, conservação e vigor das sementes, onde se torna necessário a otimização de meios para a propagação e conservação da mesma. Ainda, a propagação também é feita por meio de sementes e de micropropagação (PASA et al., 2018). Um protocolo de micropropagação para *A. sellowiana* já foi estabelecido por Oltramari et al. (2000).

A técnica de cultura de tecidos é bastante vantajosa (GUERRA et al., 1999) no entanto, o cultivo *in vitro* pode causar alterações anatômicas, morfológicas e fisiológicas em plantas micropropagadas (MACIEL et al., 2014), o que pode prejudicar na sua aclimatização, com isso, para essas plantas, a anatomia foliar tem uma grande importância, tornando possível comparar o desenvolvimento de seus tecidos e estruturas adaptativas. Na anatomia foliar é possível mensurar a espessura da cutícula, como as células se dispõem, dimensão e número de estômatos, entre outros (ABBADE et al., 2009).

Em órgãos vegetais como as folhas é correm diversos processos metabólicos, aos quais são especializados, como fotossíntese, trocas gasosas e também transpiração. O mesofilo e sistema vascular são bastante simplificados, quando cultivados *in vitro*, o mesmo não ocorre quando comparado a folhas desenvolvidas em casas de vegetação (MAJEROWICZ, 2012).

Segundo Braga et al. (2010) metodologias e técnicas vem sendo desenvolvidas para que haja o fornecimento de condições ambientais que possibilitem a capacidade fotossintética do material que está sendo micropropagado. A utilização de membranas com microporos permeáveis a gases tem sido utilizada para proporcionar o aumento na transferência destes gases entre o recipiente em que se encontram os cultivos e o meio externo.

A plasticidade das estruturas anatômicas tal como a posterior aclimatização (*ex vitro*) tornam possível observar o sucesso da micropropagação (FERMINO JUNIOR et al., 2009). A aclimatização representa em algumas espécies um agente limitante na produção, devido ao alto índice de mortalidade e dissemelhança de mudas. O déficit hídrico resultante da elevada transpiração durante a mudança para a condição *ex vitro* é uma das principais causas da morte em mudas na fase de aclimatização (LIMA-BRITO et al., 2016).

Diante a importância da espécie em diversos setores, tanto econômico como de restauração, e a poucas pesquisas realizadas para mesma, a sua caracterização

morfoanatomica relacionadas a respostas fisiológicas propagadas *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo* é de fundamental importância para o uso e conservação.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar a anatomia foliar de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret, no cultivo *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar as diferenças morfoanatômicas no cultivo *in vitro* em relação ao sistema convencional de micropropagação e o sistema de ventilação natural.

- Determinar as concentrações de clorofilas e carotenoides na condição de cultivo *in vitro* tanto no sistema convencional de micropropagação como para o sistema de ventilação natural.

- Identificar a plasticidade fenotípica anatômica de folhas na transição do cultivo *in vitro* para o cultivo *ex vitro*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

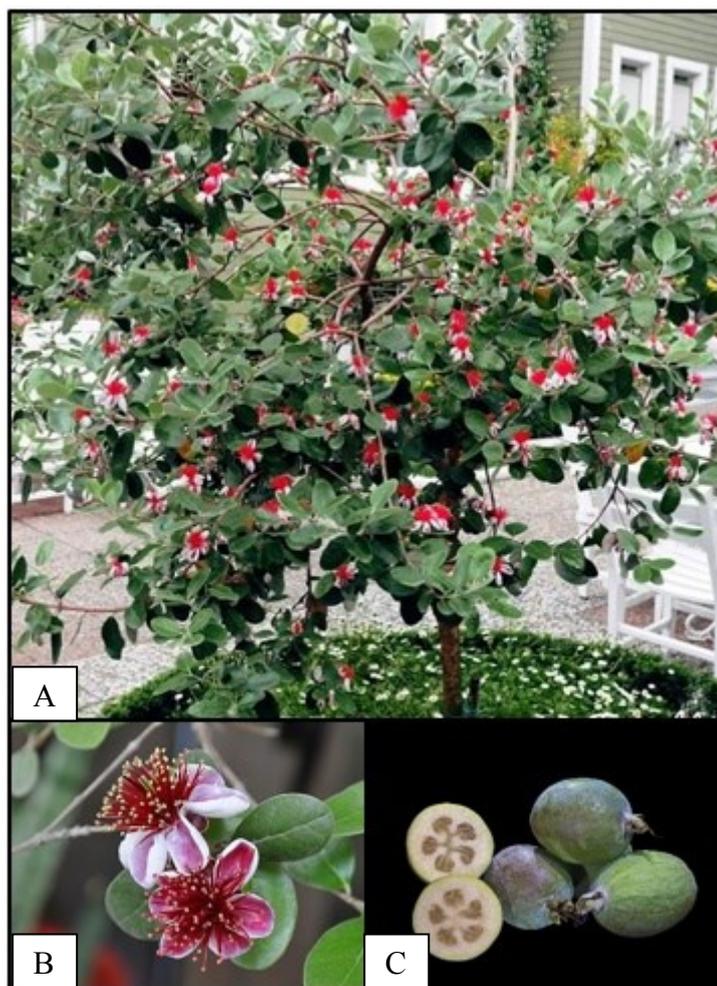
2.1 OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO E USOS DA ESPÉCIE

A *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret conhecida como feijoa, goiabeira serrana, goiabeira-da-serra ou goiabeira do mato (DUCROQUET; RIBEIRO, 1991), é pertencente à família Myrtaceae é nativa da América do Sul, na região Andina (LEGRAND; KLEIN, 1977). No Brasil a mesma é uma planta nativa da Mata Atlântica com ocorrência nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro (CIOTTA, 2018), podendo também ocorrer no Uruguai e Argentina. As suas populações de ocorrência em Santa Catarina mostram alta variabilidade em suas características fenotípicas, como tamanho e cor do fruto (GUERRA et al., 2013). Segundo Lorenzini (2006), sua ocorrência natural está associada a condições ecológicas e edafoclimáticas que são dependentes do relevo, altitude, latitude, clima. No Brasil a planta apresenta maior ocorrência em locais com altitudes entre 400 e 1800 metros (DOS SANTOS et al., 2017).

A. sellowiana é um arbusto que pode chegar a medir até seis metros de altura (Figura 1A), raramente ultrapassando esta, possui folhas persistentes e fuste ramificado, com crescimento lento e potencialidade ornamental, devido a sua folhagem e floração vistosa (DUCROQUET et al., 2000). É uma espécie predominantemente alógama, com flores hermafroditas (DOS SANTOS et al., 2017). A espécie floresce entre os meses de outubro e dezembro, com floração predominante em dezembro, com flores que contem quatro sépalas discretas e quatro pétalas carnosas (Figura 1B) (DUCROQUET et al., 2000; FINATTO, 2011).

Quanto ao seu fruto, a polpa apresenta coloração gelo, como já mencionado devido a sua alta diversidade genética, podem-se observar frutos com diversos tamanhos (Figura 1C), variando entre 20 a 300 gramas e formato que pode ser arredondado ou oblongo. Sua casca apresenta coloração verde, e pode variar a textura de lisa até rugosa. A maturação do fruto vai do final de fevereiro até o final de maio, com maturação de quatro semanas (DOS SANTOS et al., 2017).

Figura 1. (A) espécie *Acca sellowiana*; (B) Flor; (C) fruto da goiabeira-serrana.



Fonte: <https://www.pinterest.it/pin/449797081530954699> - 2021.

A espécie tem inúmeras utilidades, suas flores e frutos são comestíveis podendo ser consumidas *in natura* ou em forma de geleias e goiabadas (TONETTO, 2018), suas pétalas podem ser destinadas a decoração de pratos, saladas e doces, e ainda, devido sua perfeição, a espécie pode ser destinada para fins ornamentais (CIOTTA, 2018). Também pode ser destinada a fabricação de moirões, lenha e carvão, já que é classificada, de acordo com Backes e Irgang (2009), como uma madeira de densidade médio-pesada (750 kg/m^3).

Além disso, a espécie ainda apresenta a característica de florescer mais tarde que outras espécies frutíferas que pertencem ao clima temperado e são cultivadas no Sul do Brasil, com menor risco de perdas por geadas tardias (DUCROQUET; RIBEIRO, 1991), o que segundo Dos Santos (2009), pode oferecer uma nova alternativa para a agricultura familiar obter renda nesse período.

2.2 PROPAGAÇÃO DA *A. sellowiana*

A propagação da goiabeira-serrana pode ocorrer de duas formas, sexuada ou assexuada, onde a sexuada é feita através de sementes, enquanto que quando assexuada a propagação é feita através de métodos de clonagem, como estaquia, enxertia ou micropropagação (PASA et al., 2018). A propagação sexuada para espécies frutíferas é restritiva, pois possuem limitações quanto ao seu uso comercial, como alto vigor e variabilidade genética, mesmo de plantas vindas da mesma planta-matriz. Enquanto que a propagação assexuada é amplamente utilizada para a produção de mudas, pois garante a manutenção de suas características e também a sua uniformidade (HOLFFMAN et al., 2005).

A propagação da *A. sellowiana* é convencionalmente feita por estaquia na Colômbia, no entanto no Brasil, este tipo de propagação é pouco utilizado pois apresenta baixa efetividade, possuindo baixa taxa de enraizamento (PASA et al., 2018). A enxertia, na cultura da goiabeira-serrana tem como objetivo reduzir a fase juvenil, possibilitando a produção de estruturas produtivas, quando comparado a produção através de sementes (PASA et al., 2018), no entanto segundo Fachinello e Nachtigal (1992), esta técnica apresenta dificuldades de pega, durante o outono e inverno, com índices que não ultrapassam 20 a 30% de pega.

A micropropagação é a técnica de cultura de tecidos mais utilizada para diversas espécies, com resultados promissores quanto a clonagem massal de genótipos, conservação *ex situ* de espécies de grande importância econômica e também para espécies que estão em risco de extinção. Esta técnica também tem a vantagem de ser realizada em espaço e tempo reduzido, além de garantir o material livre de patógenos (JOHNSON et al., 2012).

Tendo em vista as limitações para a propagação da goiabeira-serrana, a micropropagação é uma técnica que pode colaborar e ser aplicada para a propagação clonal em massa de genótipos para a domesticação da mesma, a aplicação dessa técnica depende da indução e controle da morfogênese *in vitro*. A cultura de tecidos é um dos principais meios utilizados para que seja feito o estudo morfogênico de plantas, através das bases estruturais, bioquímicas, fisiológicas e moleculares (GUERRA et al, 2016). A expressão morfogenética pode ser apresentada em dois níveis básicos, a organogênese e a embriogênese somática (GUERRA et al, 2016).

Quanto a estas duas rotas morfogênicas, a organogênese se trata da formação e também desenvolvimento de eixos caulinares oriundos de gemas pré-existentes, e quando induzidos ao enraizamento os mesmos resultam em uma plântula completa (GUERRA et al, 2016). Já a embriogênese somática é um processo ideal para que se investigue o processo de diferenciação em plantas, tal como os mecanismos de totipotencia que a planta pode vir a expressar (FURTADO, 2010). Essa rota permite que células somáticas, sob condições próprias de indução, geram células organogênicas que formam um embrião somático, através de uma série de alterações bioquímicas e estruturais (TAUTORUS, et al, 1991).

Atualmente, protocolos de micropropagação foram definidos para a espécie de goiabeira-serrana, sendo que o protocolo realizado por Oltramari et al. (2000) para a goiabeira-serrana foi estabelecido através de segmentos nodais e microestacas, e pode ser constituído de três fases: a indução, a multiplicação e o enraizamento. A indução e a multiplicação pode ser realizada com a utilização do meio de cultura WPM (Wood Plant Medium), com adição ou não de citocininas, e o enraizamento das microestacas, quando *in vitro* utilizando pulsos de 6 dias de AIB (20 µM), e quando utilizado o método de indução *ex vitro* utiliza AIB (100µM) por 60 minutos e posteriormente levar a aclimatização. Este procedimento apresentou maior número de raízes e também uma melhor funcionalidade, contendo taxas de 69% quanto ao seu enraizamento. Apesar de seu maior custo, a técnica de micropropagação é relevante para a espécie devida a sua importância econômica e seus diversos usos.

2.3 ANATOMIA DE PLANTAS *IN VITRO* E *EX VITRO*

Espécies lenhosas quando propagadas *in vitro* sofrem alterações por diversos fatores relacionados ao meio de cultura, o que podem causar degenerações tanto metabólicas como morfológicas (ABBADÉ et al., 2009), o ambiente *in vitro* é caracterizado por uma condição de umidade relativa elevada, baixa irradiância tal como temperatura relativamente elevada e constante, com baixas taxas de trocas gasosas com o ambiente externo, e doses de carboidratos e reguladores do meio de cultura em concentrações elevadas. Essas alterações fazem com que as plantas cultivadas nessas condições apresentem além de mudanças morfológicas alterações fisiológicas durante seu desenvolvimento (BANDEIRA et al., 2007).

Com isso, o estudo da anatomia de folhas pode conter informações relevantes, a respeito da mudança das características em relação as mudanças ambientais, principalmente em função a radiação (SOARES, 2012). As folhas, que são expansões do caule, tem estrutura e fisiologia bastante variáveis, sendo estas a parte que tem maior interação com o ambiente. Com análises microscópicas é possível observar formas e tamanhos das células epidérmicas e também características relacionadas a morfologia e distribuição de estômatos (RAMOS et al. 2016). Os estômatos em plantas cultivadas *in vitro* segundo Maciel et al. (2014) estão diretamente relacionados com a capacidade de fotossíntese da mesma e o processo de aclimatização.

As plantas cultivadas *in vitro*, em sua maioria, apresentam baixa capacidade fotossintética, devido a baixas concentrações de CO₂ e baixa densidade de fluxo fotossintético. Além disso, os meios de cultura possuem como principal fonte de energia a sacarose, essas condições do ambiente *in vitro* acabam limitando sua fotoautotrofia, que pode influenciar negativamente a sobrevivência de plantas durante a aclimatização quando em condições *ex vitro* (LINARES, 2018).

Nas folhas e também em outros órgãos vegetais é possível notar a presença de cloroplastos nos tecidos parenquimáticos, que produzem pigmentos naturais chamados de clorofila, e apresentam colorações diversificadas, devido a presença de carotenoides (SANTOS et al., 2008). A clorofila influencia no crescimento e na adaptabilidade das plantas, são esses pigmentos cloroplastidicos que são responsáveis pela transformação de energia luminosa em energia química, na forma de ATP E NADPH, o que a faz muito importante quando se trata da eficiência fotossintética (DE SALES et al., 2018).

A clorofila *a*, *b*, e carotenoides são utilizados para a mensuração da taxa fotossintética, pois tem a capacidade de absorver luz em diferentes comprimentos de onda. Plantas que apresentam maior taxa desses pigmentos apresentam também um maior potencial para realização da fotossíntese assim como um maior acúmulo de biomassa (TAIZ et al., 2017). A clorofila *a* é utilizada para realizar o primeiro processo fotossintético, a etapa fotoquímica, já os demais pigmentos ajudam na absorção de luz e transferência de energia para os centros de reação, sendo esses então chamados de pigmentos acessórios (SANTOS et al., 2008).

Segundo Batista et al. (2018), a quantidade e a qualidade de luz estão diretamente relacionados com a quantidade de clorofilas e carotenoides nas plantas. A luz funciona em questões vitais da planta, como a fotossíntese e o desenvolvimento fotomorfogênico,

incluindo assim a síntese de carotenoides (GONZÁLEZ, 2019). Os carotenoides, também chamados de pigmentos acessórios como já mencionado, são descritos por Taiz et al. (2017), como constituintes integrais dos tilacóides, e intimamente associados às proteínas que formam o aparelho fotossintetizante e também protegem o organismo de efeitos danosos que são causados pela luz.

Segundo Aoyama (2010), no cultivo *in vitro* a estrutura das plantas podem diferir daquelas desenvolvidas em casa de vegetação e a campo, sendo assim distintas morfológicamente e também fisiologicamente, plantas desenvolvidas *in vitro* apresentam folhas mais finas, com o mesófilo simplificados, assim como seu sistema vascular, quando comparados a folhas de plantas geradas em casa de vegetação (HAZAKARI, 2006). Quanto aos estômatos, Hazakari (2006) ressalta que em algumas plantas a estrutura estomática muda de forma significativa quando se fala do ambiente *in vitro*, alguns autores encontraram em seus estudos estômatos mais arredondados, em menor quantidade e com funcionalidade reduzida, para uma variedade de espécies, como visto em *Tectona grandis* L. (FERMINOJUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2009), *Piper hispidinervum* C. DC. e *Piper aduncum* L. (MACIEL et al., 2014), e *Tabebuia serratifolia* (Vahl) (DOUSSEAU et al., 2008).

O cultivo *in vitro* também apresenta uma diminuição na espessura da cutícula, podendo variar de acordo com as condições de luz, CO₂ e o meio de cultura a que são expostos, a cutícula está diretamente ligada com a limitação da perda de água, e a escassez dessa camada é responsável por essa perda excessiva em ambientes *in vitro* (HAZAKARI, 2006). Já no ambiente *ex vitro* quando comparado ao *in vitro* essa camada se apresenta mais espessa, devido as condições completamente diferentes que a planta é exposta (MAYER et al. 2008). O conhecimento das alterações morfológicas, de plantas cultivadas *in vitro* são fundamentais para que se entenda a variação estrutural que permite a sobrevivência da planta na fase de aclimatização, elucidando a necessidade dos estudos quanto a estas características.

2.4 PLASTICIDADE FENOTÍPICA

As plantas de forma geral demonstram respostas plásticas dependendo do ambiente que se encontram, podendo ser devido a fatores bióticos ou abióticos (CALLAWAY et al., 2003; VIA, 1993). Grande parte das plantas conhecidas dependem dos mesmos recursos para sua sobrevivência, que são eles a luz, água, CO₂, macro e

micronutrientes, e dentre estes recursos a luz é considerada o principal (PRICE; WEITZ, 2010). De acordo com Kami et al. (2015), a luz é um fator que varia de acordo com as condições do ambiente, e a folha é a parte da planta que mais expressa essa variabilidade.

Segundo Chin e Sillett (2016), as folhas respondem e se aclimatam de acordo com os sinais ambientais, até que cheguem no seu limite ecológico, por isso compreender a variação anatômica das folhas de acordo com a disponibilidade dos recursos essenciais como água e luz melhora a capacidade de prever os impactos relacionados a resposta foliar a mudança de ambiente.

As plantas podem expressar plasticidade nas suas características morfológicas, como por exemplo no tamanho e estrutura do órgão, dependendo do ambiente em que a planta se encontra, podem ocorrer ajustes no tamanho de suas folhas, também podem expressar plasticidade quanto a sua espessura, o que sugere que ocorrem mudanças estruturais e anatômicas para que se aumente a eficiência da planta (SULTAN, 2003). A plasticidade anatômica da planta pode elucidar como as mesmas ajustam seus fenótipos, de forma sutil, para que suas funções sejam mantidas em condições adversas (SULTAN, 2000).

Para Via (1993) espécies que apresentam potencial plástico para características relacionadas a sobrevivência, se adaptam facilmente em ambientes de transição ou instáveis, e estas mudanças podem resultar em um aumento de tolerância ambiental para a planta. Valladares et al. (2005) afirma que espécies mais plásticas tem maior probabilidade de sobrevivência devido a suas adaptações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL E MATERIAL DE ESTUDO

O experimento foi realizado no laboratório de Biotecnologia e Genética Vegetal e no viveiro da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos. O local de estudo está situado nas coordenadas 27°16'60''S e 50°35'07''W, em uma altitude de 987m (Figura 2), o clima da região é do tipo Cfb subtropical úmido com verões amenos. A temperatura média de cada estação é de 20,5°C no verão, 16,7°C no outono, 12,4°C no inverno e 16,5°C na primavera. A umidade relativa média anual é 78% e a precipitação média anual é 1479,7 mm distribuídos quase uniformemente durante todo o ano (WREGGE et al. 2017).

Figura 2. Mapa da localização geográfica, na cor vermelha, de Curitibanos- SC, onde foram realizadas as análises deste estudo.



Fonte: SantaCatarina.MesoMicroMunicip.svg

Para este estudo foram utilizadas sementes e plantas jovens da espécie de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret, doadas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), da cidade de São Joaquim – SC, oriundas de Banco de germoplasma no campo. As análises morfoanatômicas e dos teores de clorofilas e carotenóides foram feitas em folhas saudias, do segundo e terceiro nó, desenvolvidas em três condições de cultivo: *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*.

3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

3.2.1 Estabelecimento e cultivo *in vitro* da espécie

Para o cultivo *in vitro*, as sementes de *A. sellowiana* foram removidas manualmente dos frutos maduros, lavadas em água corrente com detergente para a remoção da mucilagem e armazenadas em geladeira (5°C) por 15 dias. Para o estabelecimento *in vitro* foi utilizado protocolo de desinfecção com imersão em etanol (70%) por 2 min, seguido de imersão em hipoclorito de sódio 2,5% por 30 minutos, e finalmente em água destilada esterilizada, por três vezes consecutivas para a remoção das substâncias de assepsia. Foi utilizado o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com suplementação de 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de agar-agar. Antes da adição do Agar-agar foi realizado o ajuste de pH do meio (5,8 ± 0,2). Todos os procedimentos de inoculação *in vitro* foram feitos em câmara de fluxo laminar horizontal.

As sementes após o protocolo de desinfecção foram então inoculadas em 20 frascos de 250 mL cada, contendo 30 mL de meio de cultura e cada frasco recebeu oito sementes, e em seguida as tampas foram devidamente vedadas com plástico filme em PVC nas bordas. Foram utilizadas tampas com trocas gasosas e tampas convencionais (sem trocas gasosas). As tampas com trocas gasosas foram provenientes da Samavidros®, modelo BioSama com um orifício de borracha, com furo de 1 mm de diâmetro preenchido com algodão hidrofílico e um filtro millipori com porosidade de 22 µm (BRAGA et al., 2010). As culturas foram mantidas em sala de crescimento a 25 ± 3 °C, com lâmpadas fluorescentes brancas (50 µmol m⁻² s⁻¹ de fótons), com fotoperíodo de 16 horas.

Após 60 dias de cultivo *in vitro* as plantas jovens (com metafílos) tiveram seus eixos caulinares separados, em câmara de fluxo laminar (Figura 3), para a excisão de segmentos nodais (2 cm) e inoculação em frascos de 250 mL considerando o sistema convencional e sistema de ventilação natural, contendo 30 mL de meio de multiplicação. O meio de multiplicação foi composto por sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com suplementação de 30 g L⁻¹ de sacarose e 2 g L⁻¹ de phytigel®.

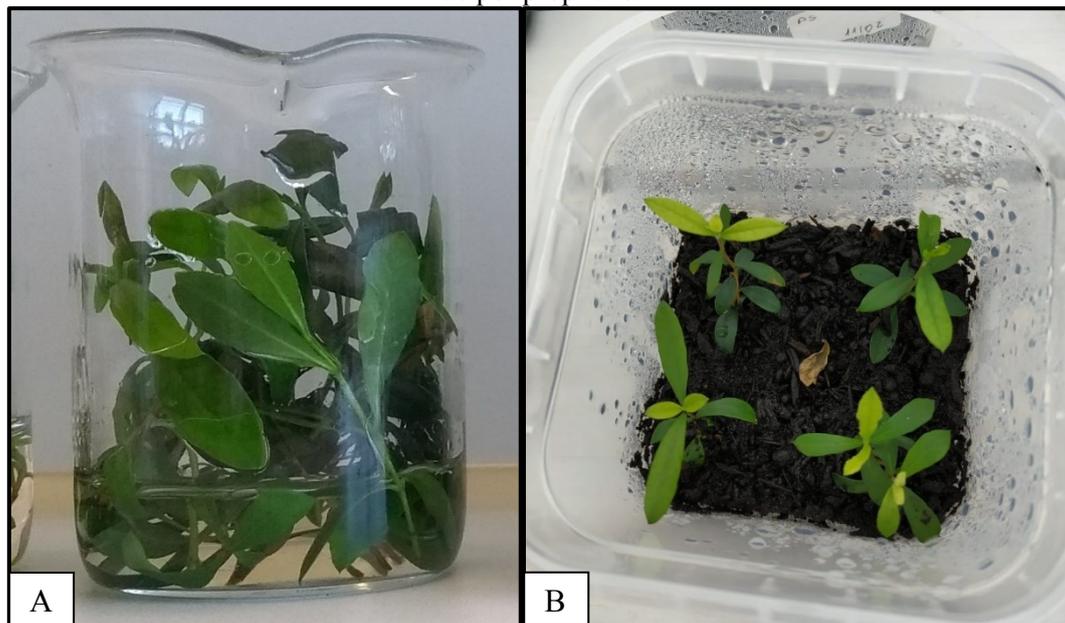
Figura 3. Aspectos dos frascos utilizados para cultivo da *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret considerando o sistema convencional e o sistema de ventilação natural.



Fonte: O autor.

Microbrotos regenerados no meio de multiplicação ($\pm 2,5$ cm) foram transferidos para o enraizamento *ex vitro*, conforme metodologia de Oltramari et al. (2000). Bases de microbrotos foram imersas em solução de 100 μM de ácido indolbutírico (AIB) por 60 minutos. Posteriormente, as microestacas foram transplantadas potes de polipropileno com tampa, contendo como substrato uma mistura de vermiculita e casca de arroz carbonizada, na proporção de 1:1 (v:v), mantidas em sala de crescimento (Figura 4). Cada unidade experimental foi constituída por 04 microestacas em delineamento completamente casualizado, com 16 repetições.

Figura 4. Enraizamento *ex vitro* de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret. (A) Bases dos microbrotos imersas em AIB em Becker de 50 ml; (B) Transplântio das microstacas para potes de polipropileno.

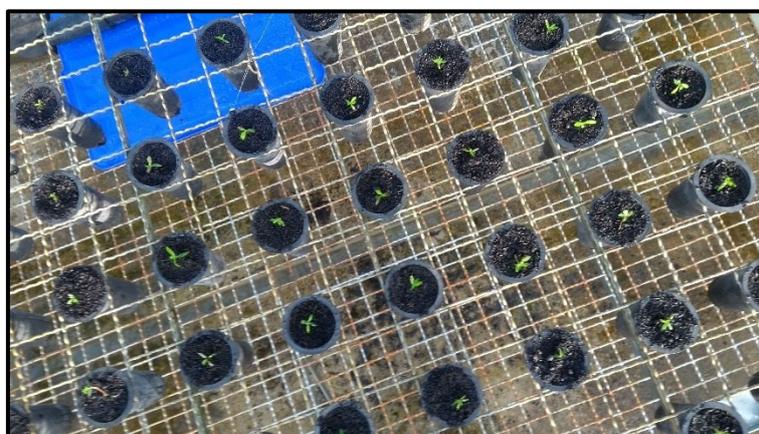


Fonte: O Autor.

3.2.2 Aclimatização (*cultivo ex vitro*) e cultivo *in vivo* de cultivares

As plantas regeneradas *in vitro* foram transferidas para a casa de vegetação tecnológica, com irrigação automática e acondicionadas em tubetes plásticos (6,5 cm de diâmetro x 14 cm de altura) contendo substrato comercial Mecplant® (Figura 5). Após 90 dias de aclimatização, foi realizada a retirada aleatória de plantas com posterior coleta de suas folhas para os estudos morfoanatômicos.

Figura 5. Plantas transferidas do cultivo *in vitro* para tubetes plásticos com substrato Mecplant®, levadas a casa de vegetação



Fonte: O autor.

Para o cultivo *in vivo* foram utilizadas plantas jovens (com 6 meses), germinadas em viveiro a partir de sementes, e mantidas em vasos plásticos com substrato comercial Mecplant® em condições de casa de vegetação tecnológica, com irrigação automática. As coletas das folhas foram realizadas em folhas saudáveis, do segundo e terceiro nó.

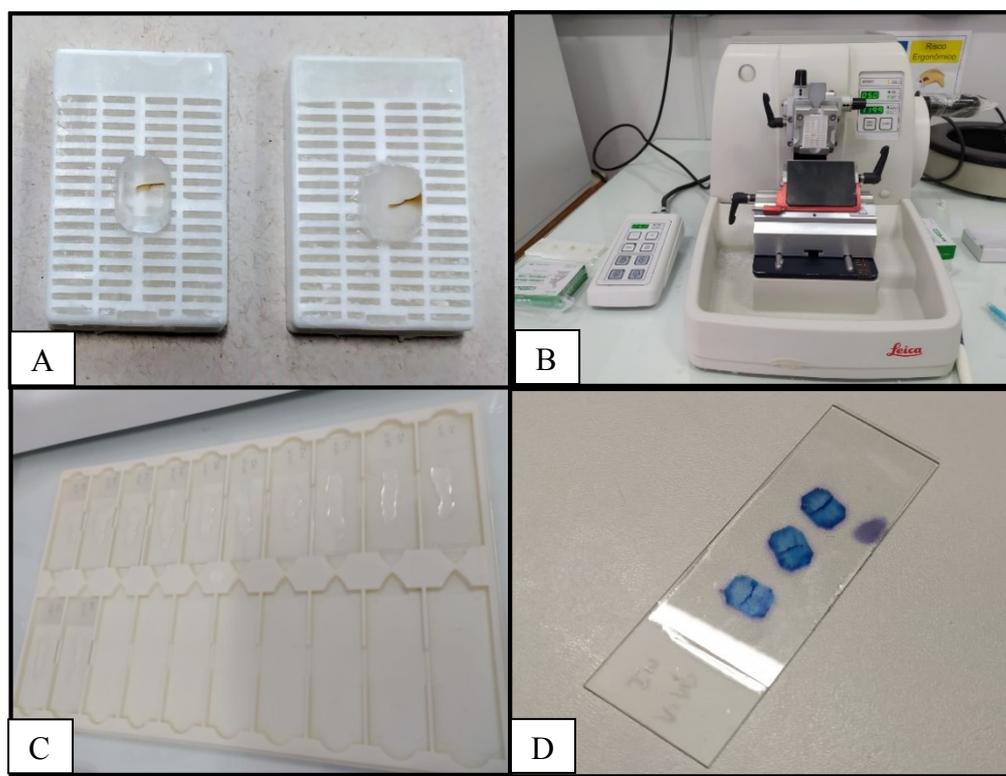
3.3 PREPARAÇÃO DE LAMINAS E ANÁLISES MORFOANATOMICAS

Para a preparação das lâminas histológicas foram utilizadas folhas saudáveis oriundas de indivíduos de cada condição de cultivo (*in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*), obtidas do terço médio das regiões intercostais (entre as nervuras). Em seguida, os fragmentos do terço mediano foram fixados em FAA 70 composto por formaldeído 37%, etanol 70° GL, e ácido acético (JOHANSEN, 1940). Após 48 horas de fixação os segmentos das folhas foram submetidos a imersão em etanol 70% para que fosse feita a sua conservação.

Para a análise de determinação de densidade estomática, dimensão do poro estomático e das células-guarda foram realizadas lâminas temporárias, observadas em vista frontal. Para a análise da espessura da cutícula, secções transversais à mão livre, com o auxílio de lâmina de barbear foram feitas e identificadas com Sudan IV (O' BRIEN et al., 1965). Após a obtenção das lâminas temporárias foi feita a observação em microscopia de luz (ML).

Para a análise das demais estruturas (espessura da epiderme, em ambas as faces, e a espessura do parênquima paliçádico e esponjoso) foram realizadas lâminas permanentes. Para a preparação das lâminas permanentes, o material fixado descrito anteriormente, e conservado em etanol 70° GL foi desidratado em série etílica (até 95° GL) e incluído em historesina (hidroxietilmetacrilato), conforme Kraus & Arduin (1997). Após a desidratação, o material ficou imerso por 12 horas em solução de pré-infiltração e 12 horas em solução de infiltração. Em seguida, foram montados blocos de resina (Leica Historesin®), contendo o material vegetal (Figura 6A). Os blocos foram seccionados com 5 µm de espessura, em micrótomo de rotação Leica — RM 2125 RT (Figura 6B). As secções foram distendidas sobre lâminas contendo água (Figura 6C). Após a secagem das lâminas, o material foi corado com azul de toluidina 0,25% aquoso (Figura 6D).

Figura 6. Processo para realização das lâminas permanentes. (A) Blocos de resina contendo material vegetal; (B) Micrótomo de rotação em que foram seccionados os blocos de resina; (C) Lâminas em que os cortes foram distendidos em água; (D) material corado em azul de toluidina 0,25% aquoso.



Fonte: O Autor.

As lâminas temporárias e permanentes foram observadas em microscópio de luz, marca Olympus modelo BX53F com sistema digital de captura de imagem, e mensuração em μm , pelo software Cell Sens Standard®. As análises no cultivo *in vitro* foram feitas comparando-se os parâmetros morfoanatômicos nas condições sistema de ventilação natural (tampas tipo BioSama®) e sistema convencional (tampas sem troca gasosa).

3.4 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE CLOROFILAS E CAROTENÓIDES

A avaliação do teor de clorofila *a*, *b*, clorofila total e o teor de carotenoides totais foi realizada conforme a metodologia descrita por Hiscox e Israelstam (1979) para o cultivo *in vitro* nos diferentes sistemas de tampas. Inicialmente, foi realizada a incubação em banho-maria de amostras de 100 mg de folhas frescas, sadias, com 7 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) pelo período de duas horas a 65°C, sem maceração. Após a filtragem, o volume total foi corrigido para 10 mL. A obtenção dos valores foi realizada por meio de espectrofotometria de UV-visível em microplaca (SpectraMax® Paradigm® Multi-mode Detection Platform) levando-se em conta a densidade óptica medida a 480

nm, 649 nm e 665 nm. Foram realizadas cinco repetições para cada condição de cultivo (*in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*). Para estimar o teor de clorofilas e carotenoides foram utilizadas as equações 1,2,3,4 conforme Wellburn (1994):

$$(1) \text{Chla} = [(12,19 \times A665) - (3,45 \times A649)];$$

$$(2) \text{Chlb} = [(21,99 \times A649) - (5,32 \times A665)];$$

$$(3) \text{ChlT} = (\text{Chla} + \text{Chlb})$$

$$(4) \text{CaT} = [(1.000 \times A480) - (2,14 \times \text{Chla}) - (70,16 \times \text{Chlb})] / 220$$

Legenda: Clorofila *a* = (Chla); Clorofila *b* = (Chlb); Clorofilas totais = ChlT; Carotenoides totais = CaT, em mg/100mg de massa fresca.

3.5 ÍNDICE DE PLASTICIDADE FENOTÍPICA

O índice de plasticidade fenotípica foi calculado para cada parâmetro anatômico e fisiológico, de acordo com a metodologia utilizada por Valladares et al. (2006), baseando-se em médias máximas e mínimas, expresso pela equação 5:

$$(5) \text{IP} = (M - m) / M$$

Onde: IP: índice de plasticidade; M: média máxima; m: média mínima.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Nos diferentes tipos de cultivo de *A. sellowiana* as análises foram constituídas de 30 repetições, obtidas de 10 indivíduos, para cada tratamento/condição de cultivo.

Os dados foram submetidos aos procedimentos de detecção de Outliers pelo teste de Grubbs (1969). As médias foram submetidas ao teste de normalidade dos resíduos (SHAPIRO; WILK, 1965) e teste de homogeneidade (BARTLETT, 1937). As médias foram comparadas por ANOVA, seguida do teste de separação de médias de Tukey (1949) a 5% de probabilidade, através do programa computacional R v. 3.5.3 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CULTIVO *In vitro* EM SISTEMA CONVENCIONAL E DE VENTILAÇÃO NATURAL

4.1.1 Densidade e dimensão dos estômatos

As folhas de *Acca sellowiana* são hipoestomáticas, com estômatos anomocíticos. A densidade dos estômatos diferiu entre os tratamentos, apresentando maior média de estômatos/mm² no sistema de ventilação natural quando comparado ao sistema convencional de micropropagação (Tabela 1 e Figura 7).

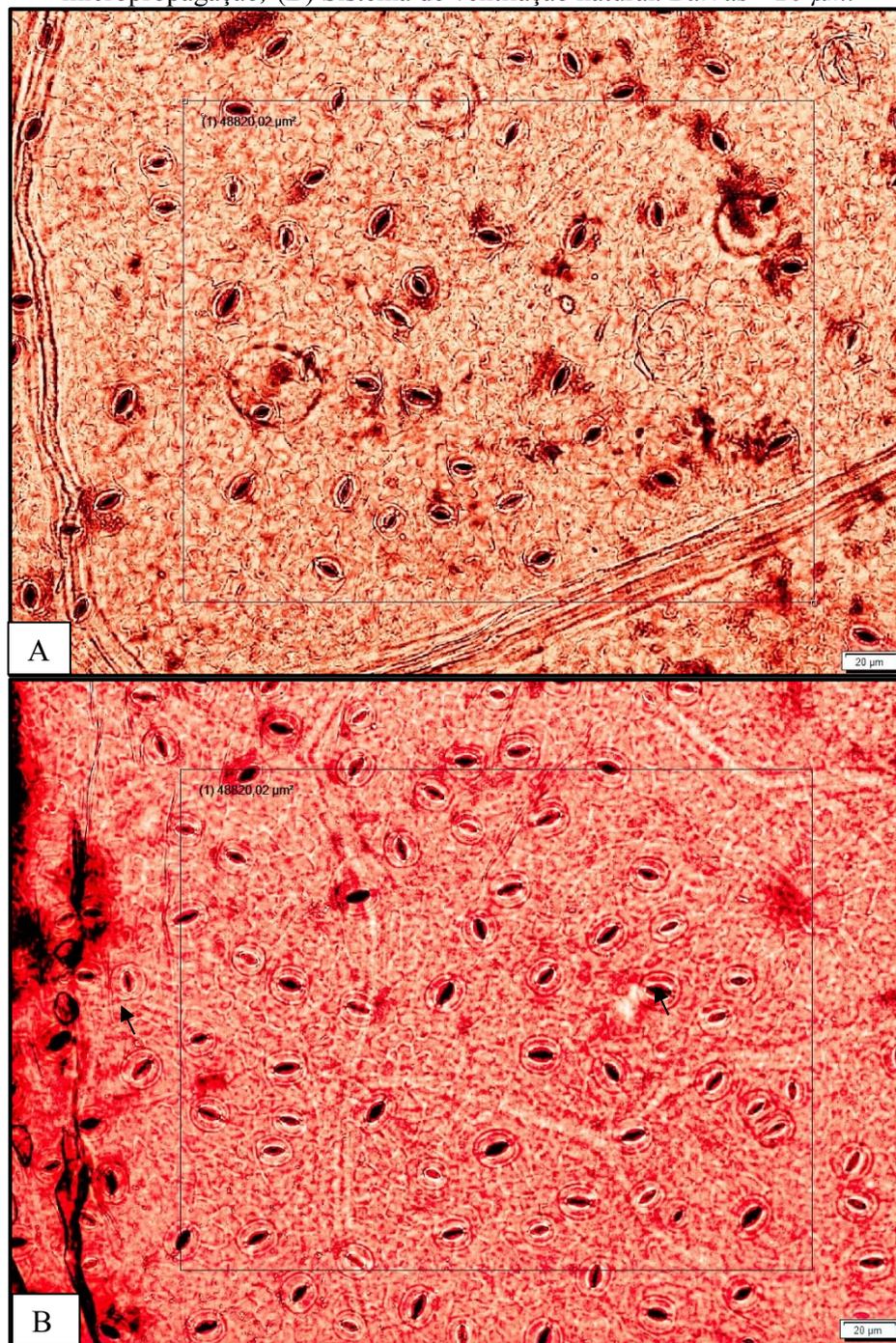
Tabela 1. Densidade e dimensões estomáticas em folhas de *Acca sellowiana*(O.Berg.) Burret em sistema convencional e sistema de ventilação natural no cultivo *in vitro*. Legenda: SCM= Sistema Convencional de Micropropagação; SVN= Sistema de Ventilação Natural.

	Densidade estomática (est/mm ²)	Largura do estômato (µm)	Comprimento do estômato (µm)	Largura do poro estomático (µm)	Comprimento do poro estomático (µm)
SCM	597 a	12,70 a	15,70 a	5,40 a	9,96 a
SVN	711 b	12,90 a	16,30 b	5,82 a	10,67 b
CV%	24,84	5,58	5,27	15,57	8,48

Letras maiúsculas diferentes na vertical indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste Tukey a 5%.

A folha hipoestomática com estômatos anomocíticos são características freqüentemente encontradas em outras espécies da família Myrtaceae (GOMES et al., 2009).

Figura 7. Vista frontal da epiderme da face abaxial de folhas de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret no cultivo *in vitro* evidenciando os estômatos (seta). (A) Sistema convencional de micropropagação; (B) Sistema de ventilação natural. Barras= 20 μm .



Fonte: O autor.

Os resultados morfométricos encontrados corroboram com os resultados encontrados por Braga et al. (2007) em seu estudo sobre *Dendranthema grandiflora*, onde apresentou maior densidade de estomática no sistema de ventilação natural. Braga et al. (2007) ressalta que esse aumento na densidade estomática demonstra que o ambiente de ventilação natural se aproxima de ambiente natural, sendo possível esse aumento no

número de estômatos quando se aumenta a exposição à luz e CO₂. Decchetti et al. (2008) também encontraram uma maior densidade de estômatos sob sistema de ventilação natural, o mesmo ressalta que esta característica se deve a umidade do ar no interior do ambiente.

O sistema de ventilação natural favorece a redução da umidade relativa *in vitro* assim como aumenta as trocas gasosas com o ambiente (CASANOVA et al., 2008), além de prover adequada organização celular dos tecidos foliares, assim como maior sucesso na aclimatização, decorrente a baixas taxas de perda de água (DECCHETTI et al., 2008). Em folhas de *Acca sellowiana*, o sistema de ventilação natural deve promover aumento das trocas gasosas e favorecer a aclimatização. De acordo com Lima et al. (2006), o aumento na densidade estomática permite que a planta eleve a condutância de gases, evitando assim que a fotossíntese seja limitada sob diferentes condições de ambiente, como nos dois sistemas de trocas gasosas desse estudo.

Em relação à dimensão dos estômatos, os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas quanto a dimensão estomática equatorial (largura do estômato) e dimensão do poro estomático equatorial (largura do poro estomático). No entanto, a dimensão estomática polar (comprimento do estômato) e do poro estomático polar (comprimento do poro) apresentaram diferenças entre os tratamentos, sendo maiores em sistema de ventilação natural. Silva et al (2014) em seus estudos sobre abacaxizeiro micropropagado, encontrou maior diâmetro polar e equatorial para o material que estava na condição do sistema de ventilação natural, ressaltando que o diâmetro polar tendeu a ser maior que o diâmetro equatorial entre tratamentos, apresentando semelhança aos resultados encontrados neste estudo.

Segundo Khan et al. (2003) a forma elíptica dos estômatos demonstra sua funcionalidade, quando mais arredondado for o estômato, menos funcional o mesmo se torna. Portanto, quanto mais o ambiente se aproximar do natural (*ex vitro*) mais importante se torna essa funcionalidade, pois ela impede a exagerada dessecação do material micropropagado, podendo assim aumentar as taxas de sobrevivência quando o material for aclimatizado. Pospíšilová et al. (1999) citam que os estômatos de plantas sob o sistema de cultivo *in vitro* são malformados, mais arredondados, reduzidos em número e inábeis para a função, tornando as plantas mais suscetíveis à desidratação na fase de aclimatização. O presente estudo evidencia a característica de estômatos menos

arredondados no sistema de cultivo em ventilação natural, sugerindo melhor funcionalidade desses estômatos.

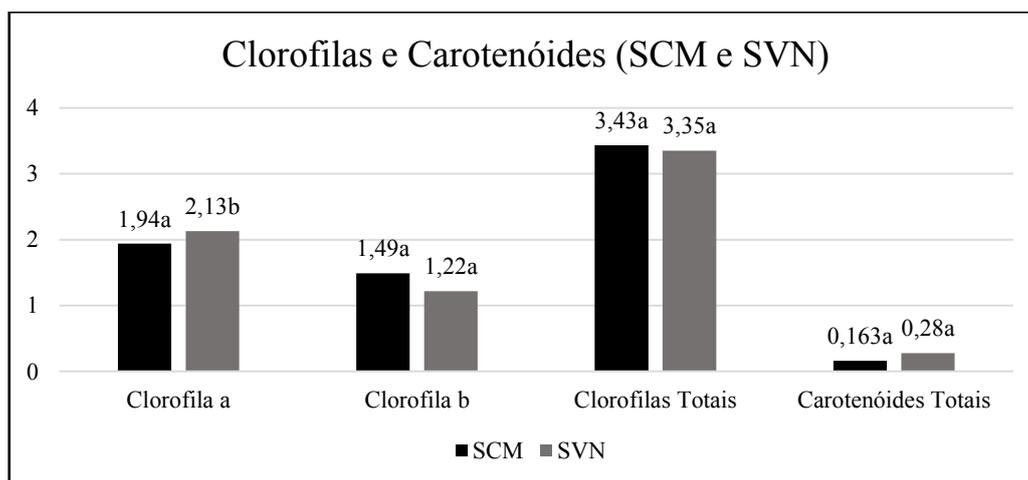
As maiores dimensões do poro estomático e da densidade estomática em sistema de ventilação natural devem constituir numa estratégia de *Acca sellowiana* para promover aumento da captação de gás carbônico e transpiração estomática.

4.1.2 Pigmentos fotossintéticos

A concentração de pigmentos fotossintéticos em folhas de *A. sellowiana* nos sistemas de cultivo *in vitro* apresentou diferença estatística apenas para o teor de clorofila *a*, onde o sistema de ventilação natural apresentou maior concentração quando comparado ao sistema de micropropagação convencional (Figura 8). O teor de clorofila *b*, clorofilas totais e carotenoides totais não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos.

De acordo com Cruz (2017), a eficiência fotossintética está diretamente relacionada ao conteúdo de clorofilas e carotenoides presentes nas plantas, e consequentemente, relacionado ao seu crescimento e adaptabilidade ao ambiente.

Figura 8. Concentração de pigmentos fotossintéticos em folhas de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret em sistema convencional e sistema de ventilação natural no cultivo *in vitro*. Valores em mg/g de massa fresca.



Fonte: O autor.

Neste estudo o maior teor de clorofila *a* foi encontrado em plantas cultivadas sob sistema de ventilação natural (2,13mg /g de massa fresca), este dado corrobora com o encontrado por Batista (2012), em seu estudo sobre pimenteira ornamental, que também observou níveis mais elevados para clorofila *a*, no sistema de ventilação natural, e

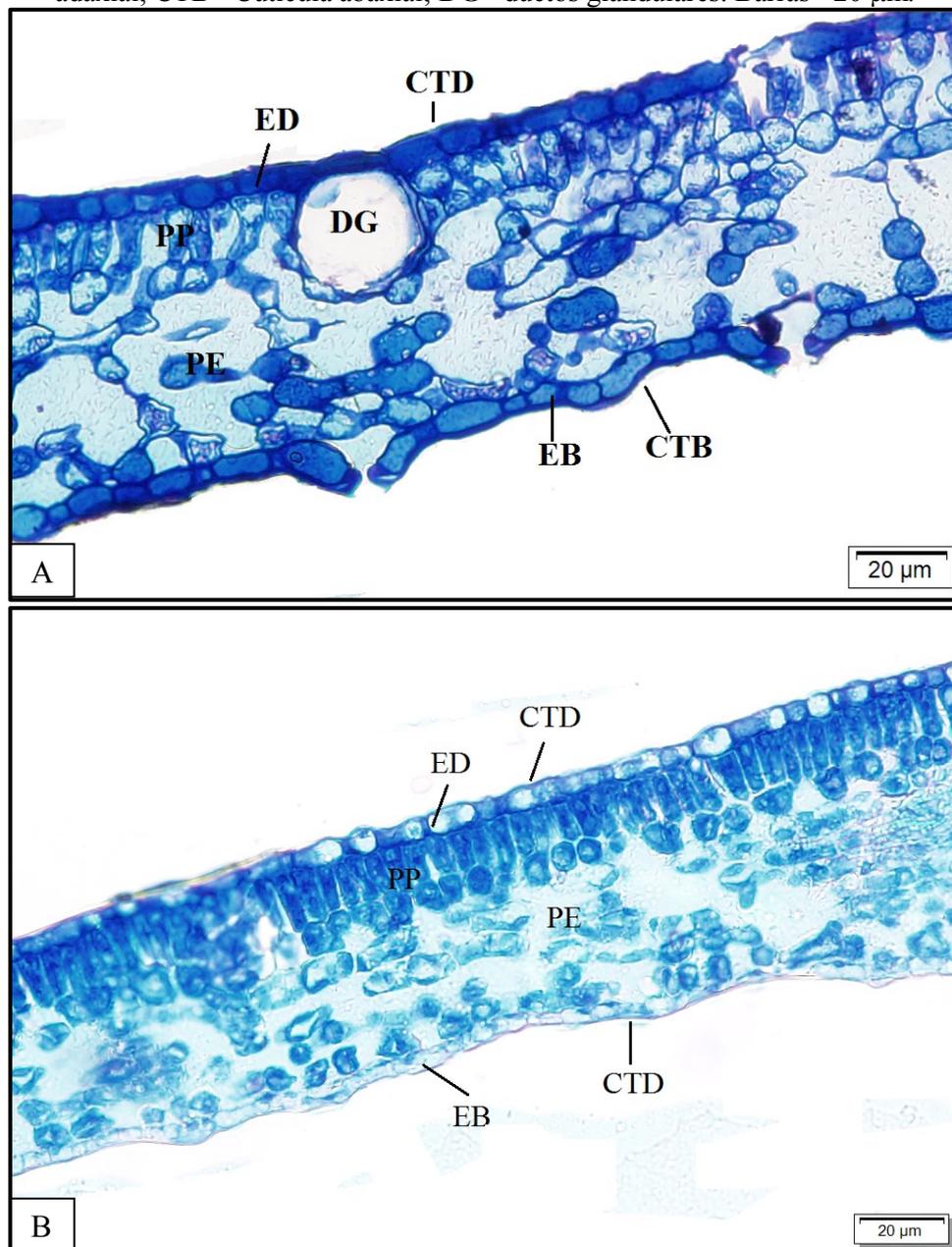
classificou o sistema como eficiente. Neste mesmo estudo o autor também observou para esta condição valores maiores para clorofila *b* e carotenoides totais. Ivanova e Standen (2010) em seu estudo sobre hiperidricidade em culturas de brotos de *Aloe polyphylla Schönland*, também encontraram níveis mais elevados de clorofila com o aumento de ventilação no frasco, o mesmo foi encontrado por Silveira et al. (2019), no seu estudo com *Eugenia dysenterica*, com um aumento de aproximadamente 86% dos níveis de clorofila *a* no sistema de ventilação natural. Provavelmente, por haver trocas de CO₂ com o ambiente, o sistema de ventilação natural ocasionou maior síntese de clorofila *a* em plantas micropropagadas de *A. sellowiana*, resultando por sua vez em um aparato fotossintético mais ativo (ANYIA; HERZOG, 2004).

O sistema de propagação convencional favorece o aumento de concentração de gás etileno e a redução da concentração de CO₂, no ambiente *in vitro*, podendo causar alterações fisiológicas na planta (SILVA, et al. 2014). Já o sistema de ventilação natural pode contribuir para que haja a eliminação do etileno para o meio externo e o aumento das trocas gasosas, possibilitando uma maior taxa de transpiração e fotossíntese das plantas, o que pode contribuir positivamente no crescimento (PINHEIRO et al., 2013). Nepomuceno et al. (2009) acrescenta ainda que além do crescimento, o uso do sistema de ventilação pode ajudar no controle da abscisão foliar.

4.1.3 Epiderme, tecidos do mesofilo e xilema

A epiderme em *A. sellowiana* é unisseriada em ambas as faces da lâmina foliar, com estômatos acima do nível das demais células epidérmicas (ordinárias). O mesofilo é dorsiventral, com a presença de parênquima paliçádico voltado para a face adaxial, constituído de uma única camada organizada (uniestratificado), e de parênquima esponjoso voltado para a face abaxial. No mesofilo são observados ductos glandulares em folhas com sistema de ventilação natural.

Figura 9. Secções transversais de folha de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret em sistema convencional e sistema de ventilação natural no cultivo *in vitro*. Sistema de ventilação natural (A) e Sistema convencional de micropropagação (B). Legenda: ED = Epiderme adaxial; EB = Epiderme abaxial; PP = parênquima paliçádico; PE = Parênquima esponjoso; CTD = cutícula adaxial; CTB= Cutícula abaxial; DG= ductos glandulares. Barras= 20 μ m.



Fonte: O autor.

Efeitos significativos na morfometria dos tecidos da lâmina foliar de *A. sellowiana* nos dois sistemas de cultivo *in vitro* foram encontrados (Tabela 2). A espessura do mesófilo, do parênquima paliçádico, do parênquima esponjoso e do perímetro do xilema foram menores em folhas de plantas no cultivo em sistema de ventilação natural. A espessura da cutícula na face abaxial foi maior em sistema de

ventilação natural. A espessura da lâmina foliar, da epiderme na face abaxial e adaxial, e da cutícula na face adaxial não diferiram estatisticamente. (Tabela 2).

Tabela 2. Características morfométricas de tecidos foliares de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret em sistema convencional e sistema de ventilação natural no cultivo *in vitro*. Legenda: SCM= Sistema Convencional de Micropropagação; SVN= Sistema de Ventilação Natural; ELF = Espessura da lamina foliar; EAB = Espessura da epiderme abaxial; EAD = Espessura da epiderme adaxial; EMF = Espessura do mesofilo; EPP = Espessura do parênquima paliçádico; EPE = Espessura do parênquima esponjoso; CTD = Espessura da cutícula adaxial; CTB = Espessura da cutícula abaxial; PX = Perímetro do xilema.

	ELF (μm)	EAB (μm)	EAD (μm)	EMF (μm)	EPP (μm)	EPE (μm)	CTD (μm)	CTB (μm)	PX (μm)
SCM	63,80 a	4,74 a	6,22 a	53,00 a	15,60 a	38,50 a	1,19 a	0,90 b	1.365 a
SVN	59,90 a	5,21 a	6,91 a	46,00 b	13,90 b	34,00 b	1,40 a	1,08 a	967 b
CV%	16,52	19,98	21,42	18,68	16,69	21,67	33,35	29,75	39,94

Letras maiúsculas diferentes na vertical indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste Tukey a 5%.

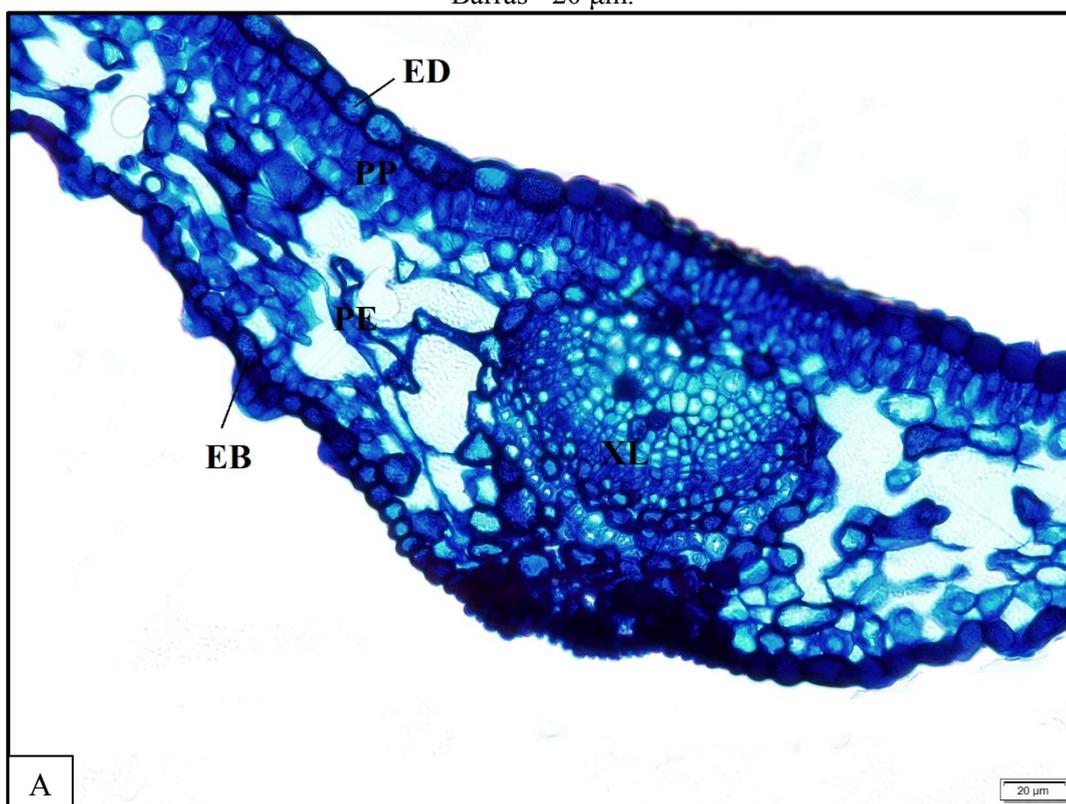
Nas secções transversais (figura 9) para o sistema convencional de micropropagação é possível observar no mesofilo que apesar de maiores células parenquimáticas paliçádicas (15,60 μm) e esponjosas (38,50 μm), o mesmo apresenta menores espaços intercelulares (figura 9B) em relação ao sistema de ventilação natural (Figura 9A). Zobayed et al. (2001) em seus estudos sobre couve-flor e tabaco, também observaram menores espaços intercelulares sob o cultivo *in vitro* com sistema de vedação convencional. No entanto, os resultados desses autores são contrários com as demais características morfométricas encontradas neste estudo, sendo o mesofilo tal como as células que a compõem apresentaram maiores espessuras no sistema de ventilação natural. Majada et al (2000), no entanto encontra em seus estudos características semelhantes para a ventilação natural, onde o mesmo apresenta tamanhos de células menores e maiores espaços intercelulares para esta condição.

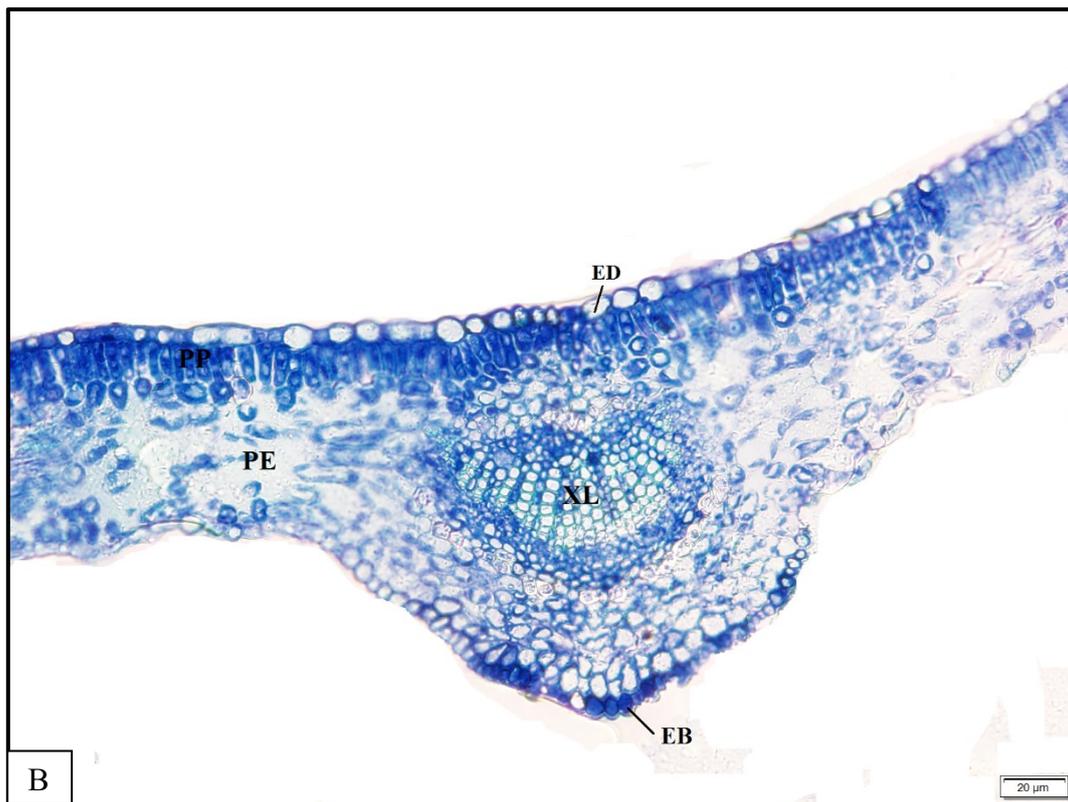
As folhas de *A. sellowiana* em sistema de ventilação natural apresentaram camada mais espessa de cutícula na face abaxial (1,08 μm) em relação ao sistema convencional (0,90 μm). Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os estudos sobre couve-flor (ZOBAYED et al.,2001) e cravo (MAJADA et al., 2000), onde os autores encontraram camadas cuticulares mais delgadas em vasos herméticos. Zobayed et al. (2001) ressalta que camada mais espessa de cutícula em ambientes com ventilação se

deve a menor umidade relativa no interior do frasco, onde este fato pode ajudar no aumento de produção de lipídios da planta e reduzir a perda de água.

Os feixes vasculares de folhas de *A. sellowiana* são do tipo colateral (Figura 10). A morfometria do perímetro da área xilemática no feixe vascular de primeira ordem demonstrou menores valores em folhas no sistema de ventilação natural (967 μ m), em relação ao sistema convencional (1.365 μ m). Os resultados encontrados neste estudo não são identificados por outros autores, para as espécies de batata micropropagadas (MOHAMED; ALSADON, 2010), abacaxi (SILVA et al., 2014) ejoba (MILLS et al, 2004). Os referidos autores encontraram maior área de xilema e também uma melhor organização para mudas micropropagadas sob sistema de ventilação natural.

Figura 10. Secções transversais da nervura principal *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret em sistema de ventilação natural (A) e convencional (B) no cultivo *in vitro*. Legenda: XL = xilema. Barras= 20 μ m.





Fonte: O autor.

Os resultados obtidos em folhas de *A. sellowiana* no sistema de ventilação natural com menor espessura do mesofilo, incluindo o parênquima paliçádico e esponjoso, correlacionado com o aumento da densidade estomática e maior dimensão dos estômatos podem estar associados com a maior perda de água nesse sistema de cultivo. Essa maior perda de água deve estar reduzindo a pressão de turgor das células, ocasionando menor volume (espessuras) e menor número de células formadas em sua morfogênese.

Ribeiro (2006) elucida em seus estudos que a influência dos sistemas de vedação, em alguns casos, inclusive em seu estudo sobre berinjela, pode apresentar respostas positivas, mas que isso pode ser relativo e depende da espécie alvo, onde seus resultados podem ser nulos ou até mesmos negativos.

4.2 CULTIVO *In vitro*, *Ex vitro* e *In vivo*

4.2.1 Densidade e dimensão dos estômatos

Diferenças significativas foram encontradas para as características morfométricas (densidade e dimensão) relacionadas aos estômatos no cultivo *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*. De acordo com os resultados obtidos (Tabela 3) é possível observar que densidade

estomática não apresentou diferença estatística entre o cultivo *ex vitro* e *in vivo*, no entanto ambas foram superiores ao cultivo *in vitro*. Com relação a largura do estômato o tratamento *in vitro* apresentou maior dimensão em relação as demais (*ex vitro* e *in vivo*).

Tabela 3. Densidade e Dimensões estomáticas das folhas de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret no cultivo *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*.

	Densidade estomática (est/mm ²)	Largura do estômato (µm)	Comprimento do estômato (µm)	Largura do poro estomático (µm)	Comprimento do poro estomático (µm)
In vitro	597 b	12,70 a	15,70 a	5,40 a	9,96 a
Ex vitro	1141 a	12,10 b	14,80 b	5,00 ab	9,09 b
In vivo	1232 a	11,90 b	15,50 a	4,55 b	9,93 a
CV%	32,45	5,69	6,65	21,47	13,61

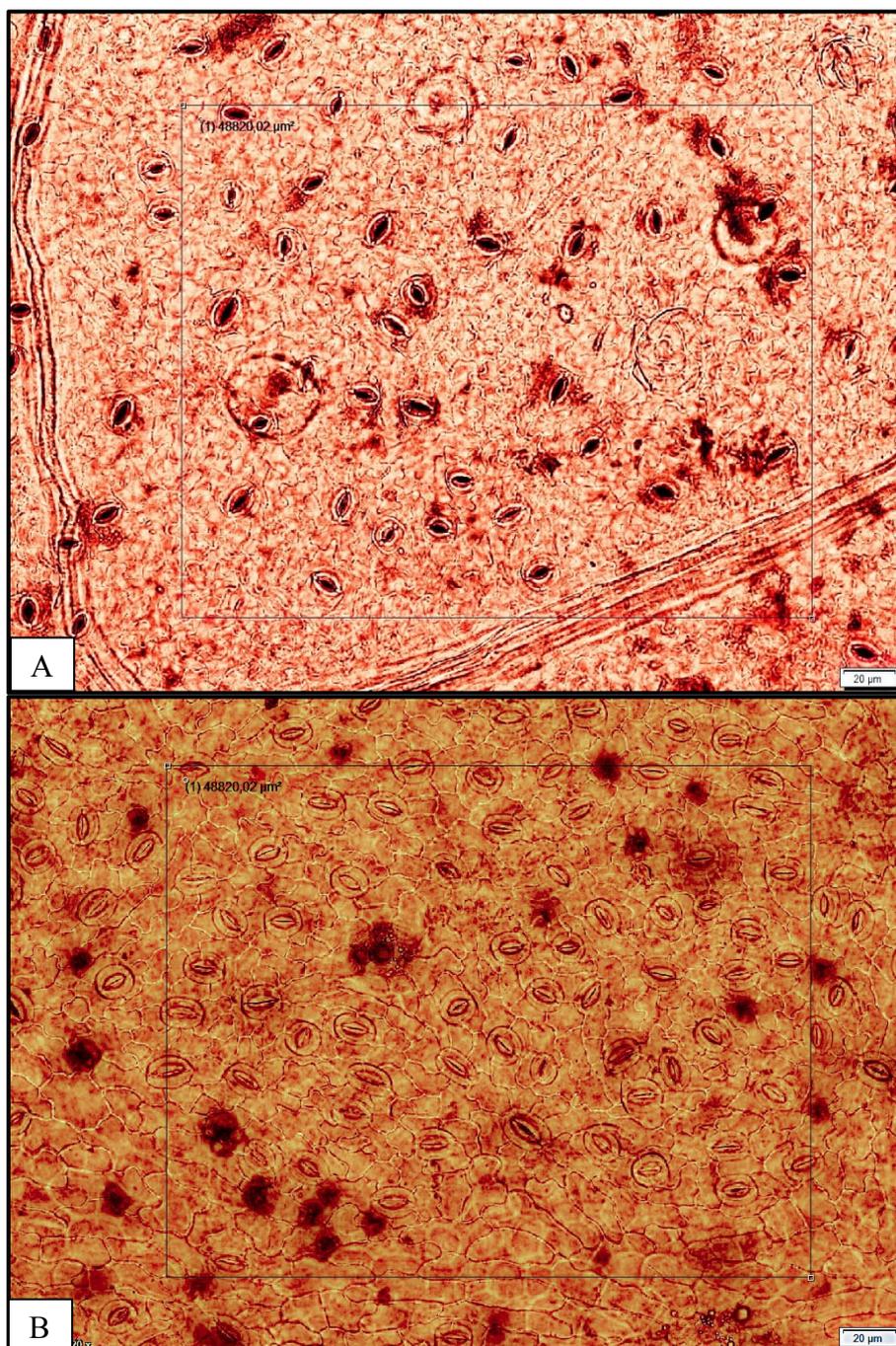
Letras maiúsculas diferentes na vertical indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste Tukey a 5%.

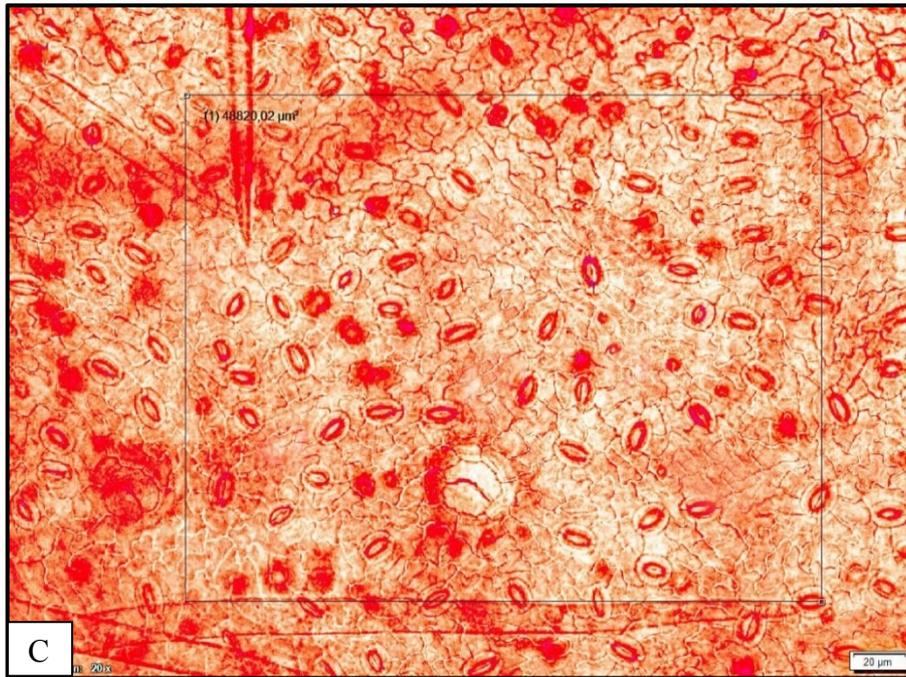
A densidade estomática tem uma alta plasticidade em plantas de acordo com o ambiente em que se encontram (DOUSSEAU et al., 2008). Os dados encontrados nesse estudo concordam com esta afirmativa, onde plantas aclimatizadas (1141 est/mm²) e *in vivo* (1232 est/mm²) tem maior densidade, demonstrando então uma alta plasticidade (Figura 11). Na literatura existem estudos que comparam essas características em folhas *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*. Estudos feitos por Maciel et al. (2014) para *Piper aduncum*, e Batagin-Piotto et al. (2012) para pupunheira, encontraram maior densidade de estômatos na condição *in vivo*. Rodrigues et al. (2020) estudando a planta de Neem, encontraram maior número de estômatos para plantas aclimatizadas, quando comparado a condição *in vitro*, o mesmo foi encontrado por Aliniaiefard et al. (2014) em seus estudos sobre *Vicia faba*. Resultados contrastantes foram observados nos estudos com *Tabebuia roseo alba*, onde a maior densidade estomática foi observada em plantas no cultivo *in vitro* (ABBADÉ et al., 2009). Considerando essa variação de respostas na densidade estomática de diferentes espécies fica evidente a diversidade de estratégias morfofisiológicas inerentes a cada espécie, com reflexos nos processos fotossintéticos e de controle hídrico.

Segundo Pospíšilová et al. (1999), as características encontradas durante o cultivo *in vitro* pode sofrer alterações quando passadas para a fase de aclimatização, o autor também ressalta que essas mudanças podem ser graduais de acordo com as condições

ambientais. Neste presente estudo com *A. sellowiana* é possível observar que a planta aclimatizada possui densidade de estômatos semelhantes a planta matriz, demonstrando a capacidade da planta em se adaptar ao novo ambiente e favorecer a sobrevivência no processo de micropropagação

Figura 11. Vista frontal da epiderme na face abaxial de folhas de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burretno cultivado *in vitro* (A), *ex vitro* (B) e *in vivo* (C). Barras= 20 μ m.





Fonte: O autor.

O comprimento do estômato e do poro estomático foi menor no cultivo *ex vitro*. A largura do poro estomático não sofreu alteração na transição do cultivo *in vitro* para o cultivo *ex vitro* (aclimatização), entretanto, as menores larguras do poro foram observadas no cultivo *in vivo*. Dousseau et al (2008) em seus estudos sobre *Tabebuia serratifolia* encontrou maior diâmetro equatorial para plantas cultivadas *in vitro*, assim como um maior diâmetro polar estomático, não avaliando as dimensões do poro estomático. Este presente estudo com *A. sellowiana* demonstra que após o transplante para o cultivo *ex vitro* a planta teve uma redução quanto a dimensões dos seus estômatos, o que pode ser associado a capacidade de controlar a perda de água nas folhas quando a planta é submetida as estas condições de transplante (POSPÍŠILOVÁ et al., 1999). Em seus estudos sobre *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*, Maciel et al., (2014) também observaram estas características para condição *ex vitro*. Fermino Junior e Scherwinski-Pereira (2009) ressaltam que o aumento das dimensões dos estômatos no cultivo *in vitro* podem estar relacionados com a falta do controle de abertura e fechamento dos estômatos, pois quando a planta é levada para a aclimatização a planta diminui suas dimensões, concordando com Pospíšilová et al., 1999, sobre o controle de perda de água, possibilitando sua sobrevivência.

No cultivo *in vivo* a planta apresentou dimensões inferiores ao cultivo *in vitro* para o diâmetro equatorial da célula guarda e do poro estomático, e apresentou dimensões que

não diferiram estatisticamente para o diâmetro polar da célula guarda e do poro estomático, demonstrando assim que os estômatos encontrados nas plantas *in vivo*, são mais alongados, e conferem a planta uma maior funcionalidade. Estes resultados também foram observados nas espécies de *Annona bahiensis*, *Annona cauliflora*, *Annona glabra* e *Annona squamosa*, (SANTANA et al., 2008). De acordo com Khan et al. (2003) a alteração na forma do estômato está diretamente ligada à sua funcionalidade, quanto mais elíptico for o estômato, maior sua funcionalidade.

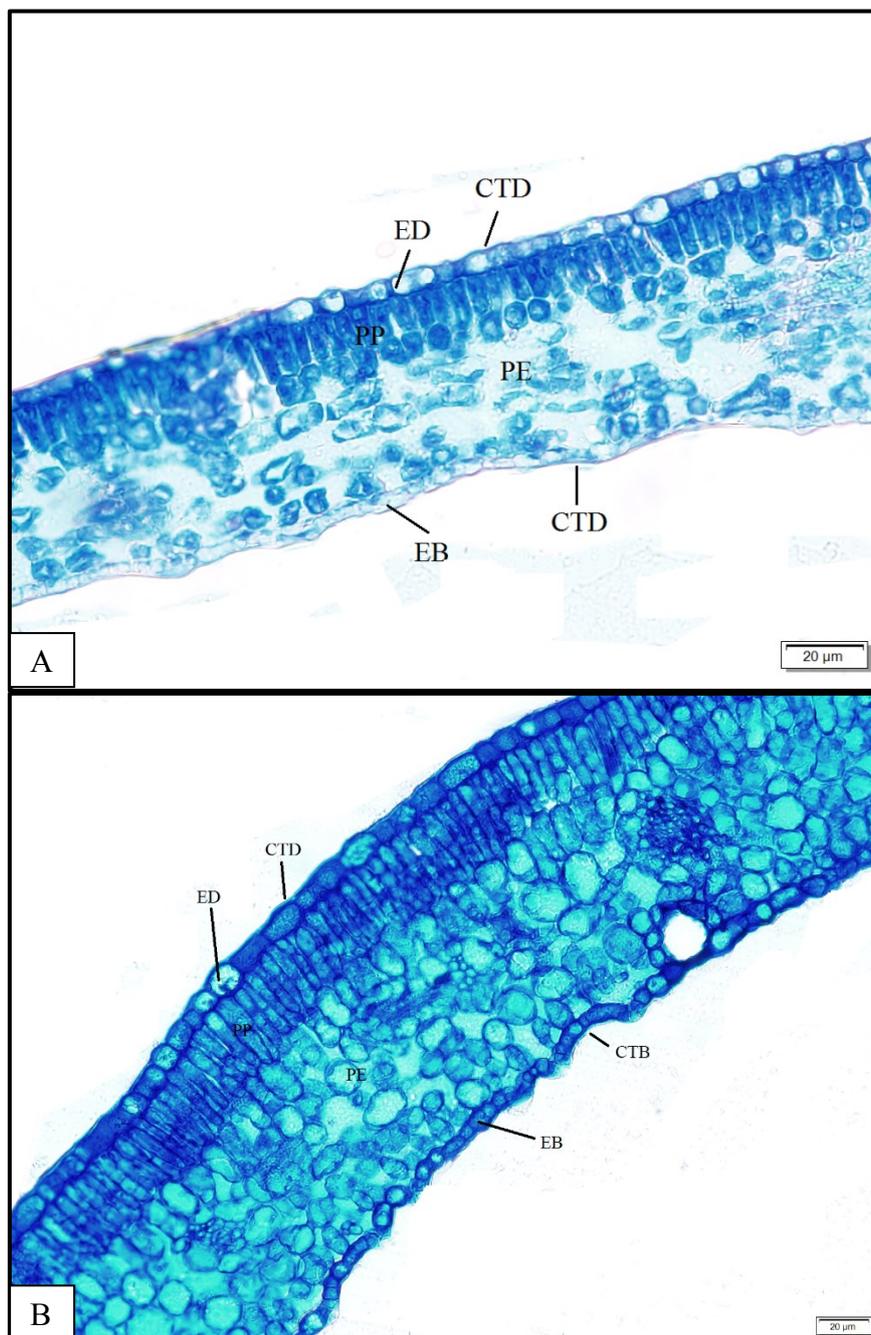
Os estômatos são estruturas epidérmicas responsáveis por importantes mecanismos fisiológicos como o controle da entrada de gás carbônico e a regulação da perda de água por transpiração (CASSON & HATHERINGTON, 2010). A condutância estomática é um parâmetro regulado pela densidade estomática e o tamanho das aberturas dos estômatos (CAMARGO & MARENCO, 2011). A condutância estomática envolve maior resistência às moléculas de água do que às moléculas de gás carbônico (TERASHIMA et al., 2006). Nesse sentido, em folhas de *A. sellowiana* a transição do cultivo *in vitro* para o *ex vitro* induz uma adaptação foliar no sentido de aumentar a densidade estomática e reduzir a dimensão dos estômatos. A redução nas dimensões estomáticas deve promover aumento da resistência à passagem de água por transpiração, elevando a capacidade de captura de gás carbônico e evitando um estresse hídrico.

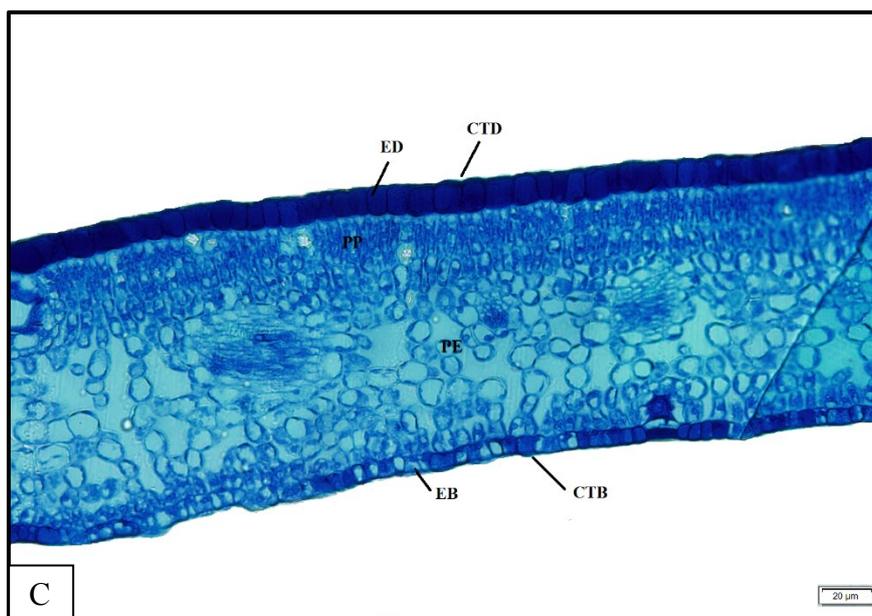
4.2.2 Epiderme, tecidos do mesofilo e xilema

As folhas de *A. sellowiana* em todos os tratamentos (Figura 12), em seções transversais, apresentam epiderme unisseriada, tanto na face adaxial como abaxial da lâmina foliar. O mesofilo é dorsiventral composto por parênquima paliçádico voltado para a face adaxial e parênquima esponjoso voltado para a face abaxial. No cultivo *in vitro*, o parênquima paliçádico é composto por um estrato de células pouco alongadas e pouco compactadas (Figura 12A). Já no cultivo *ex vitro* e *in vivo*, o parênquima paliçádico é biestratificado e triestratificado, com células mais colunares e mais compactado (Figuras 12B e 12C). A cutícula é observada em todos os tratamentos, embora no cultivo *ex vitro* ela seja mais expressiva do que nos demais cultivos (*in vitro* e *in vivo*). O feixe vascular da nervura central das folhas é do tipo colateral, sendo que as células parenquimáticas sob o feixe vascular (adjacente ao floema) são mais numerosas, volumosas e com maiores espaços intercelulares (Figura 13). As características encontradas neste estudo estão de

acordo com Gomes et al., (2009) afim de colaborar com a taxonomia e filogenia de espécies de Myrtaceae, através da anatomia foliar.

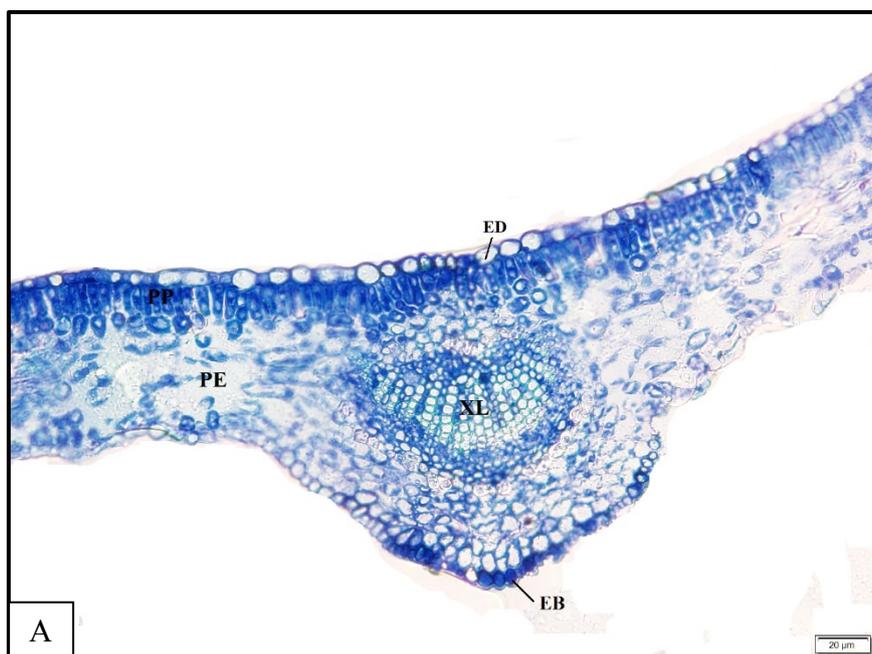
Figura 12. Secções transversais da espécie de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret, no cultivo *in vitro* (A), *ex vitro* (B) e *in vivo* (C). Legenda: ED = Epiderme adaxial; EB = Epiderme abaxial; PP = parênquima paliçádico; PE = Parênquima esponjoso; CTD = cutícula adaxial; CTB= Cutícula abaxial. Barra = 20 µm.

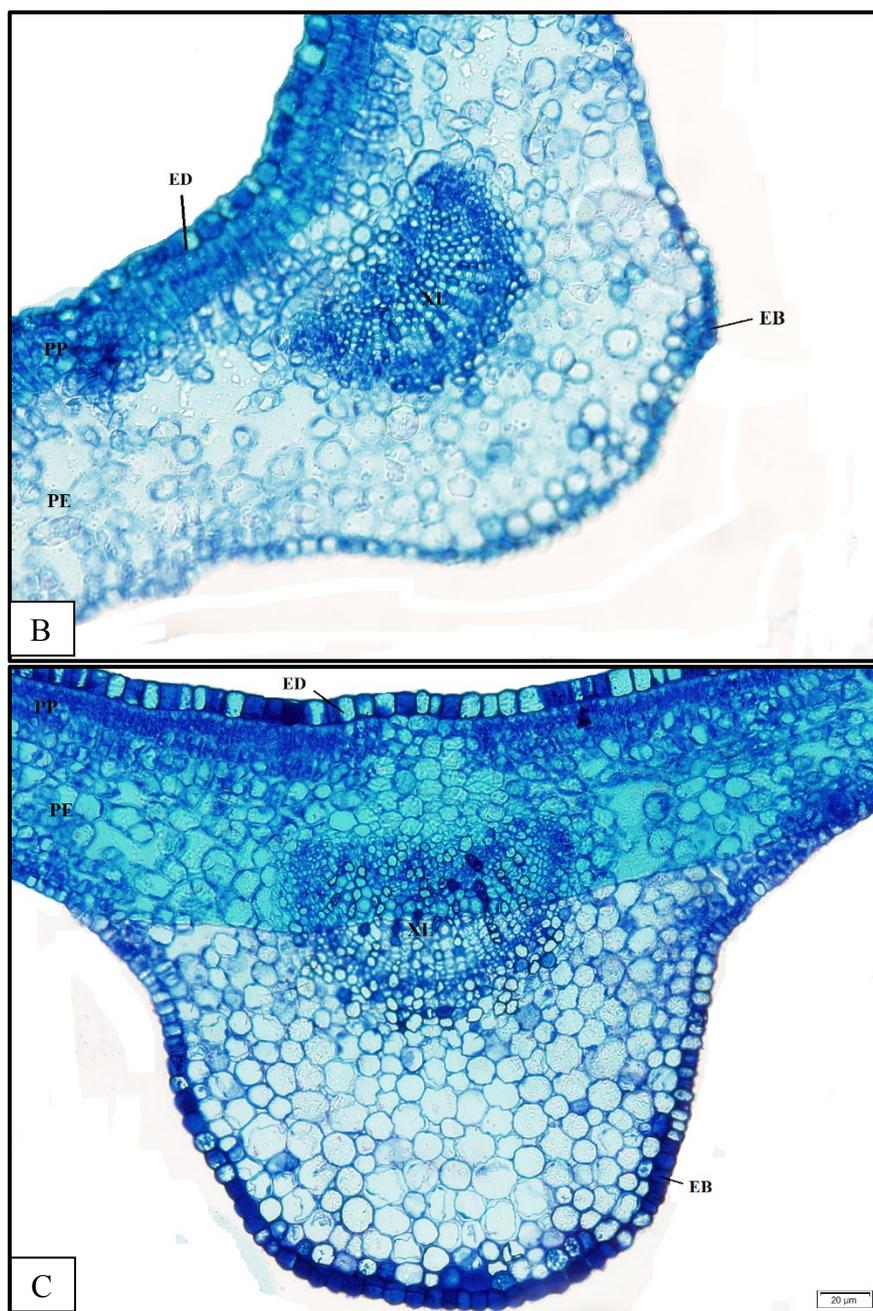




Fonte: o autor.

Figura 13. Secção transversal da nervura principal de folhas de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret no cultivo, *in vitro* (A), *ex vitro* (B) e *in vivo* (C). Legenda: ED = Epiderme adaxial; EB = Epiderme abaxial; PP = Parênquima esponjoso; XL = xilema. Barra = 20 μm.





Fonte: o autor.

Os tecidos da lâmina foliar de *A. sellowiana* apresentaram diferenças significativas nas diferentes condições de cultivo no processo de micropropagação (Tabela 4).

Tabela 4. Espessura da lâmina foliar, células epidérmicas, mesofilo, parênquimas paliçádico e esponjoso, cutícula e perímetro da área de xilema para folhas *deAcca sellowiana* (O.Berg.) Burret no cultivo *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*. ELF = Espessura da lamina foliar; EAB = Espessura da epiderme abaxial; EAD = Espessura da epiderme adaxial; EMF = Espessura do mesofilo; EPP = Espessura do parênquima paliçádico; EPE = Espessura do parênquima esponjoso; CTA = Espessura da cutícula adaxial; CTB = Espessura da cutícula abaxial; PX = Perímetro do xilema.

	ELF	EAB	EAD	EMF	EPP	EPE	CTA	CTB	PX
In vitro	63,80 b	4,74 b	6,22 c	53,00 b	15,60 b	38,5 b	0,90 b	1,19 b	1365 c
Ex vitro	116,60 a	6,62 a	8,39 b	102,00 a	29,60 a	72,9 a	1,04 a	1,36 a	1700 b
In vivo	120,90 a	6,71 a	10,34 a	100,00 a	30,00 a	73,5 a	0,81 b	1,06 b	2858 a
CV%	30,40	19,40	24,62	32,88	38,02	33,08	22,21	20,85	39,31

Letras maiúsculas diferentes na vertical indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste Tukey a 5%.

A espessura da cutícula nas faces adaxial e abaxial foram maiores no cultivo *ex vitro* e menores no cultivo *in vitro*. Esta redução na camada pode estar ligada a alta umidade no interior do frasco (BATAGIN-PIOTTO et al., 2012). Werner et al., (2018) também encontraram em seus estudos com *Crambe abyssinica* menor espessura de cutícula para esta condição, para outras espécies também são observadas esta característica em plantas cultivadas *in vitro*, como por exemplo, para Ipê-branco (ABBADÉ et al., 2009), pupunha (BATAGIN-PIOTTO et al., 2012) e *Cymbidium* (MAYER, et al., 2008). A cutícula tem importância essencial no processo de pré-aclimatização, onde seu papel é ajudar a controlar a perda de água na transpiração (YEATS & ROSE, 2013). No cultivo *in vivo*, a espessura da cutícula em ambas as faces foi menor do que no cultivo *ex vitro*. Os resultados com *A. sellowiana* indicam que a troca do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* ocasiona uma mudança abrupta da umidade e radiação solar, resultando num ajuste morfofisiológico para compensar esses diferentes fatores abióticos.

A espessura da epiderme na face abaxial e adaxial foi menor no cultivo *in vitro* do que nos demais cultivos. Costa et al, (2009) encontraram resultados semelhantes para seus estudos sobre bananeiras micropropagadas. Javelle et al. (2011), afirma que a diferença entre as dimensões das camadas epidérmicas está relacionada as condições ambientais que se encontram, onde a planta se adapta para sua sobrevivência. A espessura das células epidérmicas pode variar com relação ao aumento da luminosidade (DICKISON, 2000). O aumento na espessura da epiderme, da parede celular, e da cutícula da face adaxial, sob condições de alta luminosidade, pode desempenhar um importante papel na reflexão da luz solar para manutenção dos níveis ótimos de temperatura foliar e, conseqüentemente,

para efetivação dos processos fisiológicos (DICKISON, 2000). Em *A. sellowiana* o aumento da espessura das células epidérmicas e da cutícula no cultivo *ex vitro* devem auxiliar na redução da transmitância da radiação luminosa para o mesofilo, mantendo em níveis adequados para os processos fotossintéticos.

A espessura da lâmina foliar foi menor em folhas no cultivo *in vitro*, e maior em folhas no cultivo *ex vitro* (aclimatizadas) e *in vivo*. A espessura do mesofilo, do parênquima paliçádico e esponjoso foi menor no cultivo *in vitro* em relação aos demais cultivos (*ex vitro e in vivo*). Espaços intercelulares proeminentes são uma das características que podem ser encontradas no parênquima de plantas cultivadas *in vitro* (CAMPOSTRINI; OTONI, 1996). Ziv (1995) menciona em seus estudos sobre aclimatização de plantas *in vitro*, que estas características são encontradas em várias espécies.

Enquanto que no cultivo *ex vitro e in vivo* (figura 12B e 12C, respectivamente) os tecidos se demonstram mais compactados, a literatura faz referência a compactação do parênquima paliçádico devido aos efeitos da luminosidade, segundo Ogushi et al. (2003) o desenvolvimento do parênquima paliçádico, o alongamento destas células pode ajudar em sua capacidade fotossintética. Para *A. sellowiana* a maior compactação do parênquima paliçádico pode estar relacionada a luminosidade a que a planta estava exposta nestas condições de cultivo (*ex vitro e in vivo*). Espera-se que quanto mais a camada de parênquima paliçádico seja espessa, maior seja sua taxa fotossintética, sendo esse processo de suma importância para o desenvolvimento da planta (BOLHAR-VORDENKAMPF; DRAXLER, 1993; DOUSSEAU et al. 2008). Estudos sobre figo (CHIRINÉA, et al. 2012), café (BARRY-ETIENNE, et al. 2002), e *Acer* (HANBAN, et al. 2002), assim como neste estudo as espécies apresentaram camadas mais espessas de parênquima esponjoso na condição *ex vitro* em relação ao cultivo *in vitro*. Chirinéa et al., (2012) afirmam que esse aumento na espessura se deve ao aumento da irradiância nesta condição. Tanto a diferenciação dos tecidos, quanto a plasticidade da planta é muito importante, principalmente quando se refere aos tecidos do mesofilo, no processo de absorção de luz (DOUSSEAU, et al., 2008).

Na secção transversal da nervura principal (figura 13), é notável o aumento da espessura nos cultivos *ex vitro* (Figura 13B) *ein vivo* (Figura 13C). Dousseau et al., (2008) encontraram resultados semelhantes para a espécie de ipê-amarelo.

O perímetro da área do xilema diferiu em todos os tratamentos, sendo que no cultivo *in vitro* apresentou o menor perímetro e no cultivo *in vivo* o maior. Os fatores ambientais podem afetar diretamente as dimensões e até mesmo a disposição dos elementos vasculares, e essas mudanças estão diretamente relacionadas a algum estresse, como por exemplo quando levada do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* (ALVES; ANGYALOSSY-ALFONSO, 2000).

Elementos de vaso de xilema respondem a disponibilidade de água no ambiente, sendo que quanto menor a disponibilidade, menor a sua largura, no entanto maior a densidade de elementos de vaso (NEVES et al. 2019). Neste estudo com *A. sellowiana*, observa-se que no momento em que a planta passa do cultivo *in vitro*, que é um ambiente com umidade relativa saturada e passa para a condição *ex vitro* ocorre um aumento no perímetro da área de xilema. Sack et al. (2015) ressaltam que a folha precisa de um sistema hidráulico eficiente, possibilitando que os estômatos se abram para a assimilação de CO₂ sem que haja o ressecamento do mesófilo. Noblin et al, 2008 por sua vez ressaltam ainda que o aumento da quantidade de vasos de xilema, contribuem para o aumento da capacidade de assimilação e transpiração da planta, podendo ajudar na produtividade da planta.

4.3 ÍNDICE DE PLASTICIDADE FENOTÍPICA

A análise para o índice de plasticidade fenotípica (IP) em folhas de *A. sellowiana* (Tabela 5) indica que a densidade estomática e o perímetro do xilema apresentam maior índice (0,52), enquanto que o comprimento do poro estomático apresenta o menor índice (0,003). Dentre os valores relacionados aos estômatos, a densidade estomática e a largura do poro estomático apresentaram os maiores índices (0,52 e 0,16, respectivamente). Já em relação a espessura dos tecidos, o perímetro do xilema (0,52), mesófilo, parênquima paliádico e esponjoso, apresentaram os maiores índices, sendo os últimos três com valor de 0,48. A cutícula adaxial teve maior índice (0,22) em relação a cutícula abaxial (0,13).

Tabela 5. Índice de Plasticidade Fenotípica - IP de características morfométricas em folhas de *A. sellowiana* (O.Berg.) Burret desenvolvidas em cultivo *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*.

Parâmetros avaliados	IP
Perímetro do Xilema	0,52
Densidade Estomática	0,52
Mesofilo	0,48
Parênquima Paliçádico	0,48
Parênquima Esponjoso	0,48
Lâmina foliar	0,47
Epiderme Adaxial	0,40
Epiderme Abaxial	0,29
Cutícula adaxial	0,22
Largura do Poro Estomático	0,16
Cutícula abaxial	0,13
Largura do Estômato	0,06
Comprimento do Estômato	0,01
Comprimento do Poro Estomático	0,003

Resultados semelhantes foram apresentados por Bireahls e Fermino Junior (2020) em seus estudos sobre *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus benthamii*, para parâmetros como densidade estomática, parênquima paliçádico e esponjoso e lâmina foliar. Ribeiro et al. (2020) para espécie de *Ilex paraguariensis* também encontraram altos valores de IP para características relacionadas aos estômatos, incluindo a densidade. De acordo com Valladares et al. (2005) são considerados muito plásticos os parâmetros que apresentam IP superior a 0,6 e não plásticos os parâmetros próximos a 0. Neste contexto, em folhas de *A. sellowiana* parâmetros como densidade estomática (0,52), perímetro do xilema (0,52), seguidos de mesofilo, parênquima paliçádico e esponjo com índice de 0,48 ambos, podem ser considerados tecidos plásticos, pois aproximam-se dos parâmetros estabelecidos por Valladares et al. (2005).

De modo geral, a espécie de *A. sellowiana* apresentou expressiva plasticidade fenotípica. Espécies com maior índice de plasticidade possuem maiores chances de sobreviver em ambientes diferentes, devido a sua capacidade de desenvolver adaptações morfológicas, fisiológicas e também bioquímicas (VALLADARES et al, 2006). Desta

forma a plasticidade fenotípica demonstra a capacidade de uma planta com mesmo genótipo de produzir diferentes fenótipos para que seja possível a sua sobrevivência em ambientes contrastantes (RIBEIRO et al, 2020).

5 CONCLUSÃO

Desta forma conclui-se que houve diferença entre o cultivo *in vitro* nos dois sistemas de tampa, sendo que o sistema de ventilação natural promoveu ajustes morfofisiológicos na planta fato que deve favorecer a transição do cultivo *in vitro* para o *ex vitro* (aclimatização).

As concentrações de clorofilas *a* em folhas no sistema de ventilação natural no cultivo *in vitro* indicam um ajuste fisiológico importante na retomada da atividade fotossintética para a transição *ex vitro* e autotrofia plena.

Na transição do cultivo *in vitro* para o *ex vitro* observou-se ajustes morfofisiológicos, ajustes esses que favorecem a funcionalidade, o aumento da captura de gás carbônico e o controle da perda de água.

O aumento das espessuras dos tecidos da lâmina foliar e da cutícula na transição do cultivo *in vitro* para o *ex vitro* indicam plasticidade para suportar os diferentes fatores abióticos.

A plasticidade na transição do cultivo *in vitro* para o *ex vitro*, indicam a importância nos ajustes morfofisiológicos fundamentando a sobrevivência de *A. sellowiana* no processo de micropropagação

REFERENCIAS

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

ALINIAEIFARD, S; MATAMOROS, P. M; MEETEREN, U. V. Stomatal malfunctioning under low VPD conditions: induced by alterations in stomatal morphology and leaf anatomy or in the ABA signaling?. **Physiologia Plantarum**, v. 152, n. 4, p. 688-699, 2014.

ALVES, E. S; ANGYALOSSY-ALFONSO, V. Ecological trends in the wood of some Brazilian species 1: growth rings and vessels. **IAWA Journal**, v. 21, p. 3-30, 2000.
 ANYIA, A. O; HERZOG H. Water-use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought. **European Journal of Agronomy**, v. 20, p.327-339, 2004.

BATISTA, D. S. **Influência de trocas gasosas, do etileno e de poliaminas na morfogênese *in vitro* da pimenteira ornamental (*Capsicum annum L.*)**. 2012. 63 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia vegetal. Universidade Federal de Viçosa. 2012.

BARRY-ETIENNE, D; BERTAND, B; VASQUEZ, N; ETIENNE, H. Comparison of Somatic Embryogenesis-derived Coffee (*Coffea arabica L.*) Plantlets Regenerated in vitro or ex vitro: Morphological, Mineral and Water Characteristics. **Annals of Botany**, v.90, p.77-85, 2002.

BETAGIN-PIOTTO, K. D; ALMEIDA, C. V; PIOTTO, F. A; ALMEIDA, M. Anatomical analysis of peach palm (*Bactris gasipaes*) leaves cultivated in vitro, ex vitro and *in vivo*. **Brazilian Journal of Botany**, v. 35, n. 1, p. 71-78, 2012.

BIREAHL, A; FERMINO-JUNOR, P. C. P. Plasticidade fenotípica em folhas de *Eucalyptus dunni* Maiden e *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Instituto Florestal**, v. 32, n. 2, p. 143-157, 2020.

BOLHAR-VORDENKAMPF, H. R.; DRAXLER, G. **Funcional leaf anatomy photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993.

BRAGA, F. T; PASQUAL, M; CASTRO, E. M; DIGNART, S. L. **Anatomia de *Dendranthema grandiflora* TZVELEV cv. Rage micropropagada sob diferentes condições de luz e sistemas de vedação**. In: Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 16.; Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 3.; Simpósio de Plantas Ornamentais Nativas, 1., 2007, Goiânia. Biodiversidade e competitividade: buscando novas opções. Campinas: Sociedade Brasileira de Floricultura e Plantas Ornamentais, p. 362-366, 2007.

- BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; DE CASTRO, E. M.; et al. Luz natural e sistemas propagação in vitro de Crisântemo cv. Rage: alterações anatômicas e fisiológicas. **Plant Cell Cult. Micropropag.** v. 6, n. 2, p. 83–89, 2010.
- CALLAWAY, R. M; PENNINGS, S.C; RICHARDS, C. L. Phenotypic plasticity and interactions among plants. **Ecology**, v.84, n.5, p. 115-1128, 2003.
- CAMPOSTRINI, E; OTONI, W. C. Aclimatização de plantas: abordagens recentes. **ABCTP Notícias**, v. 25, p. 1-5, 1996.
- CASANOVA, E; MOYSSET, L; TRILLAS, M.I. Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. **Biologia Plantarum**. v.52, p. 1-8. 2008.
- CHIN, A. R. O; SILLETT, S. C. Phenotypic plasticity of leaves enhances water-stress tolerance and promotes hydraulic conductivity in a tall conifer. **American Journal of Botany**, v. 103, n.5, p. 796 -807, 2016.
- CHIRINÉA, C. F; PASQUAL, M; ARAUJO, A. G; PEREIRA, A. R; CASTRO, E. M. Acclimatization and leaf anatomy of micropropagated fig plantlets. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 4, p. 1180-1188, 2012.
- CIOTTA, M. N; ARIOLI, C. J; PINTO, F. A. M. F; DOS SANTOS, K. L; ARAUJO, L; PASA, M. S. Introdução. In: CIOTTA, M. N; ARIOLI, C. J; PINTO, F. A. M. F; DOS SANTOS, K. L; ARAUJO, L; PASA, M. S. **A cultura da goiabeira serrana**. Florianópolis: Epagri, 2018. p 27-28.
- COSTA, F. H. S; CASTRO, E. M; PASQUAL, M; PEREIRA, J. E. S; OLIVEIRA, C. Alterações anatômicas de bananeiras micropropagadas em resposta a aclimatização ex vitro. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 386-392, 2009.
- CRUZ, J. G. **Qualidade de luz na micropropagação de mirtilheiro 'woodard'**. 2017. 65 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Universidade Federal de Pelotas, 2017.
- DECETTI, S. F.C; SOARES, A. M.; PAIVA, R; CASTRO, E. M. Effect of the culture environment on stomatal features, epidermal cells and water loss of micropropagated *Annona glabra* L. plants. **Scientia Horticulturae**. v. 117, ed. 4, p. 341- 344, 2008.
- DOS SANTOS, K.L; SIMINSKI, A; DUCROQUET, J. P. H. J; GUERRA, M. P; PERONI, N; NODARI, R. O. *Acca sellowiana*. In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Plantas para o Futuro - Região Sul**. Brasília, p 111- 129, 2011.
- DOS SANTOS, H. A. A. **Dinâmica populacional de moscas-das-frutas associadas a Feijoa (*Acca sellowiana* (o. Berg) Burret) em diferentes habitats e sua implicação no manejo de pragas**. 2014. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2014.
- DOS SANTOS, K. L. **Diversidade cultura, genética e fenotípica da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*): implicações para a domesticação da espécie**. 2009, 193f.

Tese (Doutorado em Ciência área de concentração: Recursos genéticos vegetais) - Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos vegetais, Centro e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis -SC.

DOUSSEAU, S; et al. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas in vitro, in vivo e durante a aclimatização. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, 2008.

DUCROQUET, J. P. H. J; RIBEIRO, P. A Goiabeira-serrana: velha conhecida, nova alternativa. **Agropecuária Catarinense**, v.3, n.4, p. 27-29, 1991.

DUCROQUET, J.P.H.J.; HICKEL, E.R.; NODARI, R.O. Goiabeira-serrana (Feijoa sellowiana). **Série Frutas nativas 5**. Jaboticabal: Funep, 66 p, 2000.
FACHINELLO, J. C; NACHTIGAL, J. C. Propagação da goiabeira serrana *Feijoa sellowiana* Berg, através de mergulhia de cepa. **Scientia Agricola**, v.49, p 37-39, 1992.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; NAGAO, E. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Estabelecimento, germinação e multiplicação in vitro de teca (*Tectona grandis* L. f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis**, v. 37, p. 427-435, 2009.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Características anatômicas de folhas de Teca (*Tectona grandis* L.) desenvolvidas sob condições de cultivo in vitro e ex vitro. **Evidência**, Joaçaba, v. 9, n. 1-2, p. 17-28, 2009.

FINATTO, T.; SANTOS, K. L.; STEINER, N.; BIZZOCCHI, L.; HOLDERBAUM, D. F.; DUCROQUET, J. P. H. J.; GUERRA, M. P.; NODARI, R.O. Late-acting selfincompatibility in *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v.59, n.1, p.53-60, 2011.

FURTADO, M. G. **Indução e controle da embriogênese somática em *Ocotea catharunensis* e *Ocotea odorifera* (Lauraceae)**. 2010, 66f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, USP/ Instituto Butantã /IPT. São Paulo, 2010.

GOMES, S. M; et al. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 224-238, 2009.

GOMES, J. P.; DE OLIVEIRA, L. M.; FERREIRA, P. I.; BATISTA, F. Substratos e temperaturas para teste de germinação em sementes de myrtaceae. **Ciencia Florestal**, v. 26, n. 1, p. 285-293, 2016.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogenese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.), **Cultura de tecidos e transformação genética em plantas**, v. 2, Brasília: EMBRAPA-SPI, p.533-568, 1999.

GUERRA, M. P; et al. **Apostila de Biotecnologia I**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2016. Disponível em: <<https://lfdgv.paginas.ufsc.br/files/2014/08/Apostila-Biotec-2016.1-Final.pdf>>. Acesso em: <07 Jun. 2021>.

HANBA, Y. T; KOGAMI, H; TERASHIMA, L. The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in Acer species differing in light demand. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.1021-1030, 2002.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in vitro culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 105- 120. 2006.

HOLFFMAN, A; FACHINELO, J. C; NACHTIGAL, J.C. Formas de propagação de plantas frutíferas. In: **Propagação de plantas frutíferas**. FACHINELO, J. C; NACHTIGAL, J. C. Brasília- DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, p. 45-56.

IVANOVA, M; VAN STADEN, J. A ventilação natural reduz com eficácia a hiperidricidade em culturas de rebentos de *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regul**, v. 60, p. 143-150, 2010.

JAVELLE, M; VERNOUD, V; ROGOWSKY, P. M; INGRAM, G. C. Epidemis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. **New Phytologist**, v. 189, n. 1, p. 17-39, 2011.

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

JOHNSON, T.; CRUSE-SANDERS, J. M.; PULLMAN, G. S. Micropropagation and seed cryopreservation of the critically endangered species Tennessee yellow-eye grass, *Xyris tennesseensis* Kral. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 48, n. 3, p. 369–376, 2012.

KAMI, C; LORRAIN, S; HORNITSCHKE, P; FANKHAUSER. Chapter two-light-regulated plant growth and development. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 91, p. 29-66, 2010.

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

LEGRAND, C. D; KLEINS, R. M. **Mirtáceas**. In: REITZ, R. (ed.). Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí- SC: Herbário Barbosa Rodrigues. 1977, p 624-629.

LIMA-BRITO, A.; ALBUQUERQUE, M. M. S.; RESENDE, S. V.; CARNEIRO, C. E.; SANTANA, J. R. F. Rustificação in vitro em diferentes ambientes e aclimatização de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. **Ciência Agronômica**, v. 47, p. 152–161, 2016.

MACIEL, S. A.; TEIXEIRA, R. B.; RAPOSO, A.; FERMINO JUNIOR, P. C. P. 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. **Revista Biotemas**, v. 27, n. 4, p. 11–19, 2014.

- MAJADA, J. P; TADEO, FAL, M. A; SÁNCHEZ-TMÉS, R; Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 207-214, 2000.
- MAJEROWICZ, N. Fotossíntese In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro, 2012. 114-178.
- MAYER, J. L. S; RIBAS, L. L. F; BONA, C; QUOIRIN, M. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium Hort.* (Orchidaceae) cultivadas ex vitro e in vitro. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 323-332, 2008.
- MILLS, D; YANQING, Z; BENZIONI, A. Improved of jojoba shoot multiplication in vitro by ventilation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 396-402, 2004.
- MORETTO, S. P; NODARI, E; NODARI, R. O. História da goiabeira serrana. In: CIOTTA, M. N; ARIOLI, C. J; PINTO, F. A. M. F; DOS SANTOS, K. L; ARAUJO, L; PASA, M. S. **A cultura da goiabeira serrana**. Florianópolis: Epagri, 2018. p 29-39.
- MOHAMED, MA-H; ALSADON, A. A; Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, v. 123, n.3, p.295-300, 2010.
- NEPOMUCENO, C. F. et al. Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, v.33, n.3, p.481-490, 2009.
- NOBLIN, X; MAHADEVAN, L; COOMARASWAMY, I. A.; WEITZ, D. A.; HOLBROOK, N. M.; ZWIENIECKI, M. A. Optimal vein density in artificial and real leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 27, p. 9140–9144, 2008.
- OGUCHI, R.; HIKOSAKA, K.; HIROSE, T. Does the photosynthetic light-acclimation need change in leaf anatomy? **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 505-512, 2003
- OLTRAMARI, A. C; DAL VESCO, L. L; PEDROTTI, E. L. Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 61–68, 2000.
- PASA, M.S; SOUZA, A. N; SCHIMITZ, J. D; BRIGHENTI, A. F; SILVA, C. P; CIOTTA, M. N; SOUZA, A. L. K. Propagação. In: CIOTTA, M. N; ARIOLI, C. J; PINTO, F. A. M. F; DOS SANTOS, K. L; ARAUJO, L; PASA, M. S. **A cultura da goiabeira serrana**. Florianópolis: Epagri, 2018. p 79-87.
- PAVEI, A. F; FRAGA, H. P. F; VIEIRA, L. N; GUERRA, M.P. Effects of glutathione supplementation and carbon source during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O.Berg) Burret (Myrtaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 40, e40257, 2018.

PEREIRA, A. S. S. **Micropropagação de *Acca Sellowiana* (Berg.): Otimização da indução de embriogênese somática e estabelecimento de novos genótipos**. Dissertação (Mestre em Biotecnologia vegetal e biodiversidade) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.

PINHEIRO, M. V. M; MARTINS, F. B; XAVIER, A; OTONI, W. C. Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L). **Revista Árvore**, v. 37, n. 1, p 19-29, 2013.

PRICE, C. A; WEITZ J. S. Zero-sum allocational strategies determine the allometry of specific leaf area. **American Journal of Botany**, v. 97, p. 1808-1815, 2010.

POSPÍSILOVÁ, J.; TÍCHA, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZAKOVA, S. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 42, n. 4, p. 481-497, 1999.

RIBEIRO, A. P. O. **Influência do genótipo, agentes geleificantes, precursor ACC) e inibidores (AVG e STS) do etileno e tipo de vedação na morfogênese *in vitro* de berinjela (*Solanum melongena* L.)**. 2006, 127 f. Tese (Doutor em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa, 2006.

RIBEIRO, L; TEN-CATEN, A; FERMINO-JUNIOR, P. C. P. Plasticidade fenotípica de caracteres morfofisiológicos e reflexão espectral de folhas de *Ilex paraguariensis* a. st.-hil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 17, n. 31, p. 170-185, 2020.

RODRIGUES, M; Et al. Leaf anatomy micromorphometry plasticity and histochemistry of *Azadirachta indica* during acclimatization. **Rodriguésia**, v. 71, p 1-10, 2020.

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

SACK, L.; SCOFFONI, C.; JOHNSON, D. M; BUCKLEY, T. N.; BRODRIBB, T. J. "The anatomical determinants of leaf hydraulic function", In: **Functional and Ecological Xylem Anatomy**, v. 208, p. 255-271, 2015.

SILVA, A. B; PASQUAL, M; CASTRO, E. M; RAMOS, D.; BRAGA, F. T.; ARAUJO, A. G. D. E. Natural light, sucrose and growth regulators on leaf anatomy and *in vitro* growth of micropropagated pineapple. **Plant Cell Cult. Micropropag.**, Lavras, v.8, n. 1-2, p. 1-9, 2012.

SILVA, A. B; CORREA, V. R. S; TOGORO, A. H; SILVA, J. A. S. Light effect and natural ventilation system on pineapple (bromeliaceae) micropropagated. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 380-386. 2014.

SILVA, J. P. G. DOS S.; COSTA, T. P. D.; COSTA, M. K. C.; et al. Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (bap) sobre o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Rosa* sp. **Agroecossistemas**, v. 9, n. 2, p. 370 – 380, 2017.

- SILVA, A. B.; LIMA, P. P.; OLIVEIRA, L. E. S.; MOREIRA, A. L. In vitro growth and leaf anatomy of *Cattleya Walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. **Revista Ceres**, v.61, n.6, p.883-890, 2014.
- SILVEIRA, A. A. C; et al. Shoot proliferation, leaf anatomy and pigment content of *Eugenia dysenterica* growing in conventional and natural ventilation systems. **Revista Ceres**, v. 66, n. 5, p. 363-371, 2019.
- SULTAN, S. E. Phenotypic plasticity in plants: a case study in ecological development. **Evolution & Development**, v. 5, n. 1, p. 25-33, 2003.
- SULTAN, S. E. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 12, p. 537-542, 2000.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ed, 722 f. Porto Alegre, Artmed. 2006.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. MAX; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento Vegetal Diversidade vegetal**. 2017.
- TAUTORUS, T. E; FOWKE, L. C; DUNSTAN, D. I. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 1873- 1899, 1991.
- VALLADARES, F.; et al. Shade tolerance photoinhibition sensivity and phenotypic plasticity of *Ilex aquifolium* in continental Mediterranean sites. **Tree Physiology**, v. 25, p.1041-1052, 2005.
- VALLADARES, F.; SANCHEZ-GOMEZ, D.; ZAVALA, M. A. Quantitative estimation of phenotypic plasticity: Bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. **Journal of Ecology**, v. 94, n. 6, p. 1103–1116, 2006.
- VIA, S. Adaptive Phenotypic Plasticity: Target or By-Product of Selection in a Variable Environment?. **The American Naturalist**, v. 142, n. 2, p. 352–365, 1993. Disponível em: <www.jstor.org/stable/2462820>. Acesso em: <30 Mar. 2021>.
- WERNER, E. T; MILANEZ, C. R. D; GONTIJO, A. B. P. L; SOARES, T. C. B; AMARAL, J. A. T. Leaf anatomy changes related to cultivate in vivo and in vitro and during pre-acclimatization of *Crambe abyssinica* Hochst. **Plant Cell Culture e Micropropagation**, v. 14, n. 1, p. 10-17, 2018.
- WREGE, M. S.; STEINMETZ, S.; REISSER JÚNIOR, C.; ALMEIDA, I. R. DE; EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Atlas climático da Região Sul do Brasil: Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul**. p. 333, 2017. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1045852>>. Acesso em: 20 jun 2019.
- YEATS, T. H; ROSE, J. K. C. The Formation and Function of Plant Cuticles. **Plant Physiology**, v. 163, p. 5-20, 2013.

ZIV M. 1995. *In vitro* acclimatization. In: AITKEN-CHRISTIE J., KOZAI T., SMITH MAL (eds) **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Disponível em: Springer, Dordrecht <https://doi.org/10.1007/978-94-015-8461-6_20>.

ZOBAYED, S. M. A; ARMSTRONG, J; ARMOSTRONG, W. Leaf anatomy of in vitro tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. **Plant Science**, v. 161, e. 3, p 537-548, 2001.