

## Características anatômicas de folhas de Teca (*Tectona grandis* L.) desenvolvidas sob condições de cultivo *in vitro* e *ex vitro*

FERMINO JUNIOR, Paulo Cesar Poeta\*; SCHERWINSKI-PEREIRA, Jonny Everson\*\*

### Resumo

O cultivo *in vitro* promove alterações anatômicas, morfológicas e fisiológicas nas plantas. O objetivo desse trabalho foi comparar as características estruturais de folhas de *Tectona grandis* L. no cultivo *in vitro* e *ex vitro*, compreendendo a variação estrutural que permite a aclimatização das plantas micropropagadas. Secções paradérmicas e transversais da lâmina foliar do cultivo *in vitro* e *ex vitro*, feitas à mão-livre, foram realizadas para a medição das estruturas anatômicas, em microscópio de luz. Os estômatos no cultivo *ex vitro* apresentaram dimensões menores, enquanto a espessura da cutícula, das células epidérmicas e do parênquima paliçádico foram maiores em folhas desenvolvidas *ex vitro*. Os resultados indicam plasticidade adaptativa de *T. grandis*, o que poderá permitir a aclimatização das plantas micropropagadas nas condições da Amazônia Sul-Occidental.

Palavras-chave: Cultura de tecidos. Variação estrutural. Teca.

### *Anatomical characteristics of leaves from Teak (*Tectona grandis* L.f.) developed under *in vitro* and *ex vitro* culture conditions*

#### *Abstract*

*The in vitro culture promotes changes anatomical, physiological and morphological in plants. The objective of this work was to compare the structural characteristics of leaves of Tectona grandis in in vitro culture and ex vitro. Paradermic and cross sections of the leaf blade from in vitro and ex vitro culture, hand made free, were made for the measurement of anatomical structures in the light microscope. The stomata in ex vitro culture showed smaller dimensions, while the thickness of the cuticle, the epidermal cells and parenchyma of the palisade were thicker leaves developed in ex vitro. The results indicate adaptive plasticity of T.grandis, which could allow the acclimatization of micropropagated plants under conditions of south-western Amazon.*

*Keywords: tissue culture; structural variation; teak.*

\* Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas; Professor adjunto I da Universidade Federal do Acre, *Campus* Universitário, Rodovia BR-364, 69915-900, Rio Branco; poetabio@hotmail.com

\*\* Pós-doutor em Biotecnologia pelo Scottish Crop Research Institute (SCRI), Escócia; Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas; Pesquisador A da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, DF; jonny@cenargen.embrapa.br

## 1 INTRODUÇÃO

As técnicas de cultura *in vitro* inicialmente concentravam-se em espécies de interesse agrícola, mas gradualmente tem sido aplicadas em espécies arbóreas florestais (PENCKE, 1999; XAVIER et al., 2007). Os estudos de micropropagação de teca (*Tectona grandis* L.) no Brasil ainda são incipientes; o primeiro trabalho publicado nacionalmente utilizou genótipo estabelecido no Estado do Acre (FERMINO JR. et al., 2009). Os plantios de teca no Brasil iniciaram no final da década de 1960, implantados pela empresa Cáceres Florestal S.A., na região do Município de Cáceres (MT), e desde o princípio do cultivo, existia a necessidade de obtenção de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária. Pouco se conhece sobre a anatomia de *T. grandis*, existindo apenas descrições generalizadas em MetCalfe e Chalk (1957); nada é conhecido sobre a anatomia das plantas cultivadas *in vitro*.

Para tanto, a anatomia vegetal tem sido uma ferramenta de valiosa importância no sucesso das técnicas de micropropagação, uma vez que o emprego destas depende das estruturas escolhidas e da competência dos tecidos vegetais (SILVA; ALQUINI; CAVALLET, 2005). Diversos estudos têm caracterizado histologicamente os processos de morfogênese *in vitro* (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; VIEIRA; DORNELAS, 1999; RODRIGUES et al., 2004), e segundo Lombardi et al. (2007), para o completo uso da ferramenta de micropropagação, faz-se necessário a compreensão dos aspectos histológicos e morfológicos.

O cultivo *in vitro* promove alterações anatômicas, morfológicas e fisiológicas nas plantas (CALVETE et al., 2002). As plântulas ou brotos desenvolvidos *in vitro* estão expostos a um microambiente único, organizado para gerar estresse mínimo, mas com ótimas condições para multiplicação (HAZARIKA, 2006). O modo heterotrófico de nutrição e a falta de mecanismos de controle de perda de água dessas plantas, as tornam vulneráveis ao choque no transplante para a casa de vegetação/ campo (*ex vitro*), ou seja, a aclimatização (LAMHANEDI; CHAMBERLAND; TREMBLAY, 2003).

A aclimatização pode comprometer o processo de micropropagação por envolver a neoformação do sistema radicular e a passagem para condições *ex vitro* (ZIV, 1995; BANDEIRA et al., 2007). Quando transferidas para as condições *ex vitro*, as mudas geralmente apresentam altas taxas de transpiração, em função da alta condutividade hidráulica de suas folhas (BRAINERD; FUCHIGAMI, 1981; BANDEIRA et al., 2007), o que na maioria das situações, provoca um elevado déficit hídrico, podendo causar a morte das mudas (DÍAZ-PEREZ, SUTTER; SHACKEL, 1995). Segundo Campostrini e Otoni (1996), os brotos regenerados *in vitro* não estão adaptados ao novo ambiente, pois não possuem mecanismos de proteção contra a desidratação, já que seus estômatos geralmente se encontram abertos (SCHACKEL; NOVELLO; SUTTER, 1990).

O objetivo desse trabalho foi comparar as características morfométricas anatômicas de folhas de *Tectona grandis* L. desenvolvidas *in vitro* e *ex vitro* (casa de vegetação), no intuito de compreender a variação estrutural que permite a aclimatização das plantas micropropagadas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e análises foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre. Sementes de *Tectona grandis* L. foram coletadas de matrizes na área de plantio florestal da Embrapa Acre. Após a germinação *in vitro* e *ex vitro* (casa de vegetação), folhas do segundo nó foram retiradas para os estudos anatômicos.

Para o cultivo *in vitro*, as sementes foram desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 30 minutos, seguida de três lavagens em água destilada autoclavada, e inoculadas em frascos de vidro contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, e 6 g.L<sup>-1</sup> de agar. As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura controlada de 23±2°C, dispendo de lâmpadas fluorescentes Philips TDL (30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), expostas ao fotoperíodo de 16 horas. Para o cultivo *ex vitro*, as sementes foram inoculadas em vasos contendo o substrato comercial Plantmax® em casa de vegetação da Embrapa Acre. A coleta de folhas nas condições *in vitro* e *ex vitro* foram realizadas após 2 meses de germinação das sementes.

Para os estudos anatômicos, foram utilizados o terço médio das regiões intercostais de folhas fixadas em FAA 70 (KRAUS; ARDUIN, 1997) e conservadas em etanol 70%. Para as medições das estruturas anatômicas foram preparadas lâminas temporárias por meio de secções paradérmicas e transversais à mão-livre, com auxílio de lâmina de barbear. Para detecção da presença de cutícula foi utilizado Sudan III (KRAUS; ARDUIN, 1997). As imagens das lâminas foram projetadas, com auxílio de câmara clara acoplada ao microscópio de luz (Olympus CH30), sobre o papel e aferida com escala micrométrica. Para os registros fotográficos foram preparadas lâminas permanentes. Segmentos de folhas foram fixados em glutaraldeído 2,5% com tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,2. Posteriormente, o material foi desidratado em série etílica, e incluído em parafina. Os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo Leica RM2125 RT com espessura de 10 μm, e corados com safranina e *fast green* (JOHANSEN, 1940).

Foram utilizadas seis repetições (campos de visualização) para cada um dos cinco indivíduos amostrados, totalizando 30 campos por condição de cultivo. As médias foram comparadas pelo teste “t-student”, com p<0,05 (SOKAL; ROHLF, 1995).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

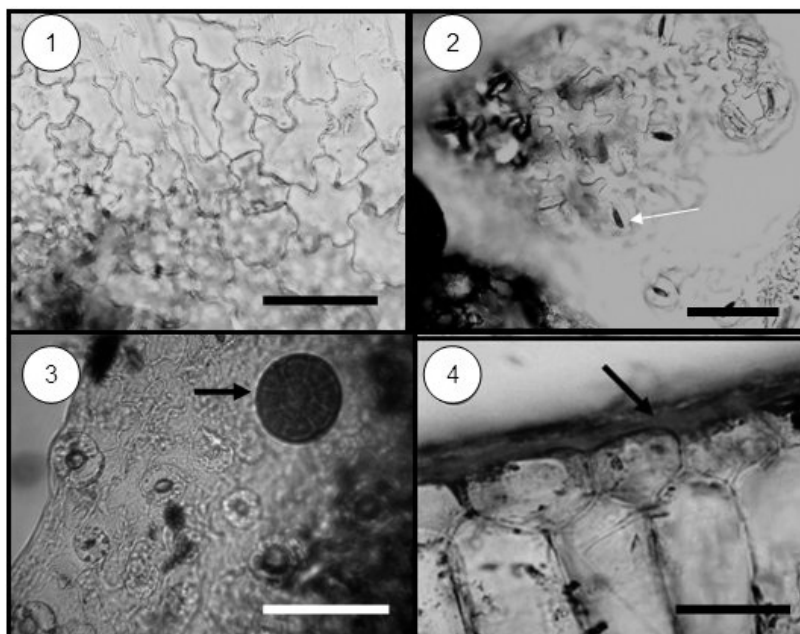
Em folhas de *Tectona grandis*, a epiderme é uniestratificada e aclorofilada, em ambas as faces. As paredes celulares anticliniais das células epidérmicas da face adaxial e abaxial (Figuras 1, 2 e 3) são sinuosas, porém a maior sinuosidade é verificada nas células epidérmicas da face abaxial, tanto *in vitro* como *ex vitro*. De acordo com Napp-Zinn (1984), diversas pesquisas têm demonstrado a variação intraespecífica das características da epiderme, com tendência ao aumento de sinuosidade sob condições de menor irradiação solar. Vieira (1995), estudando as diferenças anatômicas em

folhas de *Bauhinia radiata* Vell., encontradas em diferentes condições de luminosidade, verificou que nas folhas de sombra, as paredes celulares anticlinais das células epidérmicas são sinuosas e nas folhas de sol são retas. Em *T. grandis*, considerando a diferença de luminosidade, menor no cultivo *in vitro* e maior no cultivo *ex vitro*, não se verificou variações na sinuosidade das paredes celulares anticlinais. Entretanto, comparando a epiderme na face abaxial com a adaxial, a maior luminosidade na face adaxial (irradiação direta) estimulou o desenvolvimento de paredes menos sinuosas, concordando com Napp-Zinn (1984).

As paredes celulares periclinais externas da epiderme de *T. grandis* são convexas (Figura 4). De acordo com Vogelmann et al. (1996), a epiderme é tipicamente transparente à luz visível e suas células são, com frequência, convexas. O mesmo autor explica que as células epidérmicas convexas podem atuar como lentes e concentrar a luz, de modo que a quantidade que atinge alguns dos cloroplastos podem ser, muitas vezes, maiores do que a quantidade de luz do ambiente.

Na face abaxial das folhas ocorrem tricomas pluricelulares glandulares (Figura 3), os quais ficam abaixo do nível das demais células epidérmicas (Figura 5), e tricomas tectores unicelulares, filiformes, e alongados. Na face adaxial não existem tricomas (Figura 1). Na descrição da família Verbenaceae, Metcalfe e Chalk (1979) citam a ocorrência de tricomas de morfologia variada comuns na família. O mesmo autor descreve ainda a existência de tricomas glandulares peltados no gênero *Tectona*.

Figuras 1-4 – *Tectona grandis* L. - Epiderme foliar. 1. Vista frontal da superfície adaxial de folha cultivada *ex vitro*. 2. Vista frontal da superfície abaxial de folha *ex vitro*, com estômatos anomocíticos (seta). 3. Vista frontal da superfície abaxial de folha *in vitro*, com tricoma glandular (seta). 4. Secção transversal de folha evidenciando as células epidérmicas e cutícula (seta). Barras = 10  $\mu$ m.



A espessura da cutícula de *T. grandis* na face adaxial (Figura 3), exposta diretamente à radiação luminosa, apresentou valores distintos considerando o cultivo *in vitro* e *ex vitro* (Tabela 1). Nas folhas do cultivo *in vitro*, o desenvolvimento da cutícula foi bastante reduzido, quando comparado as folhas do cultivo *ex vitro*. De acordo com Lamhanedi, Chamberland; Tremblay (2003), as condições de luminosidade e umidade do ar no cultivo *in vitro* são extremamente diferentes do cultivo *ex vitro*, sendo que no cultivo *ex vitro* a luminosidade é superior, e a umidade do ar varia de acordo com a sazonalidade.

Tabela 1 – Espessura da cutícula e da epiderme de folhas de plantas desenvolvidas *in vitro* e *ex vitro* de Teca (*Tectona grandis* L.) na Amazônia Sul-Occidental

	Cutícula da face adaxial ( $\mu\text{m}$ )	Epiderme da face adaxial ( $\mu\text{m}$ )	Epiderme da face abaxial ( $\mu\text{m}$ )
<i>Cultivo in vitro</i>	1,0 $\pm$ 0,3 a	11,7 $\pm$ 1,2 a	4,0 $\pm$ 0,8 a
<i>Cultivo ex vitro</i>	2,7 $\pm$ 0,4 b	12,8 $\pm$ 1,7 a	5,4 $\pm$ 0,3 b

Nota: Letras iguais na coluna vertical não indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste “t-student” (ao nível de 5% de significância).

O aspecto fisiológico adaptativo do espessamento da cutícula relaciona-se à redução da perda de água, principalmente, nas folhas expostas diretamente à radiação solar (REED; TUKEY, 1981). De acordo com Hazarika (2006), plântulas ou brotos desenvolvidos *in vitro* estão expostos a um microambiente único, organizado para gerar estresse mínimo, mas com ótimas condições para a multiplicação. 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 (LAMHANEDI; CHAMBERLAND; TREMBLAY, 2003). Os resultados comparados entre folhas desenvolvidas *in vitro* e *ex vitro* evidenciam a capacidade de *T. grandis* desenvolver mecanismos de controle da perda de água, sobrevivendo na etapa de aclimatização, nas condições da Amazônia Sul-Occidental.

Os resultados obtidos para a espessura da epiderme na face adaxial não evidenciou diferenças (Tabela 1). A espessura da epiderme pode variar em relação à intensidade luminosa (RAVEN et al., 2000). O aumento na espessura da epiderme, da parede celular, e da cutícula da face adaxial, sob condições de alta luminosidade, podem 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). No cultivo *ex vitro* a luminosidade é superior ao cultivo *in vitro* (HAZARIKA, 2006). Em *T. grandis* tanto no cultivo *in vitro* quanto *ex vitro*, a epiderme na face adaxial não modificou a sua espessura, sugerindo que, mesmo existindo grande variação entre as duas condições de cultivo, a espécie possui outros mecanismos eficientes para a proteção contra a radiação luminosa e perda excessiva de água, experimentada pelas plantas que vivem na Amazônia Sul-Occidental.

Na face abaxial, a espessura da epiderme apresentou diferenças entre o cultivo *in vitro* e *ex vitro*, sendo a epiderme mais espessa nas folhas cultivadas *ex vitro* (Tabela 1). DeLucia et al. (1996), comentam sobre a contribuição das células epidérmicas da face abaxial na reflexão interna de luz

no mesofilo, aumentando a absorção luminosa, em que células mais espessas aumentariam a reflexão interna. Em *T. grandis*, o menor espessamento da epiderme na face abaxial de plantas cultivadas *in vitro* pode estar relacionado à redução no desenvolvimento das estruturas anatômicas, típicas do cultivo *in vitro*, o qual possui condições pouco estressantes para as plantas (HAZARIKA, 2006).

Os estômatos de folhas de *T. grandis*, tanto nas condições de cultivo *in vitro* e *ex vitro*, apresentam-se no mesmo nível das células epidérmicas adjacentes e estão restritos à face abaxial, caracterizando essas folhas como hipoestomáticas. Alguns autores como Mauseth (1988) e Peat e Fitter (1994), relatam que a hipoestomatia nas espécies arbóreas ocorre com maior frequência. Considerando o aspecto fisiológico, Dickison (2000) salienta que o posicionamento dos estômatos na superfície abaxial das folhas é um fator relevante para a redução das taxas de transpiração. Provavelmente, o posicionamento dos estômatos na face abaxial, da espécie em estudo, favorece a adaptação em ambientes tropicais, com elevada irradiância solar.

Os estômatos de *T. grandis*, não apresentam células subsidiárias ao redor das células-guarda, caracterizando-os como anomocítico (Figuras 2 e 3). Metcalfe e Chalk (1979) mencionam que os estômatos na família Verbenaceae são variáveis em sua distribuição e tipo, no entanto, esses autores não fazem referência à distribuição e ao tipo de estômato para o gênero *Tectona*.

Comparando a morfologia dos estômatos em folhas de *T. grandis* observa-se que àqueles desenvolvidos *in vitro* são mais arredondados do que os estômatos desenvolvidos *ex vitro*. Tais resultados concordam com os trabalhos de Pospíšilová et al. (1999), os quais descrevem que os estômatos *in vitro* são malformados, e mais arredondados.

A densidade estomática das folhas cultivadas *in vitro* e *ex vitro* não apresentaram diferenças (Tabela 2). Entretanto, as dimensões dos estômatos apresentaram diferenças.

Tabela 2 – Densidade e dimensões dos estômatos de folhas de plantas desenvolvidas *in vitro* e *ex vitro* de Teca (*Tectona grandis* L.) na Amazônia Sul-Occidental

	Densidade estomática (est./mm <sup>2</sup> )	Comprimento das células-guarda (μm)	Largura das células-guarda (μm)	Comprimento do ostíolo (μm)	Largura do ostíolo (μm)
<i>Cultivo in vitro</i>	527,3±66,8 a	15,3±1,3 a	5,3±0,3 a	7,1±0,3 a	5,3±0,3 a
<i>Cultivo ex vitro</i>	564,7±75,0 a	12,2±0,7 b	3,7±0,4 b	7,1±0,4 a	2,0±0,4 b

Nota: Letras iguais na coluna vertical não indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste “t-student” (ao nível de 5% de significância).

Os estômatos das plantas cultivadas *in vitro* estão relacionados significativamente com a capacidade de fotossíntese e o processo de aclimatização (IACONO; MARTINELLI, 1998). Pospíšilová et al. (1999) citam que os estômatos de plantas cultivadas *in vitro* são malformados, mais arredondados, reduzidos em número e não funcionais, tornando as plantas mais suscetíveis à desidratação na fase de aclimatização.

Na literatura existem alguns estudos que comparam as características dos estômatos de folhas *in vitro* e *ex vitro*. Estudando a anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi, Barboza et al.

(2006), verificam maior densidade estomática nas folhas da casa de vegetação, após o cultivo *in vitro*. Entretanto, em estudos de micropropagação de porta-enxerto de videira, Borghezani et al. (2003) verificaram que a densidade de estômatos *in vitro* é comparável aos observados em plantas *ex vitro*, indicando que esse parâmetro morfofisiológico não é limitante para a multiplicação e aclimatização de videira. Também, em estudos com folhas desenvolvidas *in vitro* e *ex vitro* de *Tabebuia avellanedae*, Fermino-Jr. et al. (2009), não verificaram diferenças na densidade estomática. Resultados semelhantes foram obtidos com *T. grandis*, indicando que apesar das diferenças existentes nas duas condições de cultivo, tais fatores abióticos não foram suficientes para alterar a densidade estomática, aliado ao fato de que esse parâmetro parece não ser limitante para a multiplicação e aclimatização desta espécie.

O comprimento e largura das células-guarda, bem como a largura do ostíolo foram maiores em folhas desenvolvidas *in vitro* (Tabela 2). Entretanto, o comprimento do ostíolo não sofreu alterações no cultivo *in vitro* e *ex vitro*. De acordo com Pospíšilová et al. (1999), os estômatos de plantas cultivadas *in vitro* não são funcionais, tornando as plantas mais suscetíveis à desidratação na fase de aclimatização. Em *T. grandis*, o aumento na dimensão dos estômatos das plantas cultivadas *in vitro* deve estar relacionado à falta de controle no mecanismo de abertura e fechamento estomático, pois quando as plantas desenvolvem-se *ex vitro*, os estômatos possuem dimensões menores, controlando a perda de água.

O mesofilo das folhas de *T. grandis* é composto por tecidos clorofilados: parênquima paliçádico e esponjoso (Figuras 5 e 6), sendo, portanto, dorsiventrals. O parênquima paliçádico está voltado para a face adaxial e é formado por um estrato de células colunares, tanto nas folhas do cultivo *in vitro* como *ex vitro*. Entretanto, nas folhas desenvolvidas *ex vitro* o parênquima paliçádico é mais compacto, com poucos espaços intercelulares. Na literatura, os estudos sobre parênquima paliçádico fazem referência ao efeito da luminosidade. Folhas de sol e de sombra, segundo Taiz e Zeiger (2004) apresentam variação na forma das células paliçádicas. O desenvolvimento do parênquima paliçádico em múltiplas camadas, ou com células longas, possibilita maior capacidade fotossintética (OGUCHI; HIKOSAKA; HIROSE, 2003). Segundo esses autores, isto ocorre porque aumenta a superfície da membrana plasmática, possibilitando a proximidade de maior número de cloroplastos. Nesse sentido, difusão de gás carbônico é maior, pois esta é mais rápida na fase gasosa do que na líquida (OGUCHI et al., 2003). Em *T. grandis* a maior compactação do parênquima paliçádico nas folhas no cultivo *ex vitro* deve estar relacionado com a maior luminosidade ocorrente nessa condição de cultivo.

A lâmina foliar de *T. grandis* apresentou desenvolvimento dos tecidos distinto nas condições de cultivo *in vitro* e *ex vitro* (Tabela 3). A espessura total da lâmina foliar, a espessura do mesofilo e do parênquima paliçádico nas folhas desenvolvidas *ex vitro* foram maiores do que as folhas no cultivo *in vitro*. O parênquima esponjoso apresentou a mesma espessura nas duas condições de cultivo. Entretanto, a relação entre o parênquima esponjoso e o mesofilo (PE/ME) demonstra que, proporcionalmente, o parênquima esponjoso ocupa maior volume em folhas de plantas cultivadas *in vitro* (0,67) do que em folhas de plantas *ex vitro* (0,47). Em *T. grandis*, as folhas possuem plasticidade estrutural, alterando a proporção dos parênquimas sob condições de maior ou menor luminosidade.

Essa propriedade é fundamental para permitir o sucesso na etapa de aclimatização da propagação clonal, pois segundo Hazarika (2006), as mudanças anatômicas que ocorrem na aclimatização são mais evidentes em folhas que se desenvolvem após o período de cultivo *in vitro*, ou seja, já na casa de vegetação (*ex vitro*), possibilitando a sobrevivência em campo.

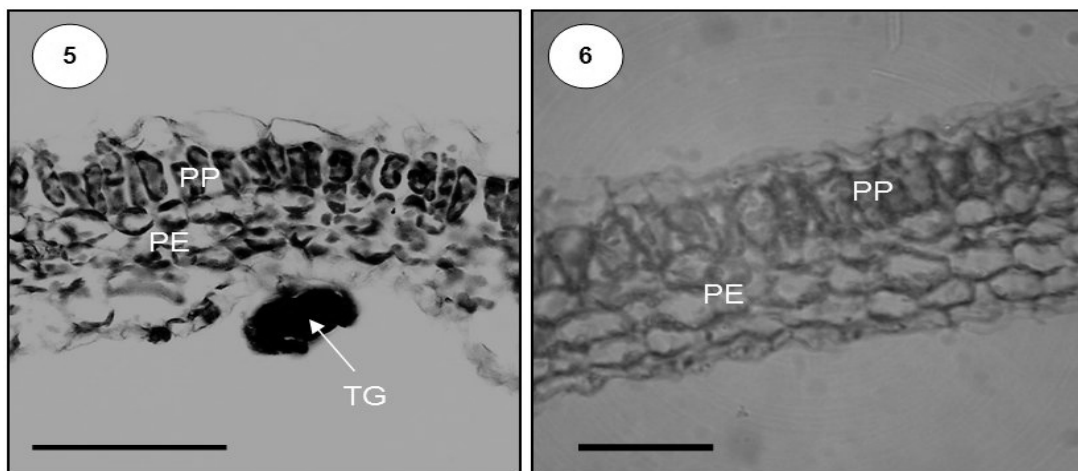
Tabela 3 – Espessura da lâmina foliar e tecidos clorofilados de folhas de plantas desenvolvidas *in vitro* e *ex vitro* de Teca (*Tectona grandis* L.) na Amazônia Sul-Occidental

	Lâmina foliar ( $\mu\text{m}$ )	Mesofilo ( $\mu\text{m}$ )	Parênquima paliçádico ( $\mu\text{m}$ )	Parênquima esponjoso ( $\mu\text{m}$ )	Relação PE/ME
<i>Cultivo in vitro</i>	63,2 $\pm$ 1,8 a	47,0 $\pm$ 1,2 a	12,4 $\pm$ 0,7 a	31,7 $\pm$ 0,8 a	0,67
<i>Cultivo ex vitro</i>	80,6 $\pm$ 2,1 b	66,4 $\pm$ 1,6 b	21,0 $\pm$ 1,0 b	31,3 $\pm$ 1,2 a	0,47

Nota: Letras iguais na coluna vertical não indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste “t-student” (ao nível de 5% de significância).

O parênquima paliçádico apresenta-se reduzido no cultivo *in vitro* e desenvolvido em folhas cultivadas *ex vitro* (HAZARIKA, 2006). No cultivo *in vitro*, a intensidade luminosa é muito inferior quando comparada com a intensidade luminosa da casa de vegetação. Assim, as mudas transplantadas experimentam maior intensidade luminosa, e, conseqüentemente, maior atividade fotossintética. Nesse sentido, mudanças estruturais na lâmina foliar podem ser verificadas como resposta às condições ambientais novas. Para Terashima e Hikosaka (1995), a anatomia foliar é altamente especializada para a absorção de luz. Segundo Vogelmann e Martin (1993), a forma colunar das células do parênquima paliçádico facilita a penetração de luz no parênquima esponjoso. As células em paliçada atuam como guias de luz, transmitindo-a mediante os vacúolos tubiformes e dos espaços de ar intercelulares (TERASHIMA; INOVE, 1984).

Figuras 5-6 – *Tectona grandis* L. - Secção transversal da lâmina foliar. 5. Folhas desenvolvidas *in vitro*. 6. Folhas desenvolvidas *ex vitro*. Barras= 50  $\mu\text{m}$ . Legenda: PP= parênquima paliçádico; PE= parênquima esponjoso; TG= tricoma glandular





O parênquima esponjoso de folhas desenvolvidas *in vitro* apresenta espaços intercelulares mais desenvolvidos quando comparados com folhas *ex vitro* (HAZARIKA, 2006). De acordo com Lee et al. (1997), folhas desenvolvidas em ambientes com menor luminosidade são mais delgadas, com um número reduzido de camadas paliçádicas e, proporcionalmente, com mais parênquima esponjoso. Resultados semelhantes foram observados nas folhas de *T. grandis* quando submetidas ao cultivo *in vitro*. DeLucia et al. (1996) salientam que o significado funcional da maior proporção de parênquima esponjoso no mesofilo, em folhas com pouca luminosidade, ainda não está esclarecido. Porém, os autores referem que os feixes de luz que entram colimados no mesofilo tornam-se difusos, por múltiplas reflexões, nos numerosos espaços intercelulares. A maior proporção de espaços intercelulares e a forma arredondada das células do parênquima esponjoso de folhas em pouca luminosidade devem aumentar a dispersão dos raios luminosos e aumentar o comprimento de onda (DELUCIA et al., 1996), podendo ser capturados pelos pigmentos fotossintéticos que absorvem em comprimento de onda mais longos.

#### 4 CONCLUSÃO

A redução nas dimensões dos estômatos, o maior espessamento da cutícula e das células epidérmicas, e a maior espessura do parênquima paliçádico das folhas cultivadas *ex vitro* indicam plasticidade adaptativa de *T. grandis*, o que poderá permitir a aclimatização das plantas micropropagadas nas condições da Amazônia Sul-Occidental.

#### REFERÊNCIAS

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 11, p. 2007-2013, 1999.

BANDEIRA, F. S. et al. Aclimatização *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis*. **Revista Árvore**, v. 35, n. 1, p. 773-781, 2007.

BARBOZA, S. B. S. C. et al. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 185-194, 2006.

BORGHEZAN, M. et al. Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 783-789, 2003.

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

CALVETE, E. O. et al. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas in vitro e ex vitro. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 649-653, 2002.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. Aclimatização de mudas: abordagens recentes, **ABCTP Notícias**, CNPH/EMBRAPA, Brasília, DF, n. 25, 1996.

CUTTER, E. G. **Anatomia Vegetal, parte I: Células e Tecidos**. São Paulo: Roca, 1986.

DELUCIA, E. H. et al. Contribution of intercellular reflectance to photosynthesis in shade leaves. **Plant, Cell and Environment**, n. 19, p. 159-170, 1996.

DÍAZ-PEREZ, J. C.; SUTTER, E. G.; SHACKEL, K. A. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, v. 95, n. 2, p. 225-232, 1995.

DICKISON, W. C. **Integrative plant anatomy**. USA: Academic Press, 2000.

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

FERMINO-JR., P. C. et al. Estabelecimento, germinação e multiplicação in vitro de teca (*Tectona grandis* L.) a partir de genótipos estabelecidos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 84, p. 427-436, 2009.

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

HOLLOWAY, P. J. Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview. In: Cutler, D. F.; Alvin, K. L.; Price, C. E. (Eds.) **The Plant Cuticle**, London: Academic Press, Linnean Society Symposium Series. n. 10. p. 1-32, 1981.

IACONO, F.; MARTINELLI, L. CO<sub>2</sub> assimilation and transpiration balance in species of genus *Vitis* cultivated in vivo and in vitro: estimation of stomatal and cuticular transpiration in vitro. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 32, n. 2, p. 91-97, 1998.

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

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal**. Editora Universidade Rural, 1997.

LAMHANEDI, M.; CHAMBERLAND, H.; TREMBLAY, F. M. Epidermal transpiration, ultrastructural characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic seedlings in response to in vitro acclimatization. **Physiologia Plantarum**, v. 118, p. 554-561, 2003.

LEE, D.W. et al. Effects of irradiance and spectral quality on seedling development of two Southeast Asian *Hopea* species. **Oecologia**, v. 110, p. 1-9, 1997.

LOMBARDI, S. P. et al. In vitro shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* mast. **Brazilian Archives of biology and technology**, v. 50, n. 2, p. 239-247, 2007.

MAUSETH, J. D. **Plant anatomy**: The benjamin/cummings publishing company, Inc., 1988.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**, 2. ed. v. 1, Oxford: Clarendon Press, 1979.

MURASHIGE, T. E.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAPPAZINN, K. **Handbuch der pflanzenanatomie**. Anatomie des Blattes, 2. Blattanatomie der Angiospermen. Experimentelle und ökologische anatomie des angiospermenblattes. Germany: Gbdr. Borntraeger, 1984.

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.

PENCE, V. C. The Application of Biotechnology for the Conservation of Endangered Plants. In: **Plant Conservation Biotechnology**. London: Taylor & Francis, cap. 6, p. 83-95, 1999.

PEAT, H. J.; FITTER, A. H. A comparative study of the distribution and density of stomata in the British flora. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 52, p. 377-393, 1994.

POSPISILOVA, J. et al. Acclimatization of micropropagated plants in ex vitro conditions. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 481-497, 1999.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2007.

REED, D. W.; TUKEY, Jr. H. B. Permeability of brussels sprouts and carnation cuticles from leaves developed in different temperatures and light intensities. In: CUTTLER, D. F.; ALVIN, K. L.; PRICE, C. E. (Ed.). The plant cuticle. **Linnean Society Symposium Series**. London: Academic Press, . n. 10, p. 267-278, 1981.

RODRIGUES, L. R. et al. Anatomia vegetal aplicada aos estudos androgênicos in vitro. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 2, n. (3/4), p. 159-167, 2004.

SANTANA, J. R. F. et al. 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.

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

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasílica**, v. 19, n. 1, p. 183-194, 2005.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. São Francisco, Freeman and Company, 776 p. 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre, Artmed, 2004.

TERASHIMA I.; INOUE, Y. Palisade tissue chloroplasts and spongy tissue chloroplasts in spinach: biochemical and ultra-structural differences. **Plant and Cell Physiology**, v. 26, p. 63-75, 1984.

TSUKAMOTO FILHO, A. A. et al. Análise econômica de um plantio de teca submetido a desbastes. **Revista Árvore**, v. 27, n. 4, p. 487-494, 2003.

VOGELMANN T. C., MARTIN G. The functional significance of palisade tissue: penetration of directional versus diffuse light. **Plant, Cell and Environment**, v. 16, p. 65-72, 1993.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e Enxertia in vitro de espécies florestais. In: Borém, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: Editora UFV. p. 55-74, 2007.

ZIV, M. **In vitro acclimatization**. In: Automation and environmental control in plant tissue culture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 535 p. 1995.