

R 040  
Ed: 1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**CURSO DE AGRONOMIA**  
**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**

**COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DO PORTA-  
ENXERTO DE MACIEIRA M-9 (*Malus pumila*)**  
**"In vitro": Densidade Estomática e Área Foliar.**

Trabalho apresentado à Universidade  
Federal de Santa Catarina, para obtenção  
do Título de Engenheiro Agrônomo.



0.282.682-6

UFSC-BU

**ESTAGIÁRIO: CLAUDIO ASSIS VITOVSKI**  
**FLORIANÓPOLIS, SETEMBRO DE 1998.**

R 040  
Ex. 1

138914

## **IDENTIFICAÇÃO**

Nome do Estagiário:

**CLAUDIO ASSIS VITOVSKI**

Nº de Matrícula:

**9418607-3**

Período de Estágio:

**01/03 a 01/04/98**

Orientador na UFSC:

**Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva**

Local:

**Laboratório de Morfogênese Vegetal – CCA – UFSC.**

Supervisor:

**Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato**

## **APRESENTAÇÃO**

Nome do Estagiário: **CLAUDIO ASSIS VITOVSKI**

Nº de Matrícula: **9418607-3**

**Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, para  
obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo.**

**COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DO PORTA-ENXERTO DE  
MACIEIRA M-9 (*Malus pumila*) “In vitro”: Densidade Estomática e  
Área Foliar.**

**Presidente:**

---

Prof. Dr. APARECIDO LIMA DA SILVA

**Banca:** \_\_\_\_\_

Prof. Dr. ÊNIO LUIS PEDROTTI

**Banca:** \_\_\_\_\_

“Mestranda em Biotecnologia” LUCIR MARIA LOCATELLI

## **AGRADECIMENTO**

### **Agradeço:**

- Ao Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva, pela sua atenção durante e após o período de estágio e relatório final;
- Ao Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato, pela oportunidade disposta a minha pessoa de ingressar ao meio científico durante minha formação acadêmica;
- A Bióloga Lucir Maria Locatelli pelo acompanhamento e ensinamentos no meu ingresso à iniciação científica;
- Aos colegas do Curso de Agronomia, pelo companheirismo;
- Aos meus pais, Francisco de Assis Vitovski e Odete Sardá Vitovski, que além do carinho e amor a mim dedicados, possibilitaram a minha permanência durante os cinco anos do curso;
- A minha irmã, Helena pelo apoio, carinho e companheirismo;
- A Juliana Moreira de Negreiros, pelo afeto e carinho a minha pessoa dedicada e também pelo apoio e companheirismo não somente durante os momentos de minha formação acadêmica, mas durante todos os momentos que participa de minha vida.

## INDICE

<b>I-LISTA DE FIGURAS</b> .....	2
<b>II- LISTA DE TABELAS</b> .....	3
<b>III- LISTA DE FOTOS</b> .....	4
<b>1-INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	8
<b>3- METODOLOGIA</b> .....	14
3.1- Material Vegetal: .....	14
3.2- Densidade Estomática.....	14
3.3-Área Foliar .....	17
3.3.1- Método das Quadrículas.....	17
3.3.2- Determinação via “Análise de Imagens Computadorizada”.....	17
<b>4- RESULTADOS E DISCUSSÃO:</b> .....	18
4.1-Análise dos Estômatos .....	18
4.2 – Área Foliar.....	24
<b>5-CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	25
<b>6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	28
<b>7- ANEXOS</b> .....	31

## **I-LISTA DE FIGURAS**

**Figura 01** – Ilustração da epiderme foliar com localização intercelular do estômato.

**Figura 02** – Local de Aplicação da película de Esmalte para retirada da moldura da epiderme foliar.

**Figura 03** – Variação da densidade estomática nos 4 diferentes vidros avaliados. Média de 20 observações/ vidro.

## II- LISTA DE TABELAS

**Tabela 01-** Características estomáticas, densidade e funcionalidade do porta- enxerto M-9 . Avaliação aos 60 dias de cultura *in vitro*.

**Tabela 02-** Característica estomática, densidade do porta-enxerto M-9. Avaliação aos 60 dias de cultura *in vitro*.

**Tabela 03–** Tamanho e distribuição aproximados dos estômatos de folhas de *Malus pumila* (cv. Cox *ex vitro*) e M-9 *in vitro*.

**Tabela 04–** Tamanho e distribuição aproximados dos estômatos de folhas de diferentes espécies vegetais e *Malus pumila* (M-9) *in vitro*.

**Tabela 05–** Área foliar e distribuição dos estômatos em folhas de *Malus pumila* (M-9) *in vitro*, determinada em dois diferentes métodos de análise de área foliar.

### **III- LISTA DE FOTOS**

**FOTO.01** – Momento de retirada da moldura de esmalte da folha

**FOTO.02** – Retirada da película de esmalte da folha

**FOTO.03** – Montagem de lâmina para análise em microscópio

**FOTO.04** – Excicata Padrão para determinação de área foliar

**FOTO.05** – Método de determinação de área descrito por Bleasdade (1966).

**FOTO.06** – Estômato de Porta Enxerto M-9 *in vitro* aumento 1000x evidenciando a forma elíptica

**FOTO.07** – Estômato de Porta Enxerto M-9. *in vitro* distribuídos na face inferior da folha. Aumento 200x

**FOTO.08** – Face superior da folha de M-9. *in vitro*, evidenciando-se a ausência de estruturas estomáticas. Aumento 200x.

## 1-INTRODUÇÃO

A cultura da macieira (*Malus sp.*) tem como seu Centro de Origem, a região entre o Cáucaso e o leste da China. Segundo os autores Kutzelnigg & Silbereisen (1986) há relatos da cultura desde a antiguidade através de publicações que datam de 200 a.C como “De Agricultura” de Marcus P. Catto. No Brasil o início da cultura da macieira iniciou-se em 1926 no estado de São Paulo com a introdução da cultivar Ohio Beauty. Na região sul teve sua introdução em 1940 no município de Bom Jardim da Serra no estado de Santa Catarina e no Rio Grande do Sul em 1948 na região de Caxias do Sul. No entanto permanecem até os anos 70 restrita a pequenos pomares de produção não comercial.

A maçã sofreu uma das mais importantes transformações na história da fruticultura brasileira com a introdução do PROFIT (Projeto de Fruticultura de Clima Temperado) em Santa Catarina e no sul do Brasil, na década de 70, onde muitos agricultores foram incentivados a cultivar a macieira, começando a cultura de forma extensiva no entanto com baixa produtividade, permanecendo o Brasil ainda como importador. Nos últimos vinte anos o Brasil passou da posição de importador à condição de exportador, a partir da introdução de técnicas e avanços nas pesquisas, resultado da atividade de empresas e de produtores agrícolas que adotaram tecnologias avançadas. Estes empreendimentos técnicos e científicos promoveram a expansão da área plantada no estado de Santa Catarina, elevando de 3.150 ha em 1975 para 13.600 ha na década de 90, tornando-se o maior produtor com 60% da produção nacional seguida do Rio grande do Sul com 30%.

Contudo, a produção de mudas de macieiras não tem conseguido acompanhar os avanços tecnológicos incorporados a cultura. A produção de porta enxertos tradicionalmente realizada por mergulhia de cepa, imprime uma redução na capacidade de enraizamento das estacas, ficando predispostas a disseminação de doenças uma vez que as plantas são usadas anualmente. Este fato tem forçado os produtores realizarem a importação de grande quantidade de material, nem sempre adequados às condições edafo-climáticas da região produtora o que possibilita a instalação de doenças sistêmicas principalmente as viroses. Em pomares estabelecidos com plantas de alta qualidade genética e isentas de viroses, obtidas a partir de micropropagação, é possível atingir rendimentos 3 vezes superiores ao da média obtida com plantas oriundas de propagação convencional.

A biotecnologia vegetal oferece uma alternativa para a solução de problemas de multiplicação e estabelecimento de novas plantas. A micropropagação possibilita a produção de um grande número de plantas em um curto período de tempo e garante a obtenção de plantas livres de vírus e outros patógenos. No entanto, mesmo com os recentes avanços nas técnicas de micropropagação, o estabelecimento de protocolos regenerativos para plantas frutíferas lenhosas continuam restritos a um número limitado de espécies. Pela importância econômica a macieira é uma das espécies de grande valor para estudos nesta área.

É importante ressaltar que a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) conta com um grupo de pesquisadores na área de fruteiras, desenvolvendo projetos com o objetivo de elaborar tecnologias para a produção de mudas de plantas micropropagadas como macieira, abacaxizeiro e goiabeira serrana, produzidas nos Laboratórios de

Morfogênese Vegetal e Cultura de Tecidos no Centro de Ciências Agrárias, contando com o apoio financeiro do FINEP e CNPq.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais podem determinar a produção de indivíduos selecionados em grande escala, no entanto a passagem destes para as condições *ex vitro* pode comprometer o sistema, pois as plantas devem apresentar todos os seus órgãos funcionais e em perfeitas condições para garantir sua sobrevivência.

É neste contexto, que surgiu a motivação para realizar o estágio de conclusão nesta área, desenvolvendo um trabalho de determinação e avaliação fisiológica dos estômatos em microplantas de macieira, onde estes exercem papel importante na regulação hídrica da planta, necessário para a garantia da sobrevivência e estabelecimento no processo de aclimatização *ex vitro*.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para a macieira, ainda não existe um protocolo que repita com confiabilidade os padrões de expressão da morfogênese. Problemas com *Malus spp* podem relacionar-se com a presença de pelos epidérmicos que dificultam os processos de desinfestação e com possíveis variações somaclonais provocadas pelas sucessivas subculturas nos processos de micropropagação (Kouder *et alli*, 1984). Essa limitação pode ser superada ou reduzida com processo de organogênese direta, como verificado por Belaizi *et alli*, (1989) a partir de microestacas cultivadas *in vitro* e obtidas de plantas adultas. A indução e a proliferação de gemas múltiplas são dependentes de um balanço de reguladores de crescimento e do tipo de geleficante utilizado (Skoog & Miller, 1975; Yeo & Reed, 1995). Um problema limitante no controle da morfogênese *in vitro* da macieira relaciona-se com a dificuldade de se induzir a formação de raízes adventícias nos eixos caulinares. Segundo Ribas (1991) em alguns clones de porta enxertos, a formação de raízes só é conseguida após sucessivas repicagens de microestacas em meios de cultura.

A capacidade fotossintética de plantas *in vitro* é um fator importante na multiplicação e depende do patrimônio genético da espécie (Pospisilova *et alli*, 1977; Yue *et alli*, 1993). As concentrações de CO<sub>2</sub>, luminosidade, umidade relativa e presença de sacarose no meio de cultura exercem influências importantes na fotossíntese e no processo de aclimação (Desjardins, 1995; Fujiwara & Kozai, 1995). Com relação aos açúcares exógenos disponíveis no meio de cultura, as plantas podem utilizá-los quando a taxa de fotossíntese não permite assegurar um balanço positivo em carbono, definindo assim uma nutrição mixotrófica (Galzy, 1990; Galzy

& Compan, 1992). Portanto, a adição de sacarose ao meio de cultura pode determinar um papel importante no controle da atividade fotossintética.

Na multiplicação e aclimação os estômatos são essenciais e estão relacionados com certos fatores ambientais como luz, gás carbônico, temperatura e déficits de água. As plantas vasculares apresentam a epiderme das partes aéreas perfuradas por pequenos poros, denominados estômatos, pelos quais são realizadas as trocas gasosas (Sutcliffe,1980). A ocorrência em maior quantidade é observada nas folhas, mas pode ser encontrada também nos caules, flores e alguns frutos. Em angiospermas estão localizados principalmente na superfície inferior das folhas, sendo que na maioria das árvores e arbustos estão completamente ausentes nas faces superiores, condição esta denominada de hipostomia. Em plantas aquáticas como as ninfeáceas, os estômatos encontram-se somente na superfície superior das folhas flutuantes, sendo ausente ou rudimentares (epistomia) nas folhas submersas. Na maioria das plantas herbáceas os estômatos são possíveis de observar em ambas as faces das folhas. A formação dos estômatos se dá antes que as folhas completem a maior parte de sua expansão, sendo que o número de estômatos por folha não altera muito durante a expansão foliar, e praticamente este número não varia entre folhas jovens e adultas. Um estômato aparece inicialmente como uma fenda na lamela média, entre duas células guarda adjacentes, cada uma das quais formadas por divisão desigual de uma célula epidérmica (Figura-01).



Figura-01 – Ilustração da epiderme foliar com localização intercelular do estômato.

As células guarda, na maioria das dicotiledôneas e em algumas monocotiledôneas, como por exemplo *Allium cepa*, têm tipicamente a forma de duas salsichas unidas pelas extremidades, formando um poro elíptico entre elas. As células guardas possuem uma grande capacidade em mudar seu volume quando se tornam túrgidas, apresentando capacidade de até 50% ou mais devido ao elevado coeficiente de elasticidade das paredes.

O funcionamento dos estômatos de plantas *in vitro* não está ainda bem definido. Para diversos autores, como Blanke & Belcher, (1989); Pospisilova *et alli*, (1988); Sallanon *et alli*, (1993), os estômatos *in vitro* não são funcionais, permanecem constantemente abertos ou fechados e são insensíveis aos estímulos habituais de escuro, alta concentração de CO<sub>2</sub>, ABA e potencial hídrico (Majada *et alli*, 1995; Pospisilova *et alli*, 1997). Desta forma, a transpiração muito elevada e comportamento anormal das células guarda causam geralmente dificuldades durante o processo de aclimação. Entretanto, outros autores observaram que os estômatos

*in vitro* são funcionais e reagem aos estímulos exteriores ( Shackel *et alli*, 1990; Novello *et alli*, 1992; Sciutti & Morini, 1993).

Os estômatos das plantas *in vitro* são muito estudados, principalmente quando objetiva-se otimizar os protocolos de multiplicação e aclimatação das plantas micropropagadas. Os estômatos são freqüentemente grandes, com formas e estruturas anormais (Blanke & Belcher, 1989). A densidade estomática pode ser diferente ou igual em comparação as folhas *ex-vitro* e com alterações da distribuição sobre as duas faces foliares (Cappelades *et alli*, 1990; Sciutti & Morini, 1993; Lima-da-Silva, 1995).

A transferência de *in vitro*, um passo seguinte a micropropagação, a aclimatação *ex-vitro*, requer cuidados especiais pois quando estas plantas são colocadas em ambiente com baixa umidade relativa, o murchamento inicial pode ser resultado da transpiração de um grande número de órgãos da planta, especialmente nas folhas. Sutter (1988) verificou que apenas 13% dos estômatos fecharam em folhas de macieira imediatamente colocadas sobre estresse hídrico. O aumento da abertura dos estômatos de plantas sob estresse severo pode ser explicado pelo mecanismo hidropassivo em que o turgor das células epidérmicas decrescem mais rapidamente que as células guarda, resultando na abertura dos estômatos sob estresse (Perez *et alli*, 1995). Em plantas de plátano a ocorrência de estômatos é maior em condições *in vitro*, do que aquelas que foram aclimatizadas ou mesmo aquelas não micropropagadas (Sutter, 1988). Durante a aclimatação os estômatos das folhas de plátano se tornam elipsoides, menos superficiais e menos numerosos quando comparados com aqueles de cultura de tecidos (Hazel et al., 1983). Para Donnelly *et all*,

(1987), não apenas os estômatos, mas também os hidatódios contribuem para a perda de água em *Rubus sp* micropropagado.

O balanço hídrico não está relacionado diretamente a perda de água pelos estômatos, mas também pela habilidade da planta em captar água do meio. Segundo Ferraz (1977), a água é um dos fatores mais importantes na seleção de plantas. Geralmente as plantas escolhidas, possuem exigências em água que não são satisfeitas pelo clima local, podendo ocorrer problemas de estabilidade no momento da implantação. O fornecimento adequado de água para o desenvolvimento dos vegetais decorrem de múltiplas funções desempenhados pela sua fisiologia, pois praticamente todos os processos metabólicos são influenciados pelo conteúdo de água. Cerca de 80 a 90% do peso fresco de plantas herbáceas é constituído de água, e mais de 50% do peso fresco em plantas lenhosas. As quantidades disponíveis de água de acordo com a planta e seus tecidos, podem produzir danos que vão desde a paralisação do crescimento até a morte do vegetal. A água participa em inúmeras reações como reagente, onde a hidrólise dos açúcares e a própria fotossíntese são exemplos de reações essenciais para os metabolismos. A abertura ou fechamento dos estômatos, estão relacionados com a turgescência ou flacidez das células estomáticas. A quantidade de água perdida pelos vegetais é muito grande. Uma planta de cafeeiro adulto, perde cerca de 7.273 litros em um ano (Franco & Inforzato, 1970). A totalidade de água perdida pelas plantas se dá na forma gasosa por processos de transpiração, sendo as folhas as principais promotoras. É através dos estômatos que é realizado a maior parte da transpiração, constituindo a via de escape gasoso que oferece a

menor resistência à difusão, sendo responsável por cerca de 80 a 90% da perda total de vapor de água pela transpiração estomática.

O processo de aclimação é o momento mais problemáticos, devido as plantas produzidas no sistema *in vitro*, serem susceptíveis a excessiva perda de água após a remoção para um sistema *ex-vitro*, podendo vir a morrer ou ocorrer a deterioração de alguns tecidos de forma irreversível. Esta desidratação é possivelmente devido a falha dos estômatos, pois estes não fecham normalmente sob déficit hídrico induzido pelo regime de umidade mais baixo da casa de vegetação (Brainerd e Fuchigami, 1982).

Tem-se observado que porta-enxerto de macieira M-9 apresenta um índice de sobrevivência aquém do desejado. Portanto torna necessário avaliar a densidade e as características biométricas dos estômatos *in vitro* de microplantas de macieira M-9, definindo e visualizando seu comportamento dentro do sistema *in vitro* buscando correlacionar com o comportamento *ex-vitro*.

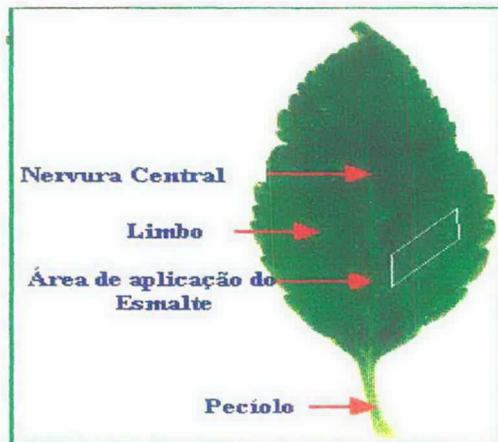
### 3- METODOLOGIA

#### 3.1- *Material Vegetal:*

O material vegetal utilizado é proveniente da proliferação de gemas *in vitro* do Laboratório de Morfogênese Vegetal do Centro de Ciências Agrárias – UFSC. O material de macieira M-9 foi multiplicado *in vitro* utilizando a metodologia de microestacas de gemas axilares com ausência de folhas. Os explantes foram inoculados em frascos de vidro contendo 40 ml de meio de cultura (Murashige e Skoog, 1962) com adição de complexo vitamínico (Morel e Wetmore, 1951) com 30g/l de sacarose e 5,6 g/l de agar. O fotoperíodo durante o desenvolvimento foi de 16/8 h, a luminosidade incidente foi de  $50 \mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e a temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Os frascos de vidro utilizados com as culturas foram fechados com tampas transparentes, não hermeticamente, permitindo assim trocas gasosas com a atmosfera exterior.

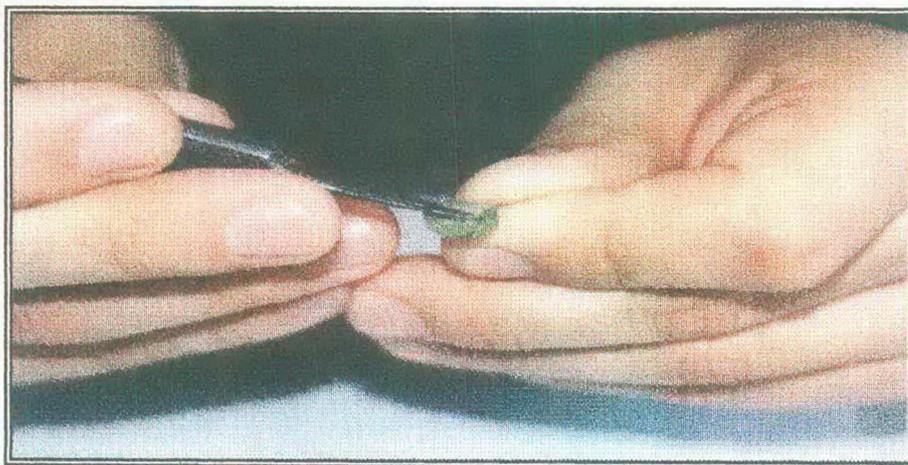
#### 3.2- *Densidade Estomática*

O número de estômatos por  $\text{mm}^2$  de superfície foliar foi determinado segundo a metodologia de retirada da epiderme da face inferior da folha descrita por Lima-da Silva & Doazan (1995). Para a retirada do molde da epiderme utilizaram-se plantas de 60 dias em cultura *in vitro*, analisando-se a quinta folha aberta a partir do ápice. A retirada da epiderme é realizada com o uso de esmalte para unhas (Base nitrocelulose, Acetato Etila/Butila, Tolueno, Tolueno sulfonamida, DBP, Cânfora e Benzofenona).

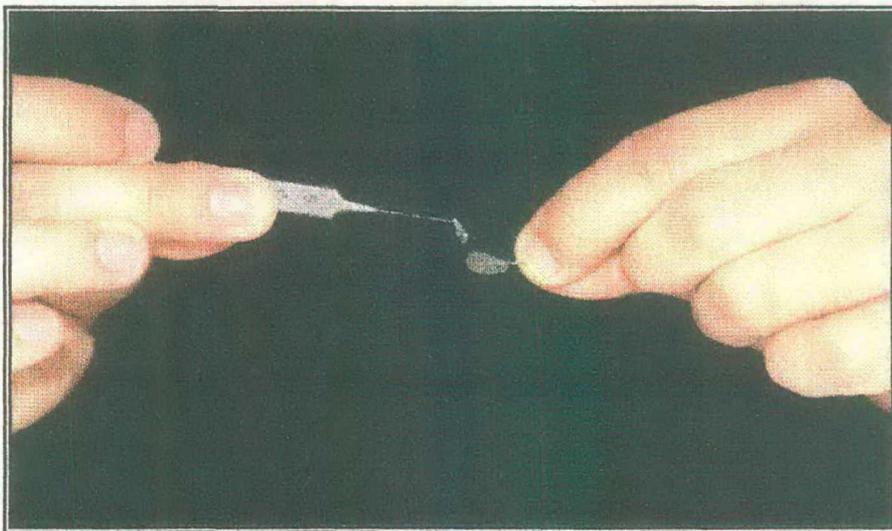


**Figura 02** – Local de Aplicação da película de Esmalte para retirada da moldura da epiderme foliar.

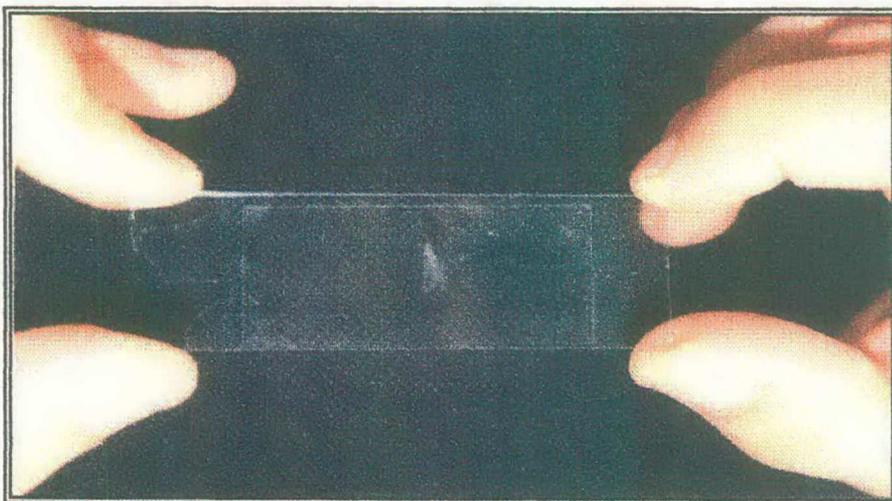
esmalte é espalhado e deixado secar sobre a região do limbo na parte mediana e inferior da folha. As películas de esmalte retiradas são fixadas sobre lâminas microscópicas com a ajuda de uma laminula e de algumas gotas de água estéril, conforme mostra as Fotos 01, 02, 03 e Figura 01. Na determinação dos estômatos foram realizadas 16 observações com 5 repetições por folhas totalizando 80 avaliações. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Solo – CCA/UFSC, com o auxílio de um microscópio óptico (OLYMPUS-CBA.).



**Foto 01** – Momento de retirada da moldura de esmalte da folha



**Foto 02** – Retirada da película de esmalte da folha



**Foto 03** – Montagem de lâmina para análise em microscópio

### 3.3-Área Foliar

#### 3.3.1- Método das Quadrículas

A área foliar foi determinada usando o método de quadrículas, descrito por Bleasdale (1966), empregando-se uma transparência quadriculada com pontos distanciados de 1 cm. Quando a folha é colocada sob a transparência a contagem do número de pontos interceptados dá uma estimativa da área, diretamente em centímetros quadrados como é mostrado nas Fotos 04 e 05.

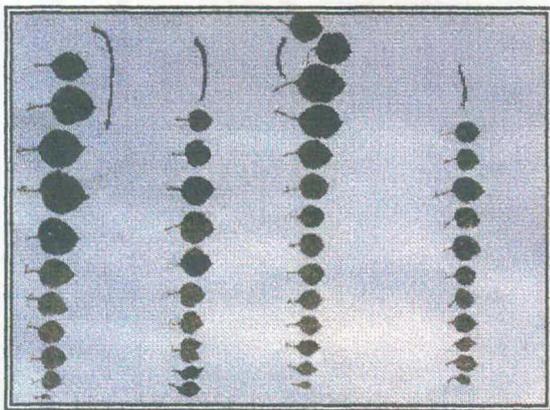


FOTO 4 – Excicata Padrão para determinação de área foliar.

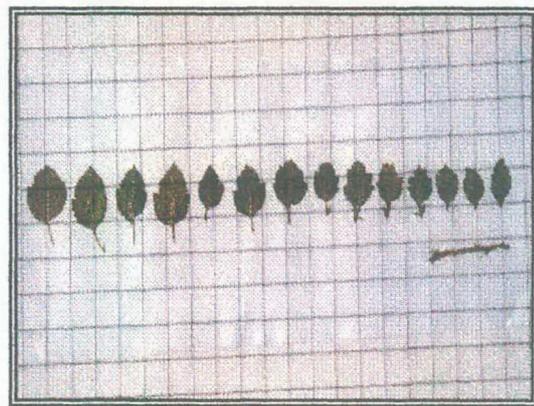


FOTO 5 – Método de determinação de área descrito por Bleasdale (1966).

#### 3.3.2- Determinação via “Análise de Imagens Computadorizada”

A determinação da área foliar foi realizada utilizando programa de análise de imagens computadorizada registrado no Laboratório de Materiais- Engenharia Mecânica-UFSC. Este método emprega-se um scanner para obtenção das imagens foliares, onde estas são registradas e posteriormente submetidas as análises utilizando o programa “analySIS Pro 2.11.002 [®] Soft-Imaging Software GmbH 1986-1996”, estimando a

área de acordo com a escala métrica sugerida pelo usuário (Planilha de Resultados 01 e 02 – Anexos).

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 4.1-Análise dos Estômatos

Observou-se em todas as amostras realizadas a presença de estômatos abertos e fechados mostrados, Tabela 01. Esta observação não corresponde com as afirmações de Blanke & Belcher, (1989); Pospisilova *et alli*, (1988); Sallanon *et alli*, (1993), que verificaram que os estômatos de plantas *in vitro* não apresentam funcionalidade permanecendo constantemente abertos ou fechados e são insensíveis aos estímulos de luz, concentração de CO<sub>2</sub> e potencial hídrico (Majada *et alli*, 1995; Pospisilova *et alli*, 1997).

A determinação estomática do porta-enxerto M-9 *in vitro*, realizadas a partir de contagens direta ao microscópio, evidenciaram uma média de 543 estômatos/mm<sup>2</sup> nas faces inferiores das folhas de plantas com 60 dias *in vitro*, os estômatos *in vitro* apresentam uma forma elíptica (Foto 06 e 07), e 54% encontraram-se abertos (Foto 08), indicando sinais de funcionalidade e reação a estímulos exteriores, como o observado por Shackel *et alli*, (1990); Novello *et alli*, (1992) e Sciutti & Morini, (1993). Estas observações são contrárias as análises de Blanke & Belcher, (1989); Pospisilova *et alli*, (1988); Sallanon *et alli*, (1993).

**Tabela 01-** Características estomáticas, densidade e funcionalidade do porta-enxerto M-9 . Avaliação aos 60 dias de cultura *in vitro*. Laboratório de Microbiologia do Solo – ENR-CCA-UFSC, março/98.

Condição	Número de Estômatos (n°/mm <sup>2</sup> )		Funcionalidade (n°/mm <sup>2</sup> )	
	Face sup.	Face inferior	Aberto	fechado
<i>In vitro</i>	0	543	309	234

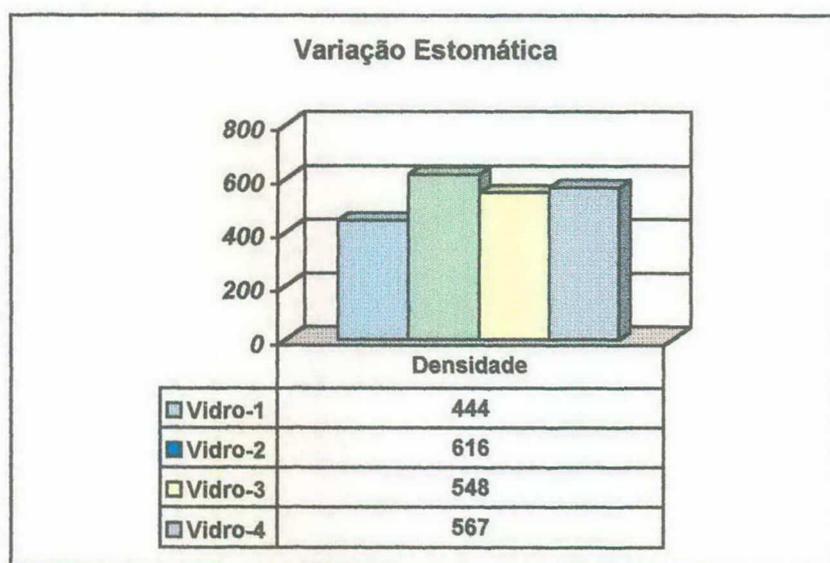
Observações em lâminas feitas com material da face superior da folha do porta-enxerto M-9 não foram visualizados estruturas estomáticas, característica esta que pode diferenciar este porta-enxerto de outros, demonstrando ser um comportamento genético. É importante salientar que em *Malus pumila* não é verificado a presença de estruturas estomáticas nas faces superiores das folhas (Foto 09), nem mesmo no porta-enxerto M-9. Avaliações com o porta-enxertos de MARUBAKAIDO foi possível observar estômatos nas duas faces das folhas, característica que pode estar relacionada com sua maior capacidade de adaptação nas fases *ex-vitro*. Possivelmente este comportamento fisiológico do M-9, que possui estômatos apenas na face inferior da folha, contribua com a sua instabilidade inicial, principalmente nos seus primeiros momentos de aclimatação.

Na determinação estomática verificou-se variações de tamanho entre os estômatos conforme Tabela 02, verificou-se que 36% dos estômatos possuíam tamanho igual ou inferior a 0.02 $\mu$ m, sendo classificados na análise como pequeno, 45% médios variando de >0.02 a 0.03 $\mu$ m e 19% grandes, com tamanho superior a 0,03 $\mu$ m.

**Tabela 02-** Característica estomática, densidade do porta- enxerto M-9. Avaliação aos 60 dias de cultura *in vitro*. Laboratório de Microbiologia do Solo – ENR-CCA-UFSC, março/98.

Condição	Densidade Estômatos (n°/mm <sup>2</sup> )	Densidade (n°/mm <sup>2</sup> )			Tamanho (µm)		
		Pequeno	Médio	Grande	Pequeno	Médio	Grande
<i>In vitro</i>	543	188	248	107	0.01-0.02	0.02-0.03	>0.03

No que se refere a densidade estomática observada em plantas de *Malus pumila* (M-9) *in vitro*, foi possível verificar uma certa variação do número de estômatos por folhas conforme Figura 03., ocorrendo variação da densidade estomática entre plantas de um mesmo vidros.



**Figura 03** – Variação da densidade estomática em 4 diferentes vidros avaliados. Média de 20 observações/ vidro.

Variações de densidade também foi observado em comparações realizadas a campo, ou seja *ex-vitro*, por Jones (1977), Tabela 03. Este autor verificou a ocorrência de 390 estômatos/mm<sup>2</sup> para a cultivar Cox (*M. pumila*), registrando variação nas suas diferentes cultivares variando de 350-600 estômatos/mm<sup>2</sup>. No entanto, na cultivar Cox foi possível também

verificar variações durante as estações do ano com densidade variando entre 230-430 estômatos/mm<sup>2</sup>. Resultados importantes foram verificados entre folhas também verificou-se variação entre 170-360 estômatos/mm<sup>2</sup>.

Observa-se portanto uma variação do número de estômatos demonstrando a influência do meio sobre a planta, onde a funcionalidade estomática procura adequar-se da melhor forma possível, buscando seu equilíbrio com o ambiente de cultivo. Entre diferentes espécies vegetais é possível verificar em suas folhas variações entre as duas faces da folha, muitas vezes superiores a 100% como mostra a Tabela 04. Esta variação do número de estômatos é mencionada por diferentes autores, entre eles: Cappelades *et alli*, (1990); Sciutti & Morini, (1993) e Lima-da-Silva, (1995), onde a densidade estomática pode ser diferente ou igual em folhas *ex-vitro* podendo ocorrer variação na distribuição sobre as duas faces foliares.

**Tabela 03**– Densidade aproximados dos estômatos de folhas de *Malus pumila* (cv. Cox *ex vitro*) e M-9 *in vitro*. Laboratório de Microbiologia do Solo – ENR-CCA-UFSC, março/98.

<i>Espécie</i>	<i>Média de Estômatos</i> (mm <sup>2</sup> )	
	<i>Epiderme Superior</i>	<i>Epiderme Inferior</i>
<b>Porta-Enxerto M-9</b>	<b>00</b>	<b>543</b>
* <i>Malus pumila</i> (cv. Cox)	00	390
* <i>Malus pumila</i> (variação durante as estações)	00	230-430
* <i>Malus pumila</i> (variação entre folhas)	00	170-360
<b>Porta-Enxerto M-9 (variação entre folhas)</b>	<b>00</b>	<b>444-616</b>

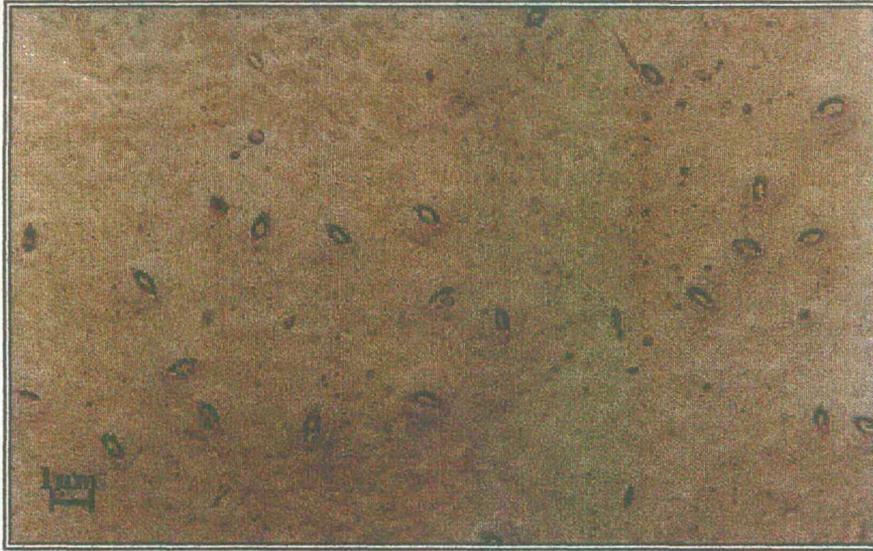
\* Fonte: *Plants and microclimate* (Jones, H. G.)

Tabela 04– Tamanho e distribuição aproximados dos estômatos de folhas de diferentes espécies vegetais e *Malus pumila* (M-9) *in vitro*. Laboratório de Microbiologia do Solo – ENR-CCA-UFSC, março/98.

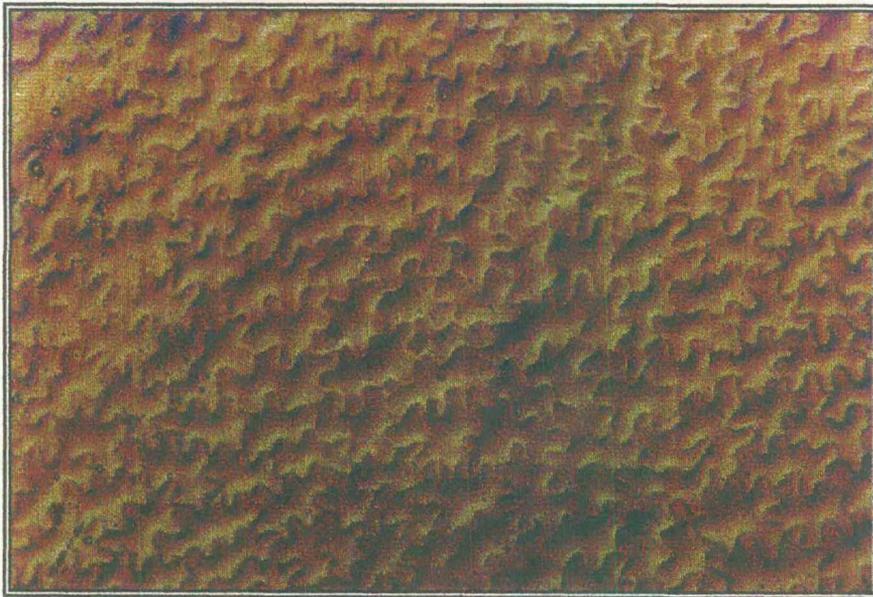
Espécie	Média de Estômatos (mm <sup>2</sup> )		Tamanho médio Quando totalmente abertos (comprimento x largura em µm)	Distância média entre estômatos na epiderme inferior (µm)
	Epiderme			
	Superior	Inferior		
Feijão	40	281	7 x 3	68
Tomate	12	130	13 x 6	99
Gerânio	19	59	24 x 9	146
Milho	52	68	19 x 5	137
Aveia	25	23	38 x 8	236
Trigo	33	14	18 x 7	302
<b>Porta-Enxerto M-9</b>	<b>00</b>	<b>543</b>	<b>3 x 2</b>	<b>18</b>



FOTO 06 – Estômato de Porta Enxerto M-9 *in vitro* evidenciando a forma elíptica. Aumento 1000 x.



**FOTO 07** – Estômato de Porta Enxerto M-9 *in vitro* distribuídos na face inferior da folha. Aumento 200x.



**FOTO 08** – Face superior da folha de M-9 *in vitro*, evidenciando-se a ausência de estruturas estomáticas. Aumento 200x

## 4.2 – Área Foliar

Verificou-se que poucos são os trabalhos sobre áreas foliares, principalmente de macieira *in vitro*, procurou-se determinar um método eficiente e preciso para a avaliação e determinação da área foliar. Sabe-se que através da área é possível estimar várias medidas relativas a funcionalidade das plantas como: - capacidade fotossintética, balanço hídrico, trocas gasosas e principalmente número de estômatos.

A determinação da área foliar é possível utilizando métodos como o descrito por Bleasdale (1966), que analisa a área foliar avaliando as interseções que ocorrem dentro de quadrados de  $1\text{cm}^2$  (Foto 05). Contudo este método não garante uma determinação precisa, o que nos leva a cometer levantamentos de área muitas vezes aproximados ou excedentes ao real.

Buscando métodos que proporcionassem maior precisão que o de quadriculas, procurou-se processos informatizados que oferecesse subsídios para uma determinação precisa com margens de erro quase que inexistentes. Os resultados de área foliar pelos dois métodos são apresentados na Tabela 05.

**Tabela-5** – Área foliar e distribuição dos estômatos em folhas de *Malus pumila* (M-9) *in vitro*, determinada em dois diferentes métodos de análise de área foliar.

Método de Bleasdale (1966) $\text{cm}^2$	Nº de Estômatos	Programa analySIS $\text{cm}^2$	Nº de Estômatos
16	34644	17	37811

Foi possível observar entre os dois métodos utilizados diferença de (01) um  $\text{cm}^2$  entre o mesmo material por eles analisados. A diferença do método de Bleasdale (1966) para o programa analySIS corresponde a 5,8%. Esta diferença em relação ao número de estômatos corresponde a uma densidade estomática de 3167 estômatos, no mesmo material analisado, o que corresponde a 8,4% a diferença entre um método e outro na determinação do número de estômatos.

Verificou-se que a metodologia informatizada apresenta maior rapidez, perfeição, precisão e economia de trabalho quando manipulado um grande número de análises.

## 5-CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o período de estágio no Laboratório de Morfogêse foi possível realizar trabalhos de avaliação com o porta enxerto de macieira M-9 *in vitro*, que possibilitou uma avaliação a nível de fisiologia estomática. A funcionalidade dos estômatos na condição *in vitro* ainda não são bem definidas e sabe-se que estes determinam um papel de grande importância no balanço hídrico das plantas, colaborando ou não nos momentos adversos da planta.

A metodologia aplicada possibilitou constatar que o material *in vitro* de M-9 possuem estômatos viáveis, não apresentando qualquer tipo de deformação como o verificado por Blanke & Belcher (1989) cujos os estômatos de plantas *in vitro* apresentaram deformidades comprometendo o seu funcionamento. Os estômatos analisados apresentaram formato elíptico

como a mencionada na literatura, sendo possível a verificação de 54% de órgãos na condição aberta e 46% fechados o que pode indicar a resposta destes a estímulos exteriores. A utilização de metodologia de determinação de área foliar proporcionou verificar que o método de análises de imagens não apresenta diferença de valores significativos, comparado com a metodologia de quadrículas descrita por Bleasdale, no entanto este método proporciona uma maior agilidade, comodidade e precisão. O método das quadrículas é eficiente mas se torna oneroso quando a quantidade de material é muito grande.

Dentro dos avanços da biotecnologia para o desenvolvimento dos vários setores, a cultura de tecidos busca aprimorar cada vez mais sua metodologia de produção massal de plantas, visando colocar a disposição do homem no caso produtores, materiais de qualidade genética e sanitária comprovada, principalmente livres de vírus e outros patógenos. Hoje na produção de microplantas de porta enxertos de macieira M-9 *in vitro* é possível observar que existe ainda fatores que desestabilizam a técnica, não propriamente na fase *in vitro* mas no decorrer do seu processo, como o que acontece nos momentos de transferência para *ex vitro* que por motivos ainda não totalmente definidos causam estresse hídrico provocando grandes índices de mortalidade.

Foi neste sentido que o estágio foi direcionado buscando avaliar metodologias que pudessem abrir caminhos para novos trabalhos que buscam a determinação da eficiência e funcionalidade dos estômatos *in vitro*, sabendo da importância destes no balanço hídrico nos momentos de transferência de ambiente, sendo este o momentos mais crítico do desenvolvimento da futura planta.

Com o desenvolvimento cada vez maior de tecnologias fica cada vez mais fácil realizar-mos determinados trabalhos que buscam a elucidação de problemas, portando o estágio serviu para vivenciar esta evolução que anda ao nosso lado e que deixamos passar por nós sem que a percebamos.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLEASDALE, J. K. A. (1966). Relationship between the weight of a plant part and total weight as affected by plant density. **J. Hort. Sci.(in the Press)**
- BLANKE, M. M. & BELCHER, A. R.(1989). Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 19:85-89.
- BRAINERD, K. E.; FUNCHIGAMI, L. H.; KWIATOWSKI,S.; CLARK, C. S. (1981). Leaf anatomy and water stress of asepcally cultured “Pixy” plum grown under different environments. **Hort Science** 16:173-175.
- CAPPELADES, M.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C. & DEBERGH, P. (1990). Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells tissue-cultured *Rosa multiflora*. **J. Amer. Society Horticultural Science**, 115(1): 141-145.
- DESJARDINS, Y. (1995). Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plantlets and their effect on acclimatization. In: CARRE & CHAGVARDIEFF (Eds), **Ecophysiology and Photosynthetic *in vitro* cultures**. Cadarache, França, CEA, p.145-160.
- DONNELLY, D. J. & VIDAVER, W. E. (1984). Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. **J. Amer. Society Horticultural Science**, 109(2):177-181.
- FUJIWARA, K. & KOZAI, T. (1995). Control of the environmental factors for plantlet production – with some mathematical simulation. In: CARRE, F. & CHAGVARDIEFF, P. (Eds) **Ecophysiology and Photosynthetic *in vitro* cultures**. Cadarache, França, CEA, p. 109-120.

- FERRAZ, E. C. (1977). Apontamentos de fisiologia vegetal. **ESALQ**, p.11-36.
- GALZY, R. (1990). Remarques sur la nutrition carbonée de la Vigne *in vitro*. **Bulletin de l'O.I.V.**, 707-708:5-20.
- GALZY, R. & COMPAN, D. (1992). Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 31:239-244.
- JONES, O. P.; HOPGOOD, M.E. (1977). Propagation *in vitro* of M-26 apple rootstocks. **J. Horti. Sci.** 52, 235-238.
- KOUIDER, M.; SKIRVIN, R. M.; KORBAN, S. S.; WIDHOLM, J.M. & HAUPTMANN, R. (1984). Adventitious shoot formation from 'Red Delicious' apple cotyledone *in vitro*. **J. Hort. Sci.** 59:295-302.
- LIMA-DA-SILVA, A. (1995). Mutagenese *in vitro* de porte-greffes de la vigne: méthodologie d'irradiation, d'isolement et caractérisation de mutants. **Bordeaux, Université de Bordeaux II**, p.135.
- LIMA-DA-SILVA, A. & DOAZAN, J. P. (1995). Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de Vigne *in vitro*. **Journal International Sciences Vigne Vin**, 29:1-9.
- MAJADA, J. P.; FAL, M.<sup>a</sup> SANCHEZ-TAMEËS, R. (1995). Influence of the *in vitro* environment on the stomatal physiology and morphology of micropropagated *Dianthus caryophyllus*. In: CARRE, F. & CHAGVARDIEFF, P. (Eds) **Ecophysiology and Photosynthetic *in vitro* cultures**. Cadarache, França, CEA, p 203-204.
- NOVELLO, V.; GRIBAUDO, I & ROBERTS, A.V. (1992). Stomatal conductance in rooted and unrooted tissue-cultured grapevines. In: **Proceedings 4<sup>th</sup> International Symposium of Grapevine Physiology, Turin, Italy**, p.493-497.

- POSPISILOVA, J.; SOLAROVA, J.; CATSKY, J.; ONDREJ, M. & OPATRNY, Z. (1988). The photosynthesis characteristics during the micropropagation of tobacco and potato plants. **Photosynthetica** 22(2):205-213.
- POSPISILOVA, J.; CATSKY, J. & SESTAK, Z. (1997). Photosynthesis in plants cultivated *in vitro*. In: PESSARAKLI, M. (Ed.) **Handbook of photosynthesis** New York, Marcel Dekker, p. 525-540.
- SALLANON, H.; TORT, M. & COUDRET, A. (1993). The ultrastructure of micropropagated and greenhouse rose plant stomata. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 32: 227-233.
- SCIUTTI, A. & MORINI, S. (1993). Modified stomatal characteristics in actively proliferating *in vitro* plum cultures at varying levels of relative humidity. **Advance Horticulturae Science**, 7:157-159.
- SHACKEL, K. A.; NOVELLO, V. & SUTTER, E. G. (1990). Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue cultured apple plants. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 115, p.468-472.
- SUTTER, E. (1988). Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 113(2):234-238.
- YUE, D.; GOSSELIN, A. & DESJARDINS, Y. (1993). Re-examination of the photosynthetic capacity of *in vitro* – cultured strawberry. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 118(3): 419-424.

## **7- ANEXOS**

Resultados das análises de área foliar  
de plantas pelo método de análises  
de imagem computadorizada.

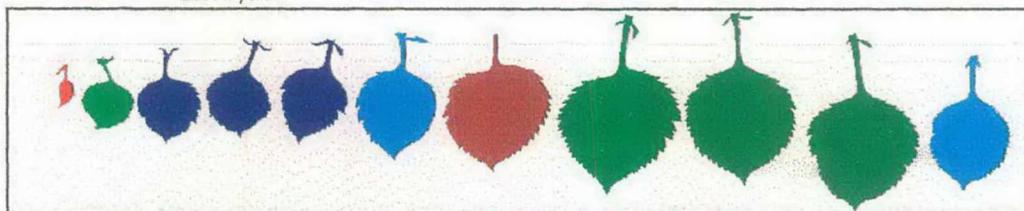
Vidro observado I

VIDRO 1/ PLANTA 1  
 MEDIDAS DE ÁREA FOLIAR

ANÁLISE ESTATÍSTICA

ID Particle	ID Class	Area mm <sup>2</sup>
1	8	356,74
2	8	399,17
3	5	204,01
4	8	356,48
5	7	305,40
6	3	120,43
7	3	142,73
8	3	114,28
9	5	207,72
10	2	73,32
11	1	13,65
		2293,93

Statistical Function	ID Particle	ID Class	Area mm <sup>2</sup>
Base Unit			
Count	11	11	11
Mean	6,00	4,82	208,54
Standard Deviation	3,32	2,60	129,16
Maximum	11	8	399,17
Minimum	1	1	13,65



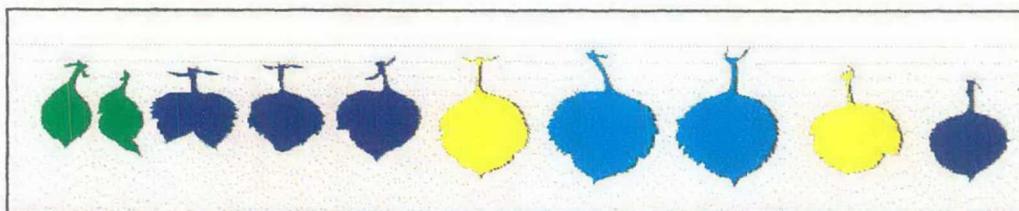
Folhas da planta-1

VIDRO 1/ PLANTA 2  
 MEDIDAS DE ÁREA FOLIAR

ANÁLISE ESTATÍSTICA

ID Particle	ID Class	Area mm <sup>2</sup>
1	5	206,95
2	5	225,35
3	3	132,48
4	4	169,59
5	2	71,66
6	3	102,74
7	4	150,62
8	3	114,66
9	2	62,75
10	3	117,55
		1354,33

Statistical Function	ID Particle	ID Class	Area mm <sup>2</sup>
Base Unit			
Count	10	10	10
Mean	5,50	3,40	135,43
Standard Deviation	3,03	1,07	53,52
Maximum	10	5	225,35
Minimum	1	2	62,75



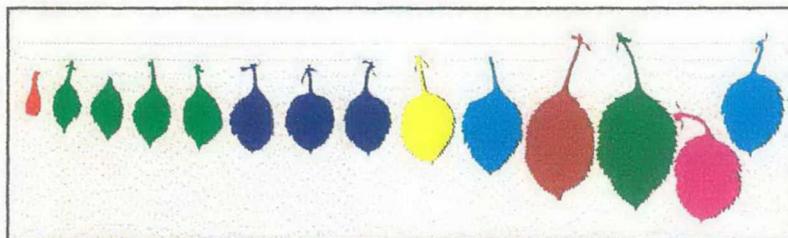
Folhas da planta-2

VIDRO 1/ PLANTA 3  
 MEDIDAS DE ÁREA FOLIAR

ID Particle	ID Class	Area mm <sup>2</sup>
1	8	396,47
2	5	214,39
3	7	321,49
4	4	168,24
5	5	209,26
6	2	92,16
7	2	56,59
8	3	124,47
9	3	118,31
10	2	97,80
11	3	127,48
12	1	23,52
13	2	69,92
14	6	254,70
		2274,83

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Statistical Function	ID Particle	ID Class	Area mm <sup>2</sup>
Base Unit			
Count	14	14	14
Mean	7,50	3,79	162,49
Standard Deviation	4,18	2,12	106,08
Maximum	14	8	396,47
Minimum	1	1	23,52



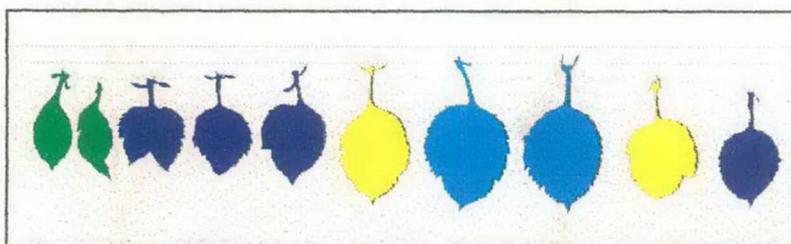
Folhas da planta-3

VIDRO 1/ PLANTA 4  
 MEDIDAS DE ÁREA FOLIAR

ID Particle	ID Class	Area mm <sup>2</sup>
1	4	172,15
2	2	76,21
3	1	30,32
4	2	85,95
5	3	123,89
6	3	109,02
7	3	111,14
8	2	91,84
9	2	82,17
10	3	141,84
11	2	53,90
		1078,42

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Statistical Function	ID Particle	ID Class	Area mm <sup>2</sup>
Base Unit			
Count	11	11	11
Mean	6,00	2,45	98,04
Standard Deviation	3,32	0,82	39,77
Maximum	11	4	172,15
Minimum	1	1	30,32



Folhas da plantas-4