

# Morfoanatomia das folhas do porta-enxerto de videira 'VR043-43' (*Vitis vinifera* L. × *Vitis rotundifolia* michx.) em diferentes condições de cultivo

*Morpho-anatomy of the leaves of grapevine rootstock 'VR043-43' (Vitis vinifera L. × Vitis rotundifolia michx.) under different culture conditions*

Marília Pereira Machado<sup>[a]</sup>, Luiz Antonio Biasi<sup>[b]</sup>

<sup>[a]</sup> Engenheira agrônoma, Mestre, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná (UFPR), bolsista de Doutorado do CNPq, Curitiba, PR - Brasil, e-mail: ma\_rilia10@hotmail.com

<sup>[b]</sup> Engenheiro agrônomo, Doutor, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná (UFPR), bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq, Curitiba, PR - Brasil, e-mail: biasi@ufpr.br

## Resumo

A micropropagação tem solucionado diversos problemas de propagação de diferentes espécies, porém, as condições *in vitro* alteram a morfologia das plantas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a morfologia das folhas do porta-enxerto de videira 'VR043-43' cultivadas *in vitro* – normais e *in vitro* – hiperídricas, aclimatizadas e *in vivo*. As plantas foram micropropagadas em meio de cultura QL, acrescido ou não de 5,0 µM de BAP (6- benzilaminopurina). As plantas aclimatizadas foram mantidas em casa de vegetação, assim como as plantas *in vivo*. A análise anatômica foi realizada em secções transversais do limbo e a superfície foliar pela microscopia eletrônica de varredura. Somente as folhas *in vivo* apresentam depósito de cera na face adaxial. As folhas das plantas dos quatro tratamentos são hipoestomáticas, com epiderme unisseriada. As células da epiderme da face adaxial são mais altas no eixo anticlinal nas plantas *in vivo*. Os estômatos das folhas *in vitro* e hiperídricas apresentam maior irregularidade no tamanho. As folhas *in vivo* apresentam parênquima paliçádico uniestratificado, parênquima lacunoso variando de 3-4 camadas com espaços intercelulares pequenos e células do mesofilo com conteúdo denso. As folhas *in vitro* –normais e *in vitro* – hiperídricas diferem das folhas *in vivo* por apresentarem células epidérmicas semelhantes em ambas as faces e o parênquima lacunoso variando de 2-3 camadas. Nas folhas hiperídricas, o parênquima lacunoso apresenta espaços intercelulares maiores que as folhas *in vitro* normais.

**Palavras-chave:** Micropropagação. Aclimatização. Hiperidricidade.

## Abstract

*The environment which exists inside the tissue culture chamber results in plantlets with an altered anatomy, morphology and physiology. The objective of this work was to characterize the morphology of plants of the*



*grapevine rootstock 'VR043-43' cultivated in vitro – normal and in vitro – hiperhydic, acclimatized and greenhouse-grown plants. The plants were micropropagated in QL culture, added or not with 5  $\mu\text{M}$  of BAP (6-benzylaminopurine). The plants acclimatized were maintained in greenhouse, as well as the greenhouse-grown plants. It was carried out analysis in scanning electron micrograph and anatomic analysis. Only the leaves of greenhouse-grown plants, present deposit of wax in the adaxial leaf surface. The leaves of the plants of the four handlings are hypostomatic, with epidermis unisseriada. The cells of the epidermis of the adaxial surface are higher in the axis anticlinal in the greenhouse-grown plants. The stomatas of the leaves in vitro and hiperhydic present bigger irregularity in the size. The leaves of greenhouse-grown plants present one layer of palisade, three layers of spongy parenchyma with small intercellular spaces, cells of the mesophyll with dense content. The leaves in vitro (normal and hiperhydicity leaves) differ of the leaves greenhouse-grown plants by present epidermic cells similar in both to the surfaces and two layers of spongy parenchyma. In the leaves hiperhydic the spongy parenchyma presents bigger intercellular spaces than the leaves in vitro normal.*

**Keywords:** Micropropagation. Acclimatization. Hyperhydicity.

## Introdução

O cultivo *in vitro* induz a adaptações morfológicas, sendo a drástica redução no tamanho dos órgãos a mais evidente. A organização histológica dos tecidos é fortemente alterada (BOUQUET; TORREGROSA, 2003). Dami e Huges (1995) demonstraram que as folhas *in vitro* de videira contêm células do mesofilo grandes e são deficientes em tecido paliçádico.

O ambiente *in vitro* apresenta baixa luminosidade, alta umidade relativa, condições assépticas e alta concentração de sacarose no meio de cultura, o que propicia o crescimento heterotrófico das plantas (PREECE; SUTTER, 1991), que poderão ter dificuldade de sobrevivência quando transferidas para o ambiente *ex vitro* (ZIV, 1991).

O estresse hídrico que as plantas sofrem na aclimatização pode resultar da excessiva transpiração, principalmente pelas folhas (PREECE; SUTTER, 1991). As folhas das plantas *in vitro* são geralmente finas, tenras, fotossinteticamente pouco ativas e com maior densidade estomática e, por isso, mal adaptadas às condições *ex vitro* (PIERIK, 1990; SUTTER, 1988; WETZSTEIN; SOMMER, 1983).

Além disso, graças às condições em que as plantas micropropagadas se desenvolvem, estão sujeitas ao complexo fenômeno da hiperidricidade, que pode dificultar ou inviabilizar a sobrevivência das plantas na aclimatização (PREECE; SUTTER, 1991).

O objetivo deste trabalho foi assinalar algumas características da morfologia foliar do porta-enxerto

de videira 'VR043-43' cultivadas *in vitro* (normais e hiperídricas), aclimatizadas e *in vivo*.

## Materiais e métodos

A micropropagação das plantas foi realizada no Laboratório de Micropropagação de Plantas, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

As folhas avaliadas foram provenientes dos ambientes de cultivo *in vitro* – normal, *in vitro* – hiperídrica, aclimatizada e *in vivo*. As plantas *in vitro* – normais – foram obtidas a partir de segmentos nodais do porta-enxerto 'VR043-43', com 10 mm de comprimento, uma gema e uma folha, provenientes do terceiro subcultivo. Os explantes foram isolados em meio de cultura QL (QUOIRIN; LEPOIVRE, 1977), suplementado com as vitaminas do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Vetec®) e pH ajustado para 5,8. Os frascos de cultivo continham 10 mL de meio de cultura e foram tampados com papel alumínio. O meio de cultura foi esterilizado à temperatura de 121 °C, durante 20 minutos e 1,5 atm.

As folhas com sintomas de hiperidricidade foram coletadas das plantas provenientes do segundo subcultivo, a partir de segmentos nodais, em meio de cultura QL suplementado com 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP.

As plantas não hiperídricas foram aclimatizadas na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo (UFPR). As mudas micropropagadas foram transferidas para o ambiente *ex vitro* após 30 dias de cultivo *in vitro*. No momento do transplante, as raízes das plantas foram lavadas e transferidas para tubetes de 53 cm<sup>3</sup> de volume, contendo substrato comercial (Plantmax®). As plantas foram mantidas em câmara de nebulização intermitente por 10 dias e transferidas para casa de vegetação com irrigação manual. A coleta das folhas foi realizada após 90 dias de aclimatização.

As folhas *in vivo* foram coletadas de plantas provenientes da propagação por mergulhia, mantidas em vasos na casa de vegetação.

Para a análise anatômica, folhas maduras foram coletadas de cada ambiente de cultivo: *in vitro* – normal, *in vitro* – hiperídrica, aclimatizada e *in vivo*, a partir do 3º ou 4º nó, contando-se do ápice para a base do caule a partir da gema apical. As observações anatômicas da folha foram feitas na região mediana do limbo. A fixação das amostras foi feita em FAA 70 (formaldeído, ácido acético, etanol 70%, 1:1:18 v/v) (JOHANSEN, 1940), e posteriormente conservadas em etanol 70%. Lâminas permanentes foram utilizadas para as análises. Os materiais destinados à preparação de lâminas permanentes foram incluídos em resina plástica (historresina-Leica), segundo a técnica de Feder e O'Brien (1968) e as indicações do fabricante. Os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo e os cortes foram obtidos com 7 µm de espessura, corados com fucsina básica e azul de astra (FEDER; O'BRIEN, 1968). As lâminas foram montadas com resina sintética (Permalte®).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná. As folhas foram fixadas em FAA 70, desidratadas em série etílica, secas pelo método do ponto crítico, montadas sobre suportes de alumínio e recobertas com uma camada de ouro de 30 a 40 nm. As observações e fotografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM – 6360 LV, operando a 10 KV.

## Resultados

As análises histológicas revelaram que as folhas, das diferentes condições de cultivo, são hipoestomá-

ticas (Figuras 2 e 3), com epiderme unisseriada (Figura 1). As folhas *in vivo* apresentam células da epiderme da face adaxial mais altas no eixo anticlinal (Figura 1A), parênquima paliçádico uniestratificado e lacunoso com três camadas com espaços intercelulares pequenos, ambos com conteúdo denso.

O mesofilo da folha das plantas cultivadas *in vitro* (normal) apresentou-se organizado em parênquima paliçádico e lacunoso, porém, com menor número de células quando comparado com o mesofilo de plantas *in vivo* e parênquima lacunoso bisseriado (Figura 1B). Assim como observado com o porta-enxerto 'VR043-43', as folhas de *Leucaena leucocephala in vitro* normais apresentaram mesofilo organizado (DHAWAN; BHOJWANI, 1987).

As folhas hiperídricas apresentam mesofilo rico em espaços intercelulares (Figura 1C). Isso também foi observado em folhas hiperídricas de diversas espécies (ZIV, 1991), como em folhas hiperídricas de maçã 'Gala' (PASQUALETTO et al., 1988). No entanto, em *Prunus avium*, diferenças evidentes não foram observadas entre o mesofilo das folhas das plantas *in vitro* normais e hiperídricas (FRANCK et al., 1998). A rápida desidratação das plantas cultivadas *in vitro* quando transferidas para casa de vegetação é correlacionada, dentre outros fatores, com baixa deposição de cera epicuticular e alta redução do mesofilo das folhas.

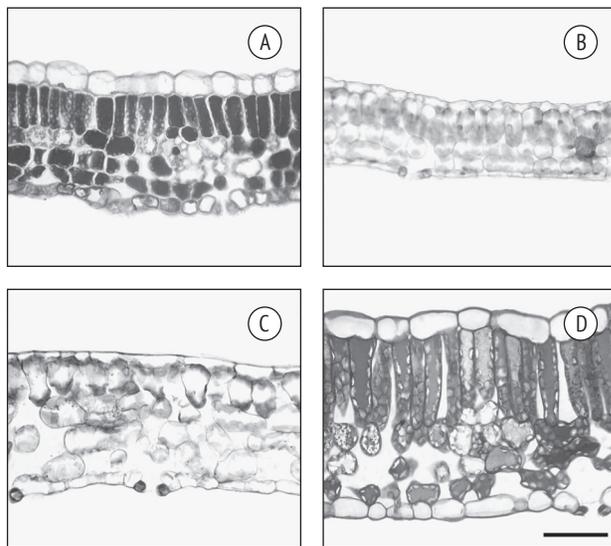
As células do parênquima paliçádico das folhas *in vivo* e aclimatizadas são mais longas comparadas com as demais, havendo características distintas entre ambas, como maior espaço intercelular nas folhas aclimatizadas (Figuras 1A e 1D). Assim como em morangueiro, as folhas persistentes foram mais espessas em razão do maior alongamento das células do parênquima paliçádico, mas não houve mudança no número de camadas ou na quantidade de espaços intercelulares do mesofilo (FABBRI et al., 1986). Durante a aclimatização, as folhas que iniciaram seu desenvolvimento como primórdios foliares *in vitro* possuem características morfológicas intermediárias das folhas *in vitro* e das folhas *in vivo*. Somente as folhas completamente formadas *ex vitro* são semelhantes às folhas *in vivo* (DONNELLY et al., 1985).

As folhas *in vitro* (hiperídricas) diferem das folhas *in vitro* (normais e *in vivo*) pelas células do parênquima lacunoso perderem seu formato característico (Figura 1A, 1B e 1C). As folhas de brotações hiperídricas têm cutícula delgada, parede celular das

células epidérmicas fina e com estômatos anormais (Figura 1C).

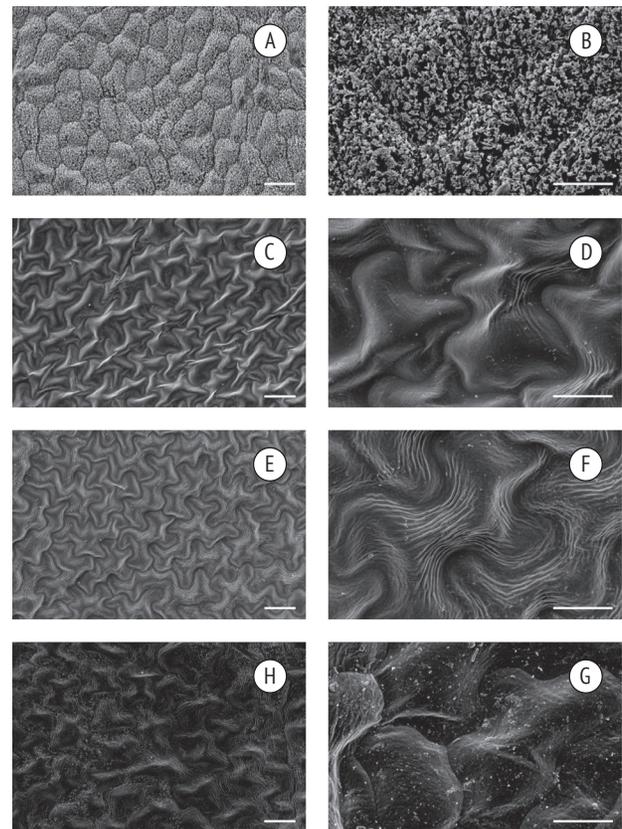
Segundo Pâques e Boxus (1987), em virtude da “má formação” das folhas das plantas micropropagadas, o controle da transpiração pela cutícula e estômatos se dá de forma ineficiente, dificultando a aclimatização das plantas. Entretanto, o maior problema para a excessiva transpiração é, provavelmente, a má formação do aparelho estomatal, pois normalmente mais de 90% da água perdida pela transpiração na planta ocorre por meio dos estômatos, e o restante é perdido pela cutícula (RAVEN et al., 2001).

Pela microscopia eletrônica de varredura observa-se que, comparativamente às plantas desenvolvidas *in vivo*, as folhas das plantas *in vitro* não apresentam estrutura cristalina da cera epicuticular na epiderme na face adaxial (Figuras 2A-B e 2C-D). A ausência de cera epicuticular resulta na excessiva transpiração por meio da cutícula e isso, juntamente com a transpiração estomatal, é uma grande contribuição para a morte da muda pela dessecação após o transplante (GROUT; ASTON, 1977; WARDLE et al., 1979).



**Figura 1** - Seções transversais do limbo foliar do porta-enxerto de videira 'VR043-43'. A) Planta *in vivo*. B) Planta cultivada no ambiente *in vitro* - normais. C) Planta cultivada no ambiente *in vitro* - hiperídricas. D) Planta aclimatizada. Barra: 50 µm. Observar maior espessura do limbo, células do parênquima paliçádico mais longas e maior concentração de substâncias nas plantas *in vivo* e aclimatizada

A diferença na superfície da epiderme de plantas *in vitro* e desenvolvidas *in vivo* também foi observada em diferentes espécies, como couve-flor (GROUT, 1975), cravo e repolho (SUTTER; LANGHANS, 1982), sendo observada superfície lisa da epiderme das folhas dessas espécies, assim como observou-se para o porta-enxerto 'VR043-43' (Figura 2). A espessura da cutícula varia de acordo com as condições ambientais (TAIZ; ZEIGER, 2004) e, para Grout e Aston (1977), a carência de cera epicuticular sobre folhas de plantas *in vitro* se dá graças à alta umidade no frasco de cultivo. A folha das plantas aclimatizadas também apresentou diferenças na superfície da epiderme, comparando-se com a folha das plantas *in vivo* (Figura 2G-H).



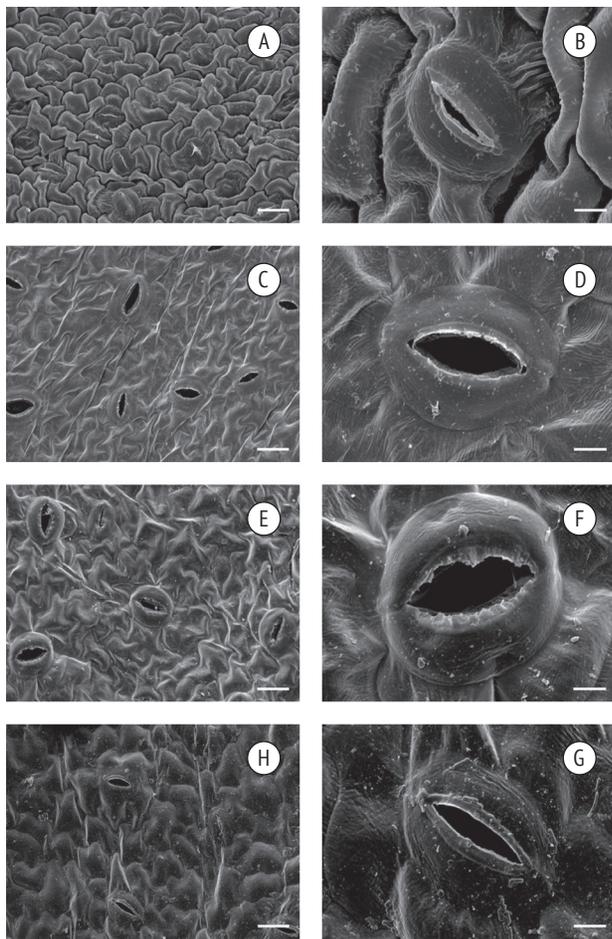
**Figura 2** - Vista geral da epiderme e da face adaxial da folha do porta-enxerto de videira 'VR043-43'. A e B) Planta *in vivo*, observar a presença de cera. C e D) Planta cultivada ao ambiente *in vitro* - normais. E e F) Planta cultivada ao ambiente *in vitro* - hiperídricas, observar a presença de estrias epicuticulares. G e H) Planta aclimatizada. Barras A, C, E e G: 20 µm. Barras B, D, F e H: 10 µm.

Em muitos estudos, houve uma correlação positiva entre a quantidade de cera e a sobrevivência das plantas micropropagadas quando removidas para o ambiente *ex vitro*. Contudo, somente esse fator não foi um bom prognóstico da sobrevivência das plantas durante a aclimatização (SUTTER, 1985).

Os estômatos das folhas nas diferentes condições apresentam contorno elíptico característico de dicotiledôneas (Figura 3A-H). No entanto, os estômatos das folhas hiperídricas apresentaram formato arredondado (Figura 3E-F). Isso pode se dar graças ao excesso de água absorvida, pois as células de plantas hiperídricas são deficientes em celulose

e lignina, o que reduz a pressão da parede celular e, conseqüentemente, absorve mais água (ZIV, 1991). Os estômatos de folhas hiperídricas são grandes e proeminentes, localizam-se acima das células da epiderme (Figura 3E-F). Essas características também foram observadas em cravo (ZIV, 1991) e abacate cv. RR-86 (VIÑA et al., 2001).

Nas folhas *in vitro* (normais e hiperídricas), os estômatos apresentam-se completamente abertos (Figura 3C-D e Figura 3E-F). Segundo Ziv (1991), as células-guarda dos estômatos das folhas hiperídricas não são funcionais, por isso mantêm-se sempre abertas.



**Figura 3** - Vista geral da epiderme e da face abaxial da folha do porta-enxerto de videira 'VR043-43'. A e B) Planta *in vivo*. C e D) Planta cultivada no ambiente *in vitro* - normais. E e F) Planta cultivada ao ambiente *in vitro* - hiperídricas. Observar estômatos proeminentes e mais desenvolvidos. G e H) Planta aclimatizada. Barras A, C, E e G: 20 µm. Barras B, D, F e H: 5 µm.

## Conclusões

- O ambiente *in vitro* modificou a morfoanatomia foliar do porta-enxerto de videira 'VR043-43', podendo ser revertida com a aclimatização das plantas.
- A hiperidricidade presente nas plantas cultivadas *in vitro*, afeta a morfoanatomia das folhas.
- As mudanças estruturais foliares observadas nas plantas do porta-enxerto de videira 'VR043-43' cultivadas no ambiente *in vitro* podem afetar a transferência das plantas para o ambiente *ex vitro*.

## Referências

BOUQUET, A.; TORREGROSA, L. Micropropagation of the grapevine (*Vitis* spp.). In: JAIN, S. M. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 319-352.

DAMI, J.; HUGHES, H. Leaf anatomy and water loss of *in vitro* PEG-treated 'Valiant' grape. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, p. 179-184, 1995.

DHAWAN, V.; BHOJWANI, S. S. Hardening *in vitro* and morpho-physiological changes in the leaves during acclimatization of micropropagated plants of *Leucaena leucocephala* (LAM.) de WIT. **Plant Science**, Lucknow, v. 53, p. 65-72, 1987.

DONNELLY, D. J. et al. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell, Tissue, Organ Culture**, v. 4, p. 43-50, 1985.

- FABBRI, A. et al. Anatomical changes in persistent leaves of tissue cultured strawberry plants after removal from culture. **Scientia Horticulturae**, v. 28, p. 331-337, 1986.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.
- FRANCK, T. et al. Cytological comparison of leaves and stems of *Prunus avium* L. shoots cultured on a solid medium with agar or gelrite. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 73, n. 1, p. 32-43, 1998.
- GROUT, B. W. W. Wax development of leaf surfaces of *Brassica oleracea* var. Currawong regenerated from meristem culture. **Plant Science Letters**, v. 5, p. 401-405, 1975.
- GROUT, B. W. W.; ASTON, M. J. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture: I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. **Horticultural Research**, v. 17, p. 1-7, 1977.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill, 1940.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-479, 1962.
- PÂQUES, M.; BOXUS, P. Vitrification: review of literature. **Acta Horticulture**, v. 121, p. 155-166, 1987.
- PASQUALETTO, P. L. et al. Changes in structure and elemental composition of vitrified leaves of 'Gala' apple in vitro. **Acta Horticulturae**, v. 227, 1988.
- PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990.
- PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMANN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p. 71-93.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, v. 78, p. 437-442, 1977.
- RAVEN, P. H. et al. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- SUTTER, E. Morphological, physical and chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated in vitro. **Annals of Botany**, v. 55, p. 321-329, 1985.
- SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherr, and sweetgum plants after removal from in vitro culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 113, p. 234-238, 1988.
- SUTTER, E.; LANGHANS, R. W. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. **Canadian Journal Botany**, v. 60, p. 2896-2902, 1982.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- VIÑA, G. et al. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea Americana* Mill microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 229-237, 2001.
- WARDLE, K. et al. Abscisic acid and the regulation of water loss in plantlets of *Brassica oleracea* L. var. botrytis regenerated through apical meristem culture. **Annals of Botany**, v. 43, p. 745-752, 1979.
- WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Scanning electron microscopy of in vitro-cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 108, p. 475-480, 1983.
- ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMANN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p. 45-70.

Recebido: 09/02/2011

Received: 02/09/2011

Aprovado: 16/03/2011

Approved: 03/16/2011