

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO CAMPUS RIO VERDE – GO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-
AGRONOMIA

**CULTURA *in vitro* DE *Pouteria gardneriana* Radlk:
ESTUDOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS VISANDO A
ACLIMATIZAÇÃO *in situ***

Autora: Mariluzia Silva Leite
Orientador: Dr. Fabiano Guimarães Silva

RIO VERDE – GO
dezembro – 2016

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO CAMPUS RIO VERDE – GO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-
AGRONOMIA

**CULTURA *in vitro* DE *Pouteria gardneriana* Radlk:
ESTUDOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS VISANDO A
ACLIMATIZAÇÃO *in situ***

Autora: Mariluzia Silva Leite
Orientador: Dr. Fabiano Guimarães Silva

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA em CIÊNCIAS AGRÁRIAS, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde – Área de concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado.

Rio Verde – GO
dezembro – 2016

L533c

Leite, Mariluzia Silva.

Cultura *in vitro* de *Pouteria gardneriana* Radlk: Estudos Anatômicos e Fisiológicos visando a Aclimatização *in situ*/Mariluzia Silva Leite. Rio Verde – 2016.

87 f.: il.

Tese (Doutorado em Ciências Agrárias-Agronomia) - Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde – GO. 2016.

Orientador: Dr. Fabiano Guimarães Silva.

Bibliografia

1. Alumínio. 2. Cultura de tecidos. 3. Guapeva. 4. Morfoanatomia. I. Título. II. Instituto Federal Goiano- Campus Rio Verde.

CDD 634

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-
AGRONOMIA

**CULTURA *in vitro* DE *Pouteria gardneriana* Radlk:
ESTUDOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS VISANDO A
ACLIMATIZAÇÃO *in situ***

Autora: Mariluzza Silva Leite
Orientador: Dr. Fabiano Guimarães Silva

TITULAÇÃO: Doutora em Ciências Agrárias – Área de
Concentração em Produção Vegetal sustentável no Cerrado.

APROVADA em 19 de dezembro de 2016.

Prof. Dr. Ricardo Motta Miranda
Avaliador externo
UFRRJ

Prof. Dr. Cleiton Mateus Sousa
Avaliador externo
IF Goiano/Ceres

Prof^a. Dr^a. Giselle Camargo Mendes
Avaliadora externa
IF Goiano/Polo de Inovação

Prof. Dr. Aurélio Rúbio Neto
Avaliador interno
IF Goiano/Polo de Inovação

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva
(Orientador)
Presidente da banca
IF Goiano/Rio Verde

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar comigo em todos os instantes, por ser o motivo de minha existência.

Ao professor Dr. Fabiano Guimarães Silva, pela orientação concedida.

À Dr^a. Giselle Camargo Mendes e Dr. Aurélio Rúbio Neto, que tanto colaboraram sendo meus coorientadores.

À professora Dr^a. Paula Martins, pela amizade e parceira nos experimentos.

À minha amiga Elisvane Silva de Assis, pelo companheirismo e dedicação ao nosso trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias.

Aos meus avaliadores Dr. Ricardo Motta Miranda e Dr. Cleiton Mateus Sousa, que não mediram esforços para contribuir e enriquecer o meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, para realização deste doutorado.

À minha família, em especial ao meu marido Weber Vinícius Moreira Leite, pelo companheirismo, amizade, aos meus filhos, Douglas Vinícius e Phyllipe Augusto, por compreenderem os momentos de ausência.

Aos colegas do Laboratório de Cultura e Tecidos Vegetais do Cerrado, Luciana Arantes, Paula Faria, Agda Centofante, Layara Bessa, Paulo Dorneles, Anielly Monteiro, Juliana Cabral, Rejaine Rios, Ana Cláudia, Márcio Rosa, Danielle Reis, Mariângela Brito, Estênio Moreira, Valéria Vilela, Janniffer Custódio, Alan Carlos, professor Lucas Anjos, e demais colegas, pelos ensinamentos e convivência.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Mariluzza Silva Leite, filha de Ubaldo Teodoro da Silva e Aldaci Santana da Silva, nasceu em Piranhas, Estado de Goiás, em 22 de novembro de 1974.

É casada com Weber Vinícius Moreira Leite e tem dois filhos, Douglas Vinícius Moreira Leite Silva e Phyllipe Augusto Leite Silva.

Em 1998, recebeu grau de Licenciatura em Ciências Biológicas, conferido pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Em 2004, concluiu a especialização em Tópicos em Genética Moderna pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Em 2012, concluiu o curso Mestrado no programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias- Agronomia pelo Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde-GO.

Em março de 2014, iniciou no curso de Doutorado pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias- Agronomia pelo Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde-GO.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Características gerais da espécie <i>Pouteria gardneriana</i> Radlk.....	03
2.2. Cultura de Tecidos e Micropropagação Fotoautotrófica.....	06
2.3. Intensidade luminosa na cultura <i>in vitro</i>	06
2.4. Tolerância à toxicidade do Alumínio.....	07
2.5. Aclimatização.....	07
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	08
OBJETIVO GERAL	16
CAPÍTULO I. TOXIDADE DO ALUMÍNIO SOB CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DE PLÂNTULAS DE <i>Pouteria gardneriana</i> Radlk CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	17
RESUMO.....	17
INTRODUÇÃO.....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	22

DISCUSSÃO.....	28
CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

CAPÍTULO II. MORPHOANATOMY AND PHYSIOLOGY OF <i>Pouteria gardneriana</i> Radlk PLANTLETS GROWN <i>IN VITRO</i> AT VARIATION IN PHOTOSYNTHETIC PHOTON FLUX DENSITIES.....	35
ABSTRACT.....	35
RESUMO.....	36
INTRODUCTION.....	36
MATERIALS AND METHODS.....	38
RESULTS.....	41
DISCUSSION.....	47
CONCLUSIONS.....	49
ACKNOWLEDGEMENTS.....	49
REFERENCES.....	50

CAPÍTULO III. PRÉ-CONDICIONAMENTO DE PLÂNTULAS <i>Pouteria gardneriana</i> Radlk CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> PARA ACLIMATIZAÇÃO.....	54
RESUMO.....	54
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	56
RESULTADOS.....	60
DISCUSSÃO.....	64
CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
CONCLUSÕES GERAIS.....	69

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Principais estudos da família Sapotaceae do gênero <i>Pouteria</i> , publicados no período de 2012 a 2016 (dados obtidos na Web of Science e Sciencedirect).....	05
 CAPÍTULO I TOXIDADE DO ALUMÍNIO SOB CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DE PLÂNTULAS DE <i>Pouteria gardneriana</i> Radlk CULTIVADAS IN VITRO	
Tabela 1. Clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , carotenoides, clorofila total, razão Cl. <i>a</i> /Cl. <i>b</i> e índice feofitinação (I.F.) de plântulas de <i>Pouteria gardneriana</i> Radlk, cultivadas in vitro aos 60 dias em meio MS 50% suplementado com alumínio (0, 240, 480, 720 e 920 $\mu\text{mol L}^{-1}$).....	24
 CAPÍTULO II MORPHOANATOMY AND PHYSIOLOGY OF <i>Pouteria gardneriana</i> Radlk PLANTLETS GROWN IN VITRO AT VARIATION IN PHOTOSYNTHETIC PHOTON FLUX DENSITIES	
Table 1. Fresh weight (g), dry weight (g), leaf area (cm^2), shoot percentage (%), leaf number and shoot length (cm) of <i>Pouteria gardneriana</i> Radlk cultured in MS 50% for 60 days in medium supplemented with 30 g L^{-1} in sucrose at PPFD of 75, 100 and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	43
Table 2. Chlorophyll <i>a</i> , chlorophyll <i>b</i> , carotenoids, total chlorophyll and pheophytinization index (P.I.) of <i>Pouteria gardneriana</i> Radlk plantlets cultured in MS 50% for 60 days in medium supplemented with 30 g L^{-1} sucrose at PPFD of 75, 100 and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	43
Table 3. Maximum quantum yield (Fv/Fm), photochemical quenching (qP), non-photochemical fluorescence quenching (NPQ), effective quantum yield ($\Delta\text{F}/\text{Fm}'$) and electron transport rate (ETR) in the leaves of <i>Pouteria gardneriana</i> Radlk plantlets cultured in MS 50% for 60 days in medium supplemented with 30 g L^{-1} sucrose at PPFD of 75, 100 and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	44
Table 4. Palisade parenchyma (P.P.), polar diameter (P.D.), equatorial diameter	

(Eq.D.), adaxial (Ad.Ep.T.) and abaxial epidermis thickness (Ab.Ep.T), mesophyll thickness (Me) (μm) and stomatal density (S.D.) in the leaves from *Pouteria gardneriana* Radlk plantlets cultured in MS 50% in for 60 days in medium supplemented with 30 g L^{-1} sucrose at PPFD of 75, 100 and $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 45

CAPÍTULO III PRÉ-CONDICIONAMENTO DE PLÂNTULAS *Pouteria gardneriana* Radlk CULTIVADAS IN VITRO PARA ACLIMATIZAÇÃO

Tabela 1. Comprimento da planta de *Pouteria gardneriana* Radlk (cm), número de raízes, porcentagem de sobrevivência (%), Massa Fresca Caule (mg) e Massa Seca Caule (mg) aos 53 dias de aclimatização em respostas diferentes condições, com raízes, poda parcial na raiz e remoção total das raízes..... 62

Tabela 2. Taxa de transpiração de *Pouteria gardneriana* Radlk (E), condutância estomática (gs), razão C_i/C_a aos 53 dias de aclimatização em respostas diferentes condições, com raízes, poda parcial na raiz e remoção total das raízes..... 63

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Planta matriz de <i>Pouteria gardneriana</i> Radlk, (A), Frutos inseridos na planta (B); Fruto (C); Frutos em corte transversal (D) e sementes. Escala: 2 cm. Os frutos maduros coletados no mês de novembro de 2015, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde (17°48’202”S, 50°54’397”W e 749 m) Rio Verde, 2016.....</p>	04
<p>CAPÍTULO I TOXIDADE DO ALUMÍNIO SOB CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DE PLÂNTULAS DE <i>Pouteria gardneriana</i> Radlk CULTIVADAS <i>IN VITRO</i></p>	
<p>Figura 1- Plântulas de <i>P. gardneriana</i> Radlk cultivadas <i>in vitro</i> em meio MS 50% aos 60 dias suplementado com alumínio (0, 240, 480, 720 e 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Barra: 2 cm.....</p>	22
<p>Figura 2- Comprimento das plântulas de <i>P. gardneriana</i> Radlk (cm) (A), número de folhas (B), área foliar (cm^2) (C) e massa seca total (g) (D), cultivadas <i>in vitro</i> meio MS 50% aos 60 dias suplementado com alumínio (0, 240, 480, 720 e 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$).....</p>	23
<p>Figura 3- Espessura do parênquima paliçádico (A), parênquima esponjoso (B), mesofilo (C), razão do diâmetro polar pelo diâmetro equatorial dos estômatos (D) e densidade estomática (E) de <i>P. gardneriana</i>, cultivadas <i>in vitro</i> meio MS 50% sob diferentes concentrações de alumínio (0, 240, 480, 720 e 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$), por 60 dias.....</p>	25
<p>Figura 4. Alterações anatômicas ocasionadas pelo alumínio em folhas de <i>P. gardneriana</i>. (a) e (b) tratamento controle, (c) e (d) 240 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (e) e (f) 480 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (g) e (h) 720 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (i) e (j) 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Ad ep) epiderme adaxial. (Ab ep) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (SP) parênquima esponjoso. Setas indicam danos os estômatos da fase abaxial da folha.....</p>	27

Figura 5. Fluorescência de secções transversais de caule e folha de *P. gardneriana* cultivada *in vitro*, na ausência de alumínio (A e C) e presença de alumínio 480 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (B e D). Tratado com fluorocromo de Morin..... 28

CAPÍTULO II MORPHOANATOMY AND PHYSIOLOGY OF *Pouteria gardneriana* Radlk PLANTLETS GROWN IN VITRO AT VARIATION IN PHOTOSYNTHETIC PHOTON FLUX DENSITIES

Figure 1. *P. gardneriana* Radlk plantlets growth in MS 50% culture medium supplemented with 30 g L^{-1} of sucrose (A - C) (+ SUC) and in sucrose-free medium (D - F) (- SUC) at PPFD of 75, 100 and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively. Scale bar: 1 cm..... 42

Figure 2. Electron photomicrographs of cross-sectional regions of the leaf (a - c) and the abaxial face surface (d - f) from *Pouteria gardneriana* Radlk cultured in medium supplemented with 30 g L^{-1} of sucrose at PPFD of 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (a and d), 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b and e), and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (c and f). Adaxial epidermis (Ad ep), abaxial epidermis (Ab ep), palisade parenchyma (PP) and spongy parenchyma (SP). Arrows = stomata. Scale bar: 50 μm 46

CAPÍTULO III PRÉ-CONDICIONAMENTO DE PLÂNTULAS *Pouteria gardneriana* Radlk CULTIVADAS IN VITRO PARA ACLIMATIZAÇÃO

Figura 1- Sementes de *Pouteria gardneriana* Radlk. semeadas em bandejas plásticas (A) e plantas com 60 dias (B), mantidas em sala de crescimento. Barra: 4 cm..... 57

Figura 2- Plântulas de *Pouteria gardneriana* Radlk cultivadas *in vitro* com raiz (A e D), poda parcial na raiz com 2cm (B e E) e remoção total das raízes (C e F), transferidas para vasos plásticos, contendo substrato Bioplant®. Barra: 2 cm..... 58

Figura 3. Plântulas de *P. gardneriana* Radlk aclimatizadas em casa de vegetação por 53 dias. Plantas estas oriundas do cultivo *in vitro* com presença raiz (A), poda parcial na raiz (B) e remoção total das raízes (C) que foram transferidas em vasos plásticos, contendo substrato Bioplant®. Barra: 4 cm..... 60

Figura 4- Área foliar de plântulas de *P. gardneriana*, número de folhas e número de segmentos (A), massa fresca folha e massa seca folha (B), área raiz, comprimento maior raiz, número de raiz secundária (C) e massa fresca raiz e massa seca raiz (D), aos 53 dias de aclimatização em resposta a diferentes condições, com raiz, poda parcial na raiz e remoção total das raízes cultivadas *in vitro*. ^zMédias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos não diferem entre si, pelo teste Tukey a 0,05 de probabilidade..... 61

Figura 5- Clorofila *a*, *b*, total e taxa fotossintética (A) de plântulas de *P. gardneriana*, aos 53 dias de aclimatização em resposta a diferentes condições, com raiz, poda parcial na raiz e remoção total das raízes cultivadas *in vitro*. ^zMédias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos não diferem entre si, pelo teste Tukey a 0,05 de probabilidade..... 63

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

Al.....	Alumínio
Al ₂ (SO ₄) ₃	Sulfato de Alumínio
°C.....	Graus Celsius
DIC.....	Delineamento inteiramente ao acaso
MS.....	Murashige & Skoog
NaO Cl.....	Hipoclorito de sódio
pH.....	Potencial de Hidrogênio
g L ⁻¹	Gramas por litro
Mg.....	Miligrama
nm.....	Nanômetro
cm.....	Centímetro
mm ²	Milímetro quadrado
μmol.....	Micromol
μg cm ⁻²	Micrograma por centímetro quadrado
%.....	Porcentagem
I.F.....	Índice de Feofitinação
PAS.....	Reagente de Schiff
PVC.....	Polivinilcloro
XP.....	Xilidine Ponceau
S.....	Sul
W.....	Oeste
Cl.a.....	Clorofila a
Cl.b.....	Clorofila b
CaCO ₃	Carbonato de Cálcio
PPFD.....	Densidades fluxo fótons fotossintéticos
μm.....	Micrômetro
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
P.....	Fósforo
Ca.....	Cálcio
Mg.....	Magnésio
K.....	Potássio
Ab Ep T.....	Espessura da epiderme abaxial
Ad Ep T.....	Espessura da epiderme adaxial
SP.....	Parênquima esponjoso
PP.....	Parênquima paliçádico

Me.....	Mesofilo
S. D.....	Densidade Estomática
Fv/Fm.....	Rendimento quântico máximo fotossistema II
ETR.....	Taxa relativa de transporte de elétrons
NPQ.....	Quenching não fotoquímico
$\Delta F/Fm'$	Taxa relativa de transporte de elétrons
CO ₂	Dióxido de Carbono
DNA.....	Ácido Desoxirribonucléico
ANOVA.....	Análise de variância

RESUMO

LEITE, MARILUZA SILVA, Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde - GO, dezembro de 2016. **Cultura *in vitro* de *Pouteria gardneriana* Radlk: Estudos Anatômicos e Fisiológicos visando a Aclimatização *in situ***. Fabiano Guimarães Silva “Orientador”. Aurélio Rubio Neto e Giselle Camargo Mendes “Coorientadores”.

Pouteria gardneriana Radlk, é uma frutífera nativa do Cerrado com potencial comercial e medicinal. Suas sementes são recalcitrantes, não podendo ser armazenadas, sendo o cultivo *in vitro* alternativa importante para produção de mudas em curto espaço de tempo. Objetivou-se com este trabalho avaliar o cultivo *in vitro* de *Pouteria gardneriana* Radlk, com estudos anatômicos e fisiológicos visando a aclimatização *in situ* a fim de se obter maior produção de mudas. Para tanto, estudou a influência de fatores limitantes ao crescimento *in vitro* da espécie, sendo presença de diferentes concentrações de alumínio (0, 240, 480, 720 e 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$); diferentes densidades de fluxo de fótons fotossintéticos (75, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) com e sem sacarose no meio de cultivo e por fim, a aclimatização das plântulas propagadas *in vitro*. As características biométricas, anatômicas e fisiológicas, foram avaliadas com respostas às condições de cultivo *in vitro* impostas. Verificou-se que o aumento da concentração alumínio foi fator limitante do crescimento das plântulas cultivadas *in vitro*, proporcionando decréscimo do comprimento, número de folhas, área foliar e biomassa, sem ocasionar danos, exceto na concentração de 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$, na qual foi observado alteração na morfologia dos estômatos. A PPFD de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionou maior acúmulo de biomassa e certa adaptabilidade anatômica com a expansão foliar do parênquima paliádico. Plântulas de *P. gardneriana* cultivadas *in vitro* com raízes

foram de grande importância no processo de aclimatização, obtendo taxa média de sobrevivência de 62% e incremento significativo na produção da biomassa da parte aérea e radicular. Assim, a espécie em estudo pode ser cultivada *in vitro* obtendo sucesso na aclimatização, visando produção de mudas em larga escala comercial.

PALAVRAS-CHAVES: Alumínio, cultura de tecidos, guapeva, morfoanatomia.

ABSTRACT

LEITE, MARILUZA SILVA, Goiano Federal Institute - Rio Verde Campus – Goiás State (GO), Brazil, December 2016. ***In vitro* culture of *Pouteria gardneriana* Radlk: Anatomical and Physiological Studies aiming at Acclimatization *in situ*.** Advisor: Silva, Fabiano Guimarães. Co-advisors: Rubio Neto, Aurélio; Mendes, Giselle Camargo.

Pouteria gardneriana Radlk is a native fruit of the Brazilian cerrado (savannah) with commercial and medicinal potential. Its seeds are recalcitrant and cannot be stored, and *in vitro* cultivation is an important alternative to produce seedlings in a short time. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* culture of *Pouteria gardneriana* Radlk, with anatomical and physiological studies aiming at acclimatization *in situ* to obtain higher seedling production. To do so, the influence of limiting factors on species *in vitro* growth was studied, with different aluminum concentrations (0, 240, 480, 720, and 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$), different flow densities of photosynthetic photons (75, 100, and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) with and without sucrose in the culture medium, and, finally, the acclimatization of seedlings propagated *in vitro*. The biometric, anatomical, and physiological characteristics were evaluated with responses to the imposed *in vitro* culture conditions. It was verified that the increased aluminum concentration was a limiting factor for the seedling growth cultured *in vitro*, reducing the length, number of leaves, foliar area, and biomass, without causing damages, except in the concentration of 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$, in which change in stomata morphology was observed. The Photosynthetic Photon Flux Density (PPFD) of 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided greater accumulation of biomass and some anatomical adaptability with the leaf expansion of

the palisade parenchyma. *P. gardneriana* seedlings grown *in vitro* with roots were very important in the acclimatization process, obtaining a mean survival rate of 62% and a significant increase in shoot biomass production. Thus, the species under study can be cultivated *in vitro*, obtaining success in the acclimatization, aiming the seedling production in large commercial scale.

KEYWORDS: Aluminum, tissue culture, guapeva, morphoanatomy.

INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado constitui um imensurável patrimônio de recursos naturais renováveis, sendo a mais rica savana do mundo, com espécies nativas detentoras de características sensoriais peculiares e intensas (Morzelle et al., 2015). Quando comparado a outras savanas, possui maior diversidade de espécies, no entanto sofre ambientalmente com grande pressão antrópica, principalmente da atividade pecuária, exploração extrativista, expansão das fronteiras agrícolas e predatória (Pereira e Pasquaeto, 2011).

As fruteiras nativas do cerrado como *Pouteria gardneriana* Radlk, são fundamentais no ecossistema por serem fonte de alimentos dos animais silvestres e microambiente para várias espécies de insetos (Silva et al., 2001). Para a população, constitui fonte de compostos de alto interesse biotecnológico, contribuindo com as indústrias de forma inovadora, proporcionando desenvolvimento competitivo, sendo destaque tanto na indústria médica quanto na de alimentos, despertando interesse nos consumidores tanto na forma *in natura* quanto como produtos processados, tais como sucos, sorvetes, pães e bolos (Damiani et al., 2011).

O grande desafio atualmente para conservação do cerrado é a escassez na divulgação da importância que a biodiversidade desempenha no funcionamento dos ecossistemas. Muitas espécies nativas são de difícil propagação seminífera e algumas são recalcitrantes, dificultando produção massal de indivíduos, portanto há necessidade produção de mudas visando a conservação e a recuperação de germoplasma ou mesmo cultivo comercial (Klink e Machado, 2005).

A acidez do solo do Cerrado é fator limitante para crescimento das plantas pela combinação de fatores, que incluem a toxidez devido a altas concentrações de metais

pesados como alumínio (Al^{+3}), bem como deficiência de alguns elementos essenciais como cálcio, magnésio, fósforo e molibdênio (Silva et al., 2006). As espécies do Cerrado são tolerantes ou resistentes ao alumínio, pois, sua capacidade de absorção de nutrientes essenciais, o crescimento e reprodução não são prejudicados. De acordo com Haridasan (2008) algumas espécies podem acumular Al^{+3} sendo capazes de imobilizar esse metal em compartimentos celulares ou transportá-los até as folhas, sem causar nenhum efeito tóxico.

São poucos estudos com as plantas frutíferas do cerrado, tornando-se necessário conhecer técnicas que viabilizem produção de mudas de qualidade em curto período de tempo e em escala comercial. A técnica de micropropagação é um método estudado nas mais diversas espécies vegetais, sendo a cultura de tecidos a modalidade que mais tem difundido com aplicações práticas, inovadoras, contribuindo para programas de melhoramento genético e métodos de conservação, por viabilizar a inclusão e manutenção de espécies ameaçadas de extinção em bancos de germoplasma (Keller et al., 2013). Engloba diferentes etapas que vão desde o estabelecimento do cultivo *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da plântula (Bastos et al., 2007).

Plântulas cultivadas *in vitro* não possuem controle adequado de concentrações de CO_2 e O_2 , resultando em teores insuficientes de clorofila para realizar a fotossíntese (Saldanha et al., 2013; Fernandes et al., 2013). Devido a baixa capacidade fotossintética, as plântulas cultivadas *in vitro* têm caráter heterotrófico ou fotomixotrófico, pois as fontes de carbono, nutrientes e energia encontram-se disponíveis no meio de cultivo (Hartmann et al., 2011; Brondani et al., 2012; Greenway et al., 2012;).

O sucesso da cultura de tecidos consiste na capacidade da plântula produzida *in vitro* (heterotróficas) ser transferida para condições *ex vitro* (autotróficas) com reduzido custo, visando altas taxas de sobrevivência (Erig e Schuch, 2005; Hazarika, 2006). Essa transferência para as condições *ex vitro* depende de fatores que garantam a manutenção mecânica do sistema radicular, a estabilidade da plântula, o suprimento de água e nutrientes e as trocas gasosas entre a parte aérea, raízes e o ar atmosférico (Wagner Júnior et al., 2012).

Mudas micropropagadas necessitam de um período de aclimatização, após a retirada do ambiente *in vitro*, permitindo sua sobrevivência nas condições de cultivo em viveiros, permanecendo em recipientes com substratos até atingir o porte ideal para o

transplântio no campo (Barboza et al., 2006; Nomura et al., 2008). Em laborat3rios que produzem milhares de plântulas micropropagadas regularmente, a otimizaç3o da fase de aclimatizaç3o 3 de fundamental importânciã para evitar perdas excessivas das plântulas, bem como favorecer seu crescimento, chegando ao setor produtivo, de forma mais econ3mica (Oliveira et al., 2008). 3 justamente na etapa da aclimatizaç3o que se viabiliza a metodologia de produç3o *in vitro*, pois 3 nela que se obt3m o n3mero de plântulas aptas ao plantio, ou seja, maior sobreviv3ncia de mudas com qualidade (Correia et al., 2012).

Neste trabalho, avaliou-se cultivo *in vitro* de *P. gardneriana*, utilizando meios autotr3ficos e heterotr3ficos, alum3nio, PPFd e aclimatizaç3o de forma que proporcione maior efici3ncia na produç3o de mudas tanto *in vitro* quanto *in situ*, visando maior retorno econ3mico com reduç3o troca de meios, maior produç3o de mudas em larga escala comercial e de alta qualidade.

2. REVIS3O DE LITERATURA

2.1. Caracter3sticas gerais da esp3cie *Pouteria gardneriana* Radlk

A guapeva (*Pouteria gardneriana* Radlk) estã entre as esp3cies do cerrado brasileiro especificamente na regi3o centro-oeste. Pertence à fam3lia Sapotaceae, cujos nomes populares s3o p3ssego-do-campo e cabo-de-machado, planta de porte arb3reo (4 a 8 m de altura) (Figura 1 A), com espessura do caule com 0,8 m de diâmetro. A produç3o dos frutos inicia-se no per3odo de novembro a fevereiro, produzindo cerca de 300 a 1.000 frutos por 3rvore (Figura 1 B e C).

Os frutos possuem dimens3es que variam de 4 a 5 cm de comprimento e de diâmetro. Cada fruto possui peso de 50 a 80 g, possui polpa esbranquiçã, podendo produzir cerca de 1 a 4 sementes por fruto (Figura 1 D). As sementes t3m caracter3sticas de esp3cies recalcitrante (Cabral et al., 2013), e 100 sementes equivalem em m3dia 1/2 kg (Figura 1 E). O fruto da guapeva tem aproveitamento alimentar, a polpa pode ser consumida *in natura*. Os frutos devem ser partidos e lavados em 3gua corrente para retirada do látex (Vieira et al., 2006; Rocha et al., 2011).

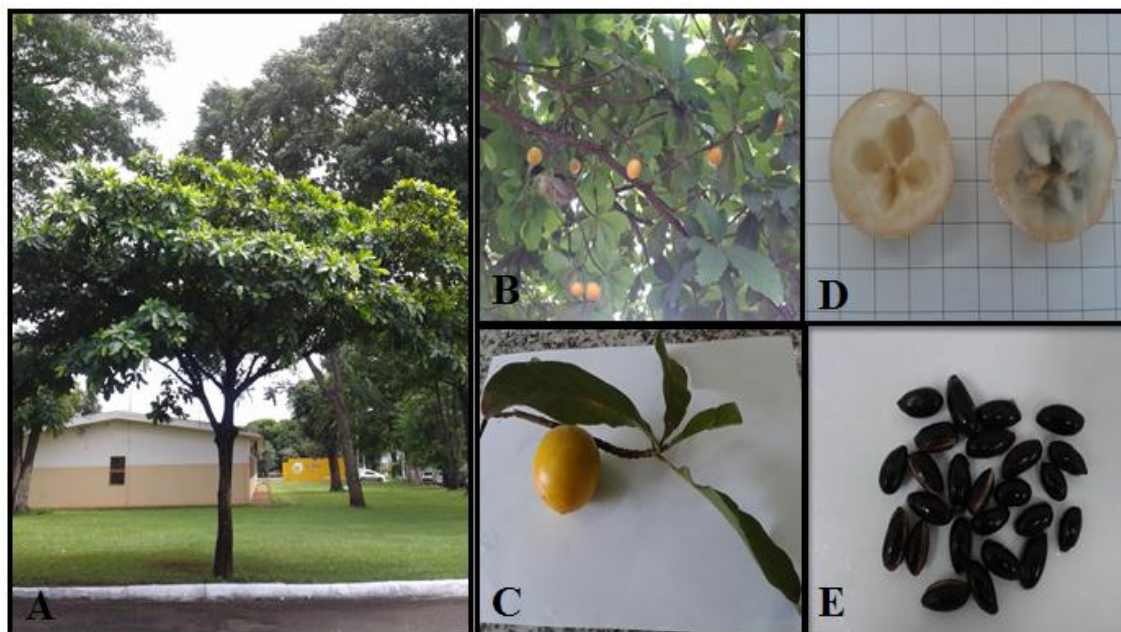


Figura 1. Planta matriz de *Pouteria gardneriana* Radlk, (A), Frutos inseridos na planta (B); Fruto (C); Frutos em corte transversal (D) e sementes. Escala: 2 cm. Os frutos maduros coletados no mês de novembro de 2015, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde (17°48'202"S, 50°54'397"W e 749 m) Rio Verde, 2016.

A *P. gardneriana* possui características ornamentais úteis para arborização. Seus frutos servem de alimento para as espécies da fauna local, sendo considerada importante em plantios para recuperação de áreas degradadas e de preservação permanente (Lorenzi, 1992; Almeida et al., 1998). Muitas espécies de frutas nativas são conhecidas e utilizadas pela população tradicional que vive no cerrado. Entretanto, seu uso restringe-se, ainda, ao usuário local e de forma essencialmente extrativista (Franzon, 2009).

Estudos realizados com guapeva mostraram elevados teores de compostos fenólicos totais e taninos condensados (Rocha et al., 2011). A grande importância destes compostos é a influência no sabor, escurecimento enzimático, assim como, no potencial nutricional e funcional dos frutos. Além disso, estes compostos atuam na proteção dos frutos, conferindo alta resistência a microrganismos e pragas. Estudos relacionam fenólicos e taninos com a inibição do risco das doenças cardiovasculares e podem atuar sobre o estresse oxidativo, relacionado com diversas patologias crônico-degenerativas, como o diabetes, o câncer e processos inflamatórios (Everette et al., 2010; Malta et al., 2013).

Algumas espécies da família Sapotaceae do gênero *Pouteria* estão sendo estudadas, porém trabalhos no cultivo *in vitro* ainda são incipientes. Sendo caracterização de metabólitos primários e secundários, atividade potencial eliminação dos radicais, composição carotenoides, aplicação de nanopartículas controlada de extrato etanólico, produção de plântulas em diferentes substratos, potencial antimicrobiano e citotóxico, composição do óleo da semente, potencial, fracionamento e comportamento térmico, qualidade fisiológica das sementes durante armazenamento (Tabela 1).

Tabela 1- Principais estudos da família Sapotaceae do gênero *Pouteria*, publicados no período de 2012 a 2016 (dados obtidos na Web of Science e Sciencedirect).

Espécie	Título	Parte da Planta	Referências
<i>P. lucuma</i> Ruiz & Pav	Characterization of main primary and secondary metabolites and <i>in vitro</i> antioxidant and antihyperglycemic properties in the mesocarp of three biotypes <i>P. lucuma</i>	Fruto	Fuentealba et al. (2016)
<i>P. caimito</i> (Ruiz & Pav) Radlk	Potential radical-scavenging activity of <i>Pouteria caimito</i> leaves extracts	Folha	França et al. (2016)
<i>P. sapota</i> Jacq.	Carotenoid Composition of the Fruit of Red Mamey (<i>Pouteria sapota</i>)	Fruto	Murillo et al. (2016)
<i>P. gardneriana</i> Radlk.	Application of polymeric nanoparticles for controlled release of ethanolic extract of guapeva leaves (<i>Pouteria gardneriana</i> Radlk) against <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> through <i>in vitro</i> studies	Folha	Barbosa et al. (2016)
<i>P. gardneriana</i> Radlk.	Production of <i>Pouteria gardneriana</i> (A. DC.) Radlk. seedlings on different substrates	Planta	Mota et al. (2015)
<i>P. venosa</i> Mart.	Estudo do potencial antimicrobiano e citotóxico da espécie <i>Pouteria venosa</i> (Sapotaceae)	Folha e Caule	Santos et al. (2015)
<i>P. sapota</i> Jacq.	Mamey sapote seed oil (<i>Pouteria sapota</i>). Potential, composition, fractionation and thermal behavior	Semente	Solís-Fuentes et al. (2015)
<i>P. gardneriana</i> Radlk.	Physiological quality of guapeva (<i>Pouteria gardneriana</i> Radlk.) seeds during storage.	Semente	Cabral et al., (2013)

2.2. Cultura de Tecidos e Micropropagação Fotoautotrófica

As plântulas cultivadas *in vitro* em sistema heterotrófico (tradicional), são mantidas em sala de crescimento com temperatura e umidade controlada, sob baixa irradiância, com uso de regulador de crescimento e fonte carboidratos exógenos disponíveis no meio de cultivo (sacarose) como única fonte de energia para o vegetal (Kozai et al., 2005). Portanto, precisam ativar os aparatos fotossintéticos durante a aclimatização, pois estas têm baixa atividade fotossintética, podendo causar perdas de explantes e aumentar os custos do processo. Este sistema heterotrófico resulta em alterações morfológicas e funcionamento irregular de estômatos, baixa taxa de crescimento, morte prematura de explantes, dificultando o enraizamento (Kozai e Kubota, 2001; Bandeira et al., 2007; Damiani e Schuch, 2009;).

Dentre as práticas fotoautotróficas que têm sido testadas cita-se a eliminação total ou parcial da sacarose do meio de cultivo (Xiao e Kozai, 2006); o aumento da concentração de CO₂ (Saldanha et al., 2013; Saldanha et al., 2014), redução da umidade relativa e da concentração de etileno do frasco de cultivo utilizando vedações que permitem maiores trocas gasosas (Saldanha et al., 2012), e o aumento da intensidade luminosa (Sáez et al., 2012; Assis et al., 2016).

No sistema fotoautotrófico a intensidade e a qualidade da luz são fatores fundamentais que interferem na morfologia e fisiologia das plântulas (Fukuda et al., 2008; Li e Kubota, 2009). Quando a intensidade luminosa estiver alta pode reduzir a eficiência fotossintética devido a não capacidade do aparato fotossintético em dissipar o excesso, assim, pode ocorrer fotoinibição e danos nos centros de reação dos fotossistema (Fan et al., 2013), sendo prejudicial para a planta.

2.3. Intensidade luminosa na cultura *in vitro*

A luz é um dos mais importantes requerimentos para o crescimento e desenvolvimento da planta. Plantas crescidas sob diferentes PPFD demonstram diferenças morfológicas, fotossintéticas e metabólicas (Dai et al., 2009). Em geral, plantas que crescem em ambiente de condições ótimas de luz possuem desenvolvimento normal, quando comparado a plantas que crescem em ambientes com baixa ou alta irradiância. Plantas crescidas em baixas PPFD possuem baixa capacidade fotossintética, baixa taxa de assimilação de CO₂. Em contrapartida, plantas as quais crescem em ambiente com altas irradiâncias, podem causar danos no Fotossistema II (PSII) e queda da fotossíntese (Guo et al., 2006).

Apesar da importância ecológica e economicamente das frutíferas nativas do Cerrado, pouco se sabe a respeito das condições de crescimento desta espécie. Estudos que visam o conhecimento da PPFd ótima para o desenvolvimento anatômico e fisiológico de plântulas de *P. gardneriana* cultivadas *in vitro* é de extrema relevância e podem auxiliar na obtenção de mudas de alta qualidade, favorecendo o sucesso da aclimatização desta espécie e na produção de mudas em larga escala.

2.4. Tolerância à toxicidade do Alumínio

A baixa fertilidade dos solos do Cerrado é um problema complexo quando se trata da presença de Al^{+3} em solução com concentrações tóxicas, que prejudicam o desenvolvimento das plantas. O alumínio é constituinte das partículas de argila no solo, ocorrendo a migração para fração trocável ou para solução em solos com pH abaixo de 5,0 (Rampim e Lana, 2013). A concentração final de alumínio é encontrada naturalmente nos solos ácidos ($0 - 350 \mu\text{mol L}^{-1}$) podendo em casos especiais, atingir $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Adams e Moore, 1983).

A tolerância ao alumínio é uma característica que confere adaptação das plantas em ambientes adversos, em solos ácidos, é um dos principais responsáveis pela baixa produtividade das culturas, constituindo fator limitante ao crescimento das plantas. Com relação às alterações na parte aérea, acredita-se que a toxicidade por alumínio provoca alterações fisiológicas e reduções significativas no número de folhas, na área foliar, na altura e diâmetro do caule (Delhaize et al., 2012).

É importante ressaltar que na maioria das espécies ocorrem vários mecanismos de tolerância ao Al^{+3} , sejam estes internos e/ou externos, principalmente se for comprovado existir blocos gênicos envolvidos na tolerância. Com isto, é possível compreender o fato das espécies possuírem níveis de tolerância ao Al^{+3} , pois conforme aumenta a concentração de Al^{+3} no solo reduz-se a tolerância das plantas, ou seja, ocorre saturação dos mecanismos de tolerância, iniciando o processo de toxidez às plantas (Rampim e Lana, 2013).

2.5. Aclimatização

Processo pelo qual as plântulas produzidas *in vitro* (heterotrófica) são transferidas para um ambiente *ex vitro* (autotrófica) sendo, portanto, expostas a redução de umidade relativa, temperaturas, baixa PPFd, a fim de sobreviver em condições naturais de campo (Xiao et al., 2011). As plântulas cultivadas *in vitro* quando

aclimatizadas passam de um estado com alta disponibilidade nutricional para uma condição autotrófica e, portanto, precisam formar raízes rapidamente, para absorver os nutrientes necessários à sua sobrevivência (Fernandes et al., 2015).

O sucesso da aclimatização depende em parte do porte de crescimento das plantas, sendo a formação radicular característica considerada essencial. Para algumas espécies há necessidade de estimular o enraizamento *in vitro*, como exemplo para espécie *Miconia ligustroides* (DC) Naudim (Prudente et al., 2016) e *Calophyllum brasiliense* (Cambess.) (Silveira et al., 2016) que utilizou reguladores de crescimento, aumentando os custos na produção.

O enraizamento *in vitro* sem uso de regulador de crescimento representa uma vantagem econômica, pois reflete na imediata redução de custos, prática visada na automação da micropropagação. Formação de raízes *in vitro* em meio de cultivo sem reguladores de crescimento provavelmente ocorre pelo acúmulo de auxinas endógenas provenientes de folhas e principalmente de gemas formadas nas brotações regeneradas, resultando em aumento da atividade metabólica do tecido e, conseqüentemente translocação de auxina endógena para as raízes (Vieira et al., 2014).

Diante da necessidade de produção de mudas de *Pouteria gardneriana* Radlk., e em virtude da inexistência de trabalhos utilizando a micropropagação para a espécie, faz-se necessário o estudo das técnicas de cultura de tecidos para que se torne viável a sua multiplicação vegetativa em escala comercial e sua aclimatização.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, F., Moore, B. L. (1983). Chemical factors affecting root growth in subsoil horizons of coastal plain soils. *Soil Science Society of America Journal*, v. 47, n.1, p. 99-102.

Almeida, S. D., Proença, C. E. B., Sano, S. M., Ribeiro, J. F. (1998). Cerrado: espécies vegetais úteis. *Planaltina: Embrapa-CPAC*, v. 464.

Assis, E. S., Rubio Neto, A., Lima, L. R., Silva, F. G., Rosa, M., Vasconcelos Filho, S. C. Leite, M. S. (2016). *In vitro* culture of *Mouriri elliptica* (Mart.) under conditions that stimulate photoautotrophic behavior. *Australian Journal of Crop Science*, v. 10, n. 2, p. 229-236.

Bandeira, F. S., Xavier, A., Otoni, W. C., Lani, E. R. G. (2007). *Ex vitro* acclimatization of plants propagated by *in vitro* grafting of *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* clones. *Revista Árvore*, v. 31, n. 5, p. 773-781.

Barbosa, P. F. P., Mendonça, P. P., Andrade, R. D. A., Aguiar, A. C. R., Chaves, A. R., Costa, A. B., Silva, F. G. (2016). Application of polymeric nanoparticles for controlled release of ethanolic extract of guapeva leaves (*Pouteria gardneriana* Radlk) against *Rhizophagus (Boophilus) microplus* through *in vitro* studies. *African Journal of Biotechnology*, v. 15, n. 49, p. 2778-2786.

Barboza, S. B. S. C., Graciano-Ribeiro, D., Teixeira, J. B., Portes, T. A., Souza, L. A. C. (2006). Leaf anatomy of micropropagated pineapple plants. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 2, p. 185-194.

Bastos, L. P., Moreira, M. J. S., Costa, M. A. P. C., Rocha, M. C., Hansen, D. S., Silva, S. A., Dantas, A. C. V. L., Sousa, C. S. (2007). Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, supl. 2, p. 1122-1124.

Brondani, G. E., de Wit Ondas, H. W., Baccarin, F. J. B., Gonçalves, A. N., Almeida, M. (2012). Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 48, n. 5, p. 478-487.

Cabral, J. S. R., Sales, J. F., Silva, F. G., Branquinho, A. C., Oliveira, R. C. (2013). Physiological quality of guapeva (*Pouteria gardneriana* Radlk.) seeds during storage. *Global Science and Technology*, v. 6, n.1, p. 127-133.

Correia, D., Araujo, J. D. M., Nascimento, E. H. S. D. O., Silva Júnior, J. M. T. D., Bessa, M. C. (2012). Otimização da Produção de Mudanças de *Cattleya labiata*: Efeito da Sacarose no Crescimento *In Vitro* e na Aclimatização. Circular Técnica 38, Embrapa.

Dai, Y., Shen, Z., Liu, Y., Wang, L., Hannaway, D. Lu, H. (2009). Effects of shade treatments on the photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence and chlorophyll content of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg. *Environmental and Experimental Botany*, v. 65, n. 2-3, p. 177-182

Damiani, C., Boas, V., Barros, E. V., Asquieri, E. R., Lage, M. E., Oliveira, R. A., Silva, F.A., Pinto, D.M., Rodrigues, L.J., Silva, E.P., Paula, N. R. F. (2011). Characterization of fruits from the savanna: Araça (*Psidium guinnensis* Sw.) and Marolo (*Annona crassiflora* Mart.). *Food Science and Technology*, v. 31, n. 3, p. 723-729.

Damiani, C. R., Schuch, M. W. (2009). Enraizamento *in vitro* de mirtilo em condições fotoautotróficas. *Ciência Rural*, v. 39, n. 4, p. 1012-1017.

Delhaize, E., Ryan, P. R., James, R. A. (2012). Aluminium tolerance of root hairs underlies genotypic differences in rhizosheath size of wheat (*Triticum aestivum*) grown on acid soil. *Journal New Phytol*, v. 195, n. 3, p. 609-619.

Erige, A. C., Schuch, M. W. (2005). Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. *Scientia Agrária*, v. 6, n. 2, p. 91-96.

Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 14, p. 8139-8144.

Fan, X. X., Xua, Z. G., Liu, X. I., Tang, C. M., Wang L. W., Han, X. L. (2013). Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under a combination of red and blue light. *Scientia Horticulturae*, v. 153, n. 4, p. 50–55.

Fernandes, D. Á., Martinez, D. T., Costa, R. B. (2015). Sacarose e ácido indolbutírico no enraizamento de *Tectona grandis* L.f. *Revista de Agricultura*, v. 90, n.1, p.87-99.

Fernandes, D. Á., de Azevedo, P. H., da Costa, R. B., Brondani, G. E. (2013). Tipos de vedação e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Tectona grandis* L. f. *Revista de Agricultura*, v. 88, n. 3, p.218-228.

França, C. V., Perfeito, J. P. S., Resck, I. S., Gomes, S. M., Fagg, C. W., Castro, C. F. S., Simeoni, L. A., Silveira, D. (2016). Potential radical-scavenging activity of *Pouteria caimito* leaves extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 6, n. 7, p. 184-188.

Franzon, R. C. Fruteiras nativas do Cerrado têm potencial para exploração. Embrapa Cerrados, 2009. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/131/>>. Acesso em: 16 nov. 2009.

Fuentealba, C., Gálvez, L., Cobos, A., Olaeta, J. A., Defilippi, B. G., Chirinos, R., Campos, D., Pedreschi, R. (2016). Characterization of main primary and secondary metabolites and *in vitro* antioxidant and antihyperglycemic properties in the mesocarp of three biotypes of *Pouteria lucuma*. *Food chemistry*, v. 190, n.1, p. 403-411.

Fukuda, N., Fujita, M., Ohta, Y., Sase, S., Nishimura, S., Ezura, H. (2008). Directional blue light irradiation triggers epidermal cell elongation of abaxial side resulting in inhibition of leaf epinasty in geranium under red light condition. *Scientia Horticulturae.*, v. 115, n. 2, p. 176-182.

Greenway, M. B., Phillips, I. C., Lloyd, M. N., Hubstenberger, J. F. Phillips, G. C. (2012). A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 48, n. 4, p. 403-410.

Guo, Y. P., Guo, D. P., Zhou, H. F., Hu, M. J., Shen, Y. G. (2006). Photoinhibition and xanthophyll cycle activity in bayberry (*Myrica rubra*) leaves induced by high irradiance. *Photosynthetica*, v. 44, n. 3, p. 439-446

Haridasan, M. (2008). Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 20, n. 3, p. 183-195.

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies JR, F. T., Geneve, R. L. (2011). Plant propagation: principles and practices. 8th ed. *Prentice-Hall*, p. 915.

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

Keller, E. J., Zanke, C. D., Senula, A., Breuing, A., Hardeweg, B., Winkelmann, T. (2013). Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm in genebanks. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 60, n. 3, p. 913-926.

Klink, C. A., Machado, R. B. (2005). A Conservação do Cerrado. *Megadiversidade*, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 147-155.

Kozai, T., Afreen, F., Zobayed, S. M. A. (2005). Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. Netherlands: Springer, 316 p.

Kozai, T., Kubota, C. (2001). Developing a Photoautotrophic Micropropagation System for Woody Plants. *Journal of Plant Research*, v. 114, n. 4, p. 525-537.

Li, Q., Kubota, C. (2009). Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. *Environmental and Experimental Botany*, v. 67, n. 1, p. 59-64.

Lorenzi, H. (1992). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. *Nova Odessa*, Plantarum, 252 p.

Malta, L. G., Tessaro, E. P., Eberlin, M., Pastore, G. M, Liu, R. H. (2013). Assessment of antioxidante and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. *Food Research International*, v. 53, n. 1, p. 417-425.

Morzelle, M. C., Bachiega, P., Souza, E. C., Vilas Boas, E. V. B., Lamounier, M. L. (2015). Caracterização química e física de frutos de curriola, gabioba e murici provenientes do Cerrado brasileiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 37, n. 1, p. 96-103.

Mota, C. S., Dornelles, P., Silva, F. G., Silva, S. J., Graças, J. S., Costa, E. S. (2015). Production of *Pouteria gardneriana* (A. DC.) Radlk. seedlings on different substrates. *African Journal of Agricultural Research*, v. 10, n. 30, p. 2961-2967.

Murillo, E., Turcsi, E., Szabo, I., Mosquera, Y., Agócs, A., Nagy, V., Gulyas, G., Deli, J. (2016). Carotenoid Composition of the Fruit of Red Mamey (*Pouteria sapota*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, n. 38, p. 1-25.

Nomura, E. S., Lima, J. D., Garcia, V. A., Rodrigues, D. S. (2008). Crescimento de mudas micropropagadas da bananeira cv. Nanicão, em diferentes substratos e fontes de fertilizante. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 30, n. 3, p. 359-363.

Oliveira, J. P., Costa, F. H. S., Pereira, J. E. S. (2008). Growth of micropropagated banana plantlets acclimatized on conditions of South West Amazon under the influence of different substrates and recipients. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30, n. 2, p. 459-465.

Pereira, M. E., Pasqualetto, A. (2011). Desenvolvimento sustentável com ênfase em frutíferas do Cerrado. *Studos*, v. 38, n. 2, p. 333-363.

Prudente, D. O., Nery, F. C., Paica, R., Reis, M. V., Paiva, P. D. O., Nery, M. C. (2016). Cultivo *in vitro* de *Miconia ligustroides* (D.C.) Naudim. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, v. 12, n. 1, p. 13-19.

Rampim, L., Lana, M. C. (2013). Mecanismo de tolerância interna das plantas ao alumínio. *Colloquium Agrariae*, v. 9, n. 2, p. 72-89.

Rocha, W. S., Lopes, R. M., Silva, D. B. D., Vieira, R. F., Silva, J. P. D., Agostini-Costa, T. D. S. (2011). Total phenolics and condensed tannins in native fruits from brazilian savanna. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 4, p. 1215-1221.

Sáez, P. L., Bravo, L. A., Latsague, M. I., Sánchez, M. E., Ríos, D. G. (2012). Increased light intensity during *in vitro* culture improves water loss control and photosynthetic performance of *Castanea sativa* grown in ventilated vessels. *Scientia Horticulturae*, v. 138, n. 1, p. 7-16.

Saldanha, C. W., Otoni, C. G., Rocha, D. I., Cavatte, P. C., Detmann, K. S. C., Tanaka, F. A. O., Dias, L. L. C., Damatta, F. M., Otoni, W. C. (2014). CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 118, n. 1, p. 87-99.

Saldanha, C. W., Otoni, C. G., Notini, M. M., Kuki, K. N., Cruz, A. C. F., Rubio Neto, A., Dias, L. C., Otoni, C. (2013). A CO₂-enriched atmosphere improves *in vitro* growth

of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v. 49, n. 4, p. 433–444.

Saldanha, C. W., Otoni, C. G., de Azevedo, J. L. F., Dias, L. L. C., do Rêgo, M. M., Otoni, W. C. (2012). A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 110, n. 3, p. 413-422.

Santos, R. F. E. P., Silva, I. S. M., Veríssimo, R. C. S. S., Lúcio, I. M. L., Campesatto, E. A., Conserva, L. M., Bastos, M. L. A. (2015). Study of antimicrobial and cytotoxic potential of *Pouteria venosa* species (Sapotaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 3, p. 367-373.

Silva, C. E., Gonçalves, J. F. D. C., Feldpausch, T. R., Luizão, F. J., Morais, R. R., Ribeiro, G. O. (2006). Eficiência no uso dos nutrientes por espécies pioneiras crescidas em pastagens degradadas na Amazônia central. *Acta Amazônica*, v. 36, n. 4, p. 503-512.

Silva, D. B., Silva, A. S., Junqueira, N. T. V., Andrade, L. R. M. (2001). Frutas do Cerrado. Embrapa Informação Tecnológica, 178 p.

Silveira, S. S., Cordeiro-Silva, R., Degenhardt-Goldbach, J., Quoirin, M. (2016). Micropropagation of *Calophyllum brasiliense* (Cambess.) from nodal segments. *Brazilian Journal of Biology*, v. 76, n. 3, p. 656-663.

Solís-Fuentes, J. A., Ayala-Tirado, R. C., Fernández-Suárez, A. D., Durán-de-Bazúa, M. C. (2015). Mamey sapote seed oil (*Pouteria sapota*). Potential, composition, fractionation and thermal behavior. *Grasas y Aceites*, v. 66, n. 1, p. 1-10.

Vieira, R. L. Silva, A. L. D., Zaffari, G. R., Feltrim, A. L. (2014). *In vitro* morphogenesis of garlic plants: The role of growth regulators in bulb induction and development. *Ciência Rural*, v. 44, n. 3, p. 439-445.

Vieira, R. F., Agostini-Costa, T., Silva, D. B., Ferreira, F. R., Sano, S. M. (2006). *Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 320 p.

Wagner Júnior, A., Franzon, R. C., Couto, M., Conceição, P. C., Fortes, G. R. L. (2012). Níveis de vermiculita em mistura de substrato na aclimatização de plantas de amoreira-preta “Tupy”. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 18, n. 2-4, p. 188-195.

Xiao, Y., Niu, G., Kozai, T. (2011). Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 105, n. 2, p. 149–158.

Xiao, Y., Kozai, T. (2006). *In vitro* multiplication of statice plantlets using sugar-free media. *Scientia Horticulturae*, v. 109, n. 1, p. 71–77.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o cultivo *in vitro* de *Pouteria gardneriana* Radlk, com estudos morfoanatômicos e fisiológicos avaliando a presença do alumínio, diferentes (PPFD) Densidades de Fluxo de Fótons Fotossintéticos visando a aclimatização a fim de se obter maior produção de mudas. Para atingir o objetivo geral, foram realizados os ensaios descritos em três capítulos:

Capítulo I- Objetivo específico: Avaliar a influência do alumínio (Al^{+3}) no crescimento e nas características anatômicas e fisiológicas de plântulas de *P. gardneriana* Radlk cultivadas *in vitro*.

Capítulo II- Objetivo específico: Analisar o crescimento, comportamento anatômico e fisiológico de *P. gardneriana* cultivadas *in vitro* em condições fotoautotróficas.

Capítulo III- Objetivo específico: Verificar o efeito do sistema radicular das plântulas de *P. gardneriana* estabelecidas *in vitro* na aclimatização e sobrevivência das mesmas.

CAPÍTULO I

TOXIDADE DO ALUMÍNIO SOB CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DE PLÂNTULAS DE *Pouteria gardneriana* Radlk CULTIVADAS *IN VITRO*

RESUMO: O alumínio (Al) é o metal mais abundante na crosta terrestre, afetando o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Algumas espécies do Cerrado são tolerantes a esse metal não sofrendo com presença de Al^{+3} ou até mesmo são denominadas acumuladoras sendo capazes de imobilizar esse metal em compartimentos celulares e também de transportar o Al^{+3} das raízes até as folhas. Objetivou-se avaliar a toxicidade do alumínio (Al^{+3}) sob características morfoanatômicas e fisiológicas de plântulas de *P. gardneriana* Radlk cultivadas *in vitro*. Foram estabelecidos segmentos nodais em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio MS 50% de sais em diferentes concentrações de sulfato de alumínio [$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$] (0, 240, 480, 720 e 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com pH ajustado para 4,0. As unidades experimentais foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância média de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As avaliações foram realizadas aos 60 dias de cultivo. Observou-se que o alumínio no meio de cultivo limitou o crescimento das plântulas, pois, maior comprimento (5,33 cm), número de folhas (4,01), área foliar (37,62 cm^2) e massa seca total (0,58 g) foram obtidos na sua ausência. Notou-se expansão do parênquima paliçádico (140,1 μm) e esponjoso (331,4 μm) com o aumento na concentração de Al^{+3} para 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$, resultando em maior espessura do mesofilo (468,5 μm). Na ausência de Al^{+3} as plântulas possuíram densidade estomática correspondente a 339,64 estômatos/ mm^2 , enquanto na maior concentração de Al^{+3} , a densidade estomática foi de 188,94 estômatos/ mm^2 . Além disso, notou-se que razão do

diâmetro polar pelo equatorial dos estômatos reduziu à medida que aumentou a concentração de Al^{+3} , característica que representa morfologia circular dos estômatos, relacionada a menor funcionalidade dos mesmos no processo de trocas gasosas. A espécie *P. gardneriana* possui relativa tolerância à presença de Al^{+3} no meio de cultivo, no qual o crescimento foi limitado, sem danos fisiológicos aparentes.

Palavras-Chave: Frutífera nativa, Sapotaceae, tolerância ao alumínio.

INTRODUÇÃO

O Alumínio (Al) é o terceiro elemento mais abundante da crosta terrestre. Sob condições ácidas, o íon Al^{3+} é dominante na solução do solo e, prontamente absorvido pelas plantas, provocando toxidade em espécies sensíveis (George et al., 2012). É crescente o interesse de pesquisadores em identificar plantas tolerantes a esse cátion na perspectiva de melhorar a produtividade das plantas cultivadas (Crestani et al., 2011; Dethaize et al., 2012) ou ainda compreensão da ocorrência natural das plantas nestes solos (Rodrigues et al., 2016).

Espécies vegetais nativas do cerrado, como *Stenocalyx dysentericus* (DC.) O. Berg. são tolerantes e/ou resistentes ao alumínio, pois, sua capacidade de absorção de nutrientes essenciais, crescimento e desenvolvimento não são prejudicados (Rodrigues et al., 2016). Um mecanismo eficiente para impedir a toxidade do Al^{+3} nas plantas é a formação de um revestimento das raízes com compostos orgânicos aderidos aos pelos radiculares, impedindo a absorção do mesmo (Delhaize et al., 2012). As plantas, ao invés de excluir o Al^{+3} , o absorve e acumulam-no em seus tecidos, como folhas, sementes (Haridasan, 2008) e raízes, caracterizando um mecanismo interno de desintoxicação (Rodrigues et al., 2016).

São realizados principalmente estudos com crescimento radicular, características morfoanatômica das raízes (Delhaize et al., 2012; Rodrigues et al., 2016; Souza et al., 2016) e ainda estudos de rotas de sinalização nas raízes para expressão de genes de tolerância ou resistência ao Al^{+3} (Nunes-Nesi et al., 2014). Atenção se dá às raízes das plantas, devido ao sítio da toxidade do Al^{+3} está localizado no ápice da raiz, no qual interfere nos processos de divisão e alongamento celular (Ryan et al., 1993). No entanto, é notável o efeito de toxidade deste cátion no desenvolvimento da parte aérea das plantas, como formação de brotos (Schuch et al., 2010). Assim, identificar nas

plantas características, sejam elas relacionadas ao crescimento, anatômicas ou fisiológicas de tolerância ao Al^{+3} é de suma importância.

Pouteria gardneriana Radlk é conhecida popularmente por guapeva, pêssegodo-campo e cabo-de-machado, pertence à família Sapotaceae e ocorre naturalmente em domínio cerrado. Os frutos maduros são utilizados, *in natura*, ou processados para a produção de doces, sucos, geleias e licores (Silva et al., 2001; Rocha et al., 2011). Por possuir habito arbóreo, e copa fechada, a *P. gardneriana* Radlk constitui recurso potencial para ser utilizada na arborização urbana. No entanto, trabalhos científicos com a espécie são raros, dificultando o conhecimento da mesma. Em relação a tolerância ao Al^{+3} , estudos para esta espécie, são inexistentes até o momento.

A técnica de cultivo *in vitro* torna-se eficiente para avaliar o nível de tolerância das plantas de *P. gardneriana* Radlk ao alumínio, visto o controle que pode ser realizado na intensidade luminosa, luz e temperatura do ambiente de cultivo, além, do ambiente ser asséptico e meio de cultivo nutritivo, que sustenta o crescimento da planta (Zhang et al., 2009; Jesus et al., 2011). Assim, objetivou-se avaliar a toxicidade do alumínio (Al^{+3}) sob características morfoanatômicas e fisiológicas de plântulas de *P. gardneriana* Radlk cultivadas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

Os frutos maduros de *P. gardneriana* Radlk foram coletados no mês de novembro de 2015, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde (Latitude 17°48'202''S, Longitude 50°54'397''W e Altitude 749 m).

Assim que coletados, os frutos foram despulpados para a retirada da mucilagem. Para tanto, as sementes foram imersas em solução de hidróxido de sódio a 5% por 5 minutos e em seguidas lavadas em água corrente sob peneira de malha de 7 mm, realizando esfregão até total despolpa.

Foram semeadas 100 sementes por bandejas plásticas (53x37x8 cm), germinadas em substrato areia grossa lavada e peneirada. As mesmas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura média de 25 ± 3 °C, fotoperíodo de 16 horas, até a obtenção das plântulas. O controle fitossanitário das plântulas foi realizado com pulverizações de solução fungicida sistêmica de Derosal[®] a 0,2% do produto comercial 24 horas antes da inoculação das plântulas *in vitro*. As plântulas foram ferti-irrigadas a

cada 15 dias com solução nutritiva composta por 50% dos sais do meio MS (Murashige e Skoog, 1962).

Estabelecimento *in vitro* e condições experimentais

Para o estabelecimento *in vitro*, utilizou-se segmentos nodais com 2 cm de comprimento e com uma gema axilar. Os segmentos foram revestidos por gaze e lavados em água corrente por 15 min. Em seguida foram submetidos aos métodos de assepsia na câmara de fluxo laminar. Os explantes foram imersos em álcool 70% por 1 minuto, e em solução a 20% de hipoclorito de sódio - NaOCl (água sanitária comercial – 2,5% de cloro ativo) por 20 minutos e enxaguados por três vezes com água estéril.

Após a desinfestação, os explantes foram cultivados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 20 mL de meio MS, na concentração 50% dos sais, 30 g L⁻¹ de sacarose, com incremento de 2 g de carvão ativado e solidificado com 3,5 g L⁻¹ de ágar (Marca Dinâmica[®]). O meio de cultivo foi suplementado com sulfato de alumínio [Al₂(SO₄)₃] nas seguintes concentrações (0, 240, 480, 720 e 960 µmol L⁻¹) com pH ajustado a 4,0 para aumentar a disponibilidade do Al⁺³ na solução.

O meio de cultivo foi autoclavado a 121°C e a pressão de 1,05 kgcm⁻², durante 20 minutos. Os tubos de ensaio contendo os explantes foram vedados, utilizando vedafilme PVC (polivinilcloreto) e mantidos em sala de crescimento por 60 dias, aos 30 dias houve transferência de recipiente, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 3°C e radiação fotossintética ativa de 45-55 µmol m⁻²s⁻¹.

Análises biométricas

As avaliações biométricas foram feitas após 60 dias de cultivo *in vitro*, por meio das características de comprimento das plântulas (cm), número de folhas, área foliar (cm²), massa seca total (g). As medidas de comprimento foram obtidas com régua milimétrica. A área foliar foi obtida a partir da integração das imagens em *Software ImageJ*[®] (Rasband, W. S.; U. S. ImageJ. Bethesda, Md, USA). A massa seca total foi determinadas em balança analítica digital, e após a secagem do material em estufa de ventilação forçada à temperatura de 65 °C por 72 horas até a obtenção do peso constante.

Determinação do conteúdo de clorofila

Os teores de pigmentos de clorofilas *a*, *b* e carotenoides, clorofila total, razão *cl.a/cl.b* e índice feofitinação foram determinados segundo Costa et al. (2014) com adaptações na metodologia. Os três discos foliares (5 mm de diâmetro) foram incubados em frascos vedados e envolvidos com papel alumínio contendo 5 mL de DMSO saturado com carbonato de cálcio - CaCO₃ (50 g L⁻¹) por 24 horas a 50°C em banho-maria. Posteriormente a absorvância do extrato foi determinada por meio de um espectrofotômetro UV-VIS modelo Evolution 60S (Thermo Fischer Scientific, Madison – USA). Os comprimentos de onda, as equações e cálculos para a determinação do conteúdo de pigmentos foram baseados no trabalho de Wellburn (1994).

Caracterização anatômica

As análises anatômicas das folhas de *P. gardneriana* foram realizadas por dois métodos. O primeiro deles foi o processo de diafanização o qual analisa a superfície do tecido, e o segundo foi a fixação e inclusão em historesina para a obtenção dos cortes transversais.

Na diafanização, as folhas foram imersas em hidróxido de sódio 5% por 24 horas, clarificadas com Cloral hidratado 1:6:1 (p/v) por mais 24 horas e coradas com safranina 1% em etanol 50% (Arnott, 1959). Com o estudo da superfície foliar classificou as folhas de *P. gardneriana* quanto à localização dos estômatos, morfologia estomática, densidade estomática, razão do diâmetro polar pelo equatorial dos estômatos.

A fixação das folhas foi feita em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 48 horas. Em seguida, as folhas foram desidratadas em série etílica crescente, pré-infiltradas e infiltradas com historesina (Historesin Leica, Erviegas Ltda: São Paulo- SP, Brasil), para obtenção de blocos de historesina com material vegetal incluso. Após secagem dos blocos em sílica gel, o material foi seccionado transversalmente a 5 µm de espessura, em micrótomo rotativo (modelo RM 2155, Leica). Os cortes obtidos foram corados com azul de toluidina 0,05% pH 4,0 (O'Brien et al., 1964) para avaliação da espessura parênquima paliçádico, parênquima esponjoso, espessura da epiderme de ambas as faces da folha e espessura do mesofilo.

Plântulas de *P. gardneriana* cultivadas em meio com ausência e presença (480 µmol L⁻¹) Al⁺³ foram utilizadas para identificar a localização do Al⁺³ no caule e nas

folhas, para isso utilizou-se fluorocromo de Morin, na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ durante 30 minutos (Eticha et al., 2005).

As imagens foram capturadas utilizando o microscópio óptico (modelo BX61, Olympus) com sistema U-photo e para fluorescência com uma câmara DP-72. As medidas micromorfométricas foram obtidas a partir da integração das imagens em *software* de análise de imagens (ImageJ[®]).

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso (DIC), sendo cinco concentrações de sulfato de alumínio [$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$] ($0, 240, 480, 720$ e $960 \mu\text{mol L}^{-1}$) com 24 repetições, cada repetição constituída por um tubo de ensaio, totalizando 120 unidades experimentais. Os dados numéricos foram submetidos a análise de variância aplicando-se o teste F, quando necessário ajuste de regressão e Tukey. O programa utilizado para análise dos dados foi *software* SISVAR (Ferreira, 2011).

RESULTADOS

Plântulas de *P. gardneriana* após 60 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes concentrações de alumínio

Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, notou-se diferença no crescimento da parte aérea das plântulas de *P. gardneriana*, em resposta as diferentes concentrações de alumínio (Figura 1). Notou-se que a ausência de raízes não dificultou a avaliação do efeito das diferentes concentrações de alumínio sobre as características em estudo.

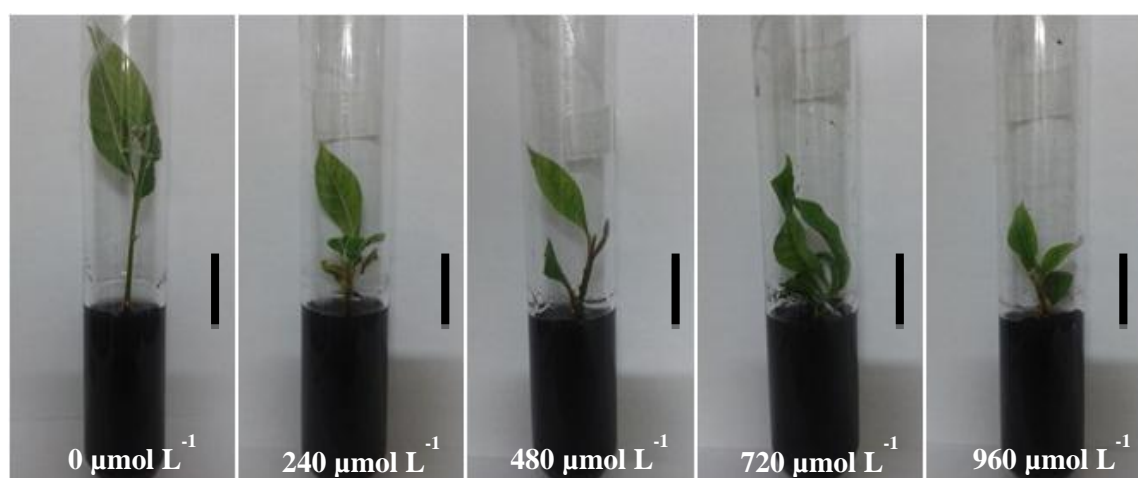


Figura 1- Plântulas de *P. gardneriana* Radlk cultivadas *in vitro* em meio MS 50% aos 60 dias suplementado com alumínio ($0, 240, 480, 720$ e $960 \mu\text{mol L}^{-1}$). Barra: 2 cm.

O meio de cultivo desprovido de alumínio proporcionou obtenção de plântulas com médias superiores para o comprimento das plântulas (5,33 cm), número de folhas (4,01), área foliar (37,62 cm²) e massa seca total (0,58 g) (Figura 2A - D). Notou-se decréscimo de 39,27; 38,36; 61,41 e 57,49% no comprimento da plântula, número de folhas, área foliar e massa seca total das plântulas com a adição de 960 μmol L⁻¹ de Al⁺³ ao meio de cultivo, respectivamente (Figura 2 A, B, C e D). Resultado este que configura ao Al⁺³ menor crescimento das plântulas de *P. gardneriana* Radlk *in vitro*.

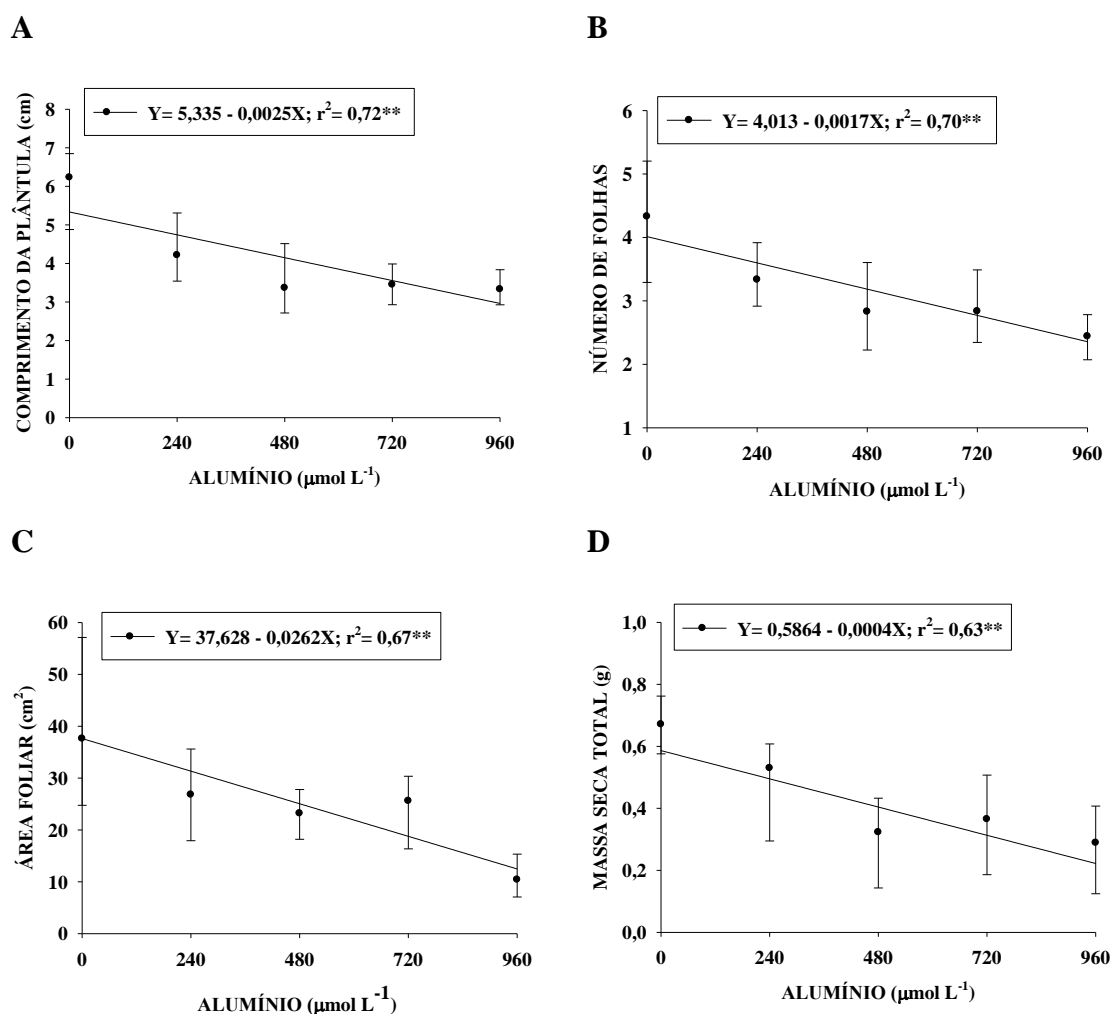


Figura 2- Comprimento das plântulas de *P. gardneriana* (cm) (A), número de folhas (B), área foliar (cm²) (C) e massa seca total (g) (D), cultivadas *in vitro* aos 60 dias em meio MS 50%, suplementado com alumínio (0, 240, 480, 720 e 960 μmol L⁻¹).

As características relacionadas à qualidade fisiológica das plantas, teores de Cl.a, Cl.b, carotenoides, clorofila total, razão Cl.a/Cl.b e índice feofitinação não foram alteradas com a adição de Al no meio de cultivo, atingindo valor médio de 29,9; 14,6; 5,8; 44,6; 2,12 e 1,31 μg cm⁻², respectivamente (Tabela 1). Percebe-se que o Al⁺³ no

meio de cultivo, nas concentrações em estudo, não ocasionaram danos estruturais nas folhas, sendo fator importante para conservação das plantas *in vitro*.

Tabela 1- Clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides, clorofila total, razão Cl.*a*/Cl.*b* e índice feofitinação (I.F.) de plântulas de *P. Gardneriana* Radlk, cultivadas *in vitro* aos 60 dias em meio MS 50%, suplementado com alumínio (0, 240, 480, 720 e 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

[Alumínio] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Características Fisiológicas					
	Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Clorofila <i>b</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Carotenoide ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Cl.total ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Cl. <i>a</i> /Cl. <i>b</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Í.F. (A_{435}/A_{415})
0	29,9 ± 6,50 ^{NS}	14,1 ± 1,71	6,8 ± 1,28	50,3 ± 8,15	2,5 ± 0,21	1,3 ± 0,01
240	27,6 ± 4,79	13,4 ± 1,63	5,9 ± 0,76	41,1 ± 6,31	2,0 ± 0,16	1,2 ± 0,05
480	28,7 ± 3,53	14,7 ± 0,22	5,6 ± 0,59	43,5 ± 3,74	1,9 ± 0,21	1,3 ± 0,03
720	30,2 ± 3,89	19,7 ± 6,00	4,9 ± 1,32	49,9 ± 8,55	1,7 ± 0,33	1,3 ± 0,03
960	26,8 ± 2,91	11,2 ± 0,77	5,6 ± 0,49	38,1 ± 3,65	2,3 ± 0,12	1,3 ± 0,02

^{NS} Não significativo pelo teste de F. ± Erro padrão da média.

Características Anatômicas: Micromorfométrica

Com o aumento da concentração de Al^{+3} houve incremento na espessura do parênquima paliádico e esponjoso. Para estas características os valores passaram de 80,04 e 198,45 μm em meio de cultivo desprovido de Al^{+3} para 140,1 e 331,4 μm na concentração de 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$ resultando em aumento na espessura do mesofilo (468,5 μm). Os aumentos na espessura representaram 74,35; 66,76 e 63,27% para parênquima paliádico e esponjoso, e, mesofilo, respectivamente (Figura 3A – C). Para razão diâmetro polar e equatorial dos estômatos, observou-se comportamento quadrático dos dados, no qual valor máximo de 2,57 foi obtido em meio de cultivo com 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Al^{+3} , concentrações de Al^{+3} acima deste valor ocasiona decréscimo nos valores para esta variável (Figura 3D).

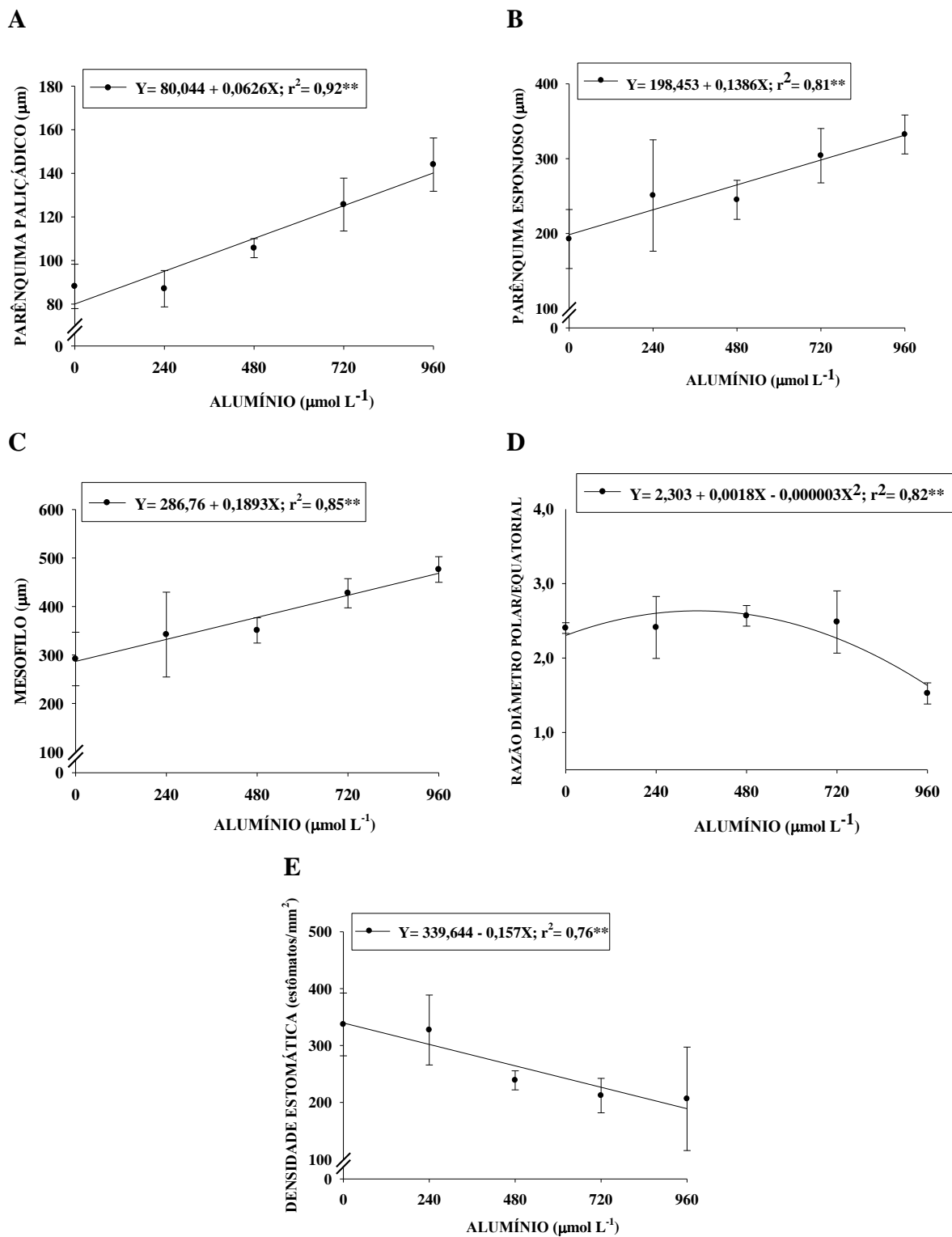


Figura 3- Espessura do parênquima paliçádico de *P. gardneriana* (A), parênquima esponjoso (B), mesofilo (C), razão do diâmetro polar pelo diâmetro equatorial dos estômatos (D) e densidade estomática (E) cultivadas *in vitro* meio MS 50% aos 60 dias, suplementado com alumínio (0, 240, 480, 720 e 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Folhas das plântulas cultivadas na ausência de Al^{+3} possuíram densidade estomática de 339,64 estômatos/ mm^2 , enquanto na maior concentração de Al^{+3} (960 $\mu mol L^{-1}$), a densidade estomática foi de 188,94 estômatos/ mm^2 (Figura 3E). Esse decréscimo representa 44,37%, sendo este, um dos fatores que ocasionaram limitação no crescimento das plantas, pois, os estômatos são responsáveis pelas trocas gasosas, importante processo para fixação de biomassa. Não se observou influência das concentrações de Al^{+3} nas características espessura epiderme adaxial e abaxial, sendo as médias 34,83 e 38,29 μm , respectivamente (Dados não apresentados).

Características anatômicas

A epiderme de ambas as faces da folha de *P. gardneriana* foi unisseriada, constituída por células de formato retangular com parede periclinal externa plana ou levemente convexa nas diferentes concentrações de alumínio 0, 240, 480, 720 e 960 $\mu mol L^{-1}$ (Figura 4). A organização do mesofilo foi heterogênea do tipo dorsiventral, com parênquima paliçádico constituído por células colunares com sinuosidades da parede celular, configurando espaços entre as células. O parênquima esponjoso estratificado foi constituído por células poliédricas e isodiamétricas, caracterizando o tecido (Figura 4 A).

Independente da concentração de Al^{+3} identificou-se a presença de estômatos somente na face abaxial das folhas, caracterizando-a como hipoestomática (Figura 4 B). Em relação à organização das células subsidiárias, os estômatos foram classificados como anisocíticos. O formato predominante dos estômatos foi elipsoide entre as concentrações de 0 a 720 $\mu mol L^{-1}$ (Figura 4 B, D, F e H). Já as folhas cultivadas em meio com 960 $\mu mol L^{-1}$, de Al^{+3} demonstrou alteração na organização das células guardas dos estômatos, exibindo morfologia atípica (Figura 4 J).

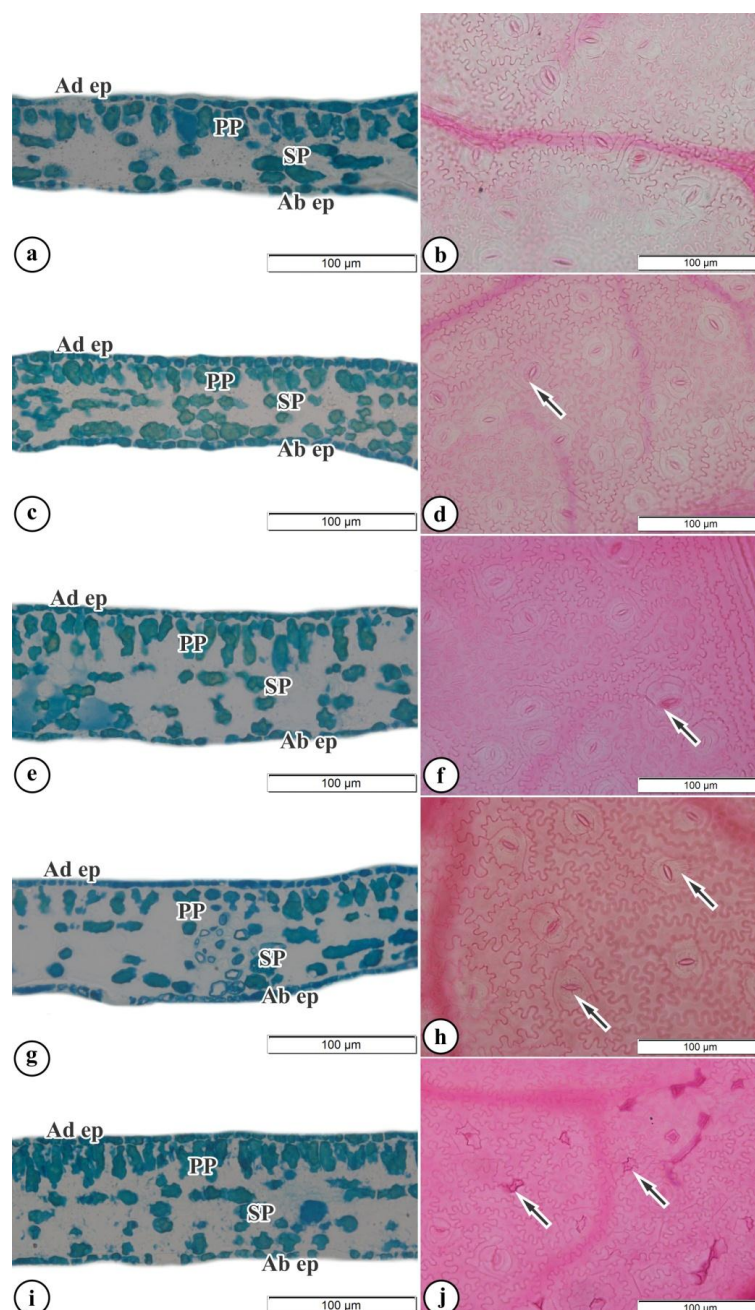


Figura 4. Alterações anatômicas ocasionadas pelo alumínio em folhas de *P. gardneriana*. (a) e (b) controle, (c) e (d) $240 \mu\text{mol L}^{-1}$, (e) e (f) $480 \mu\text{mol L}^{-1}$, (g) e (h) $720 \mu\text{mol L}^{-1}$, (i) e (j) $960 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Ad ep) epiderme adaxial. (Ab ep) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (SP) parênquima esponjoso. Setas indicam os estômatos da fase abaxial da folha.

O teste foi negativo para presença de Al^{+3} com reagente de Morin em caule e folhas cultivadas em meio desprovido do cátion Al^{+3} (Figura 5 A e C). As plântulas cultivadas com adição de $480 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Al^{+3} no meio teve acúmulo de Al^{+3} na parede celular e no citoplasma das células de caule e folhas. Resultados observados por meio

da fluorescência secundária de cor esverdeada emitida pelo fluorocromo Morin em contato com cátions no tecido (Figura 5 B e D).

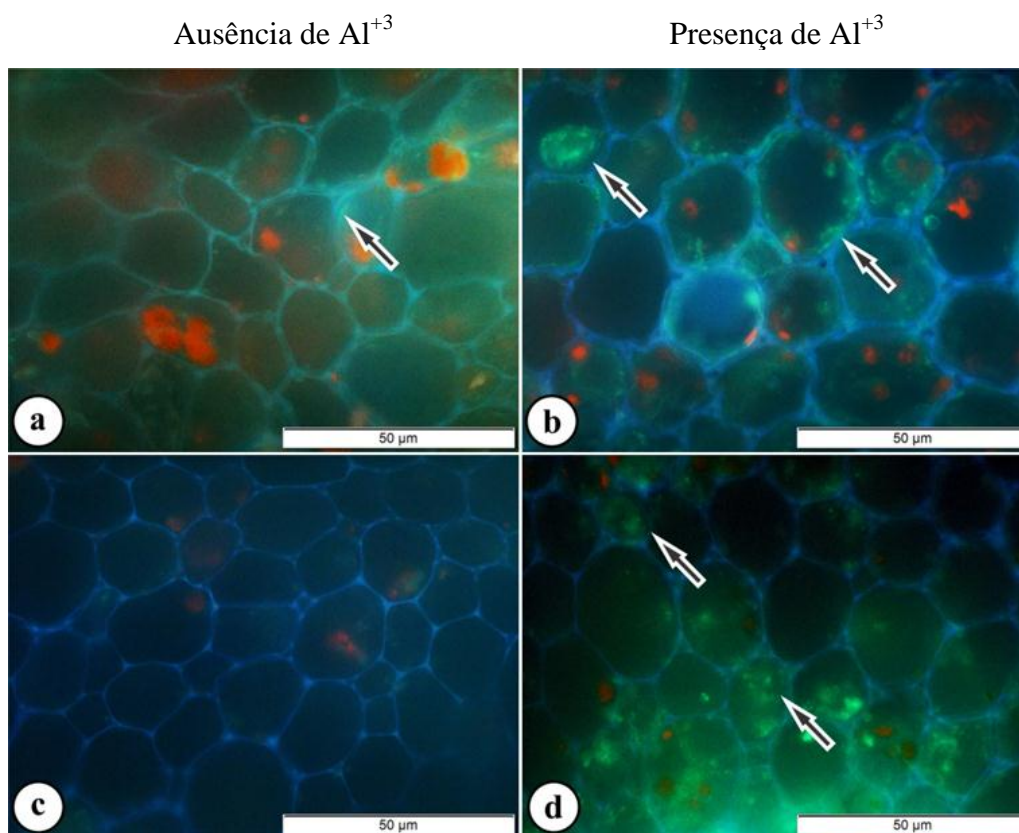


Figura 5. Fluorescência de secções transversais de caule e folha de *P. gardneriana* cultivada *in vitro*, na ausência de alumínio (A e C) e presença de alumínio $480 \mu\text{mol L}^{-1}$ (B e D). Tratado com fluorocromo de Morin.

DISCUSSÃO

Os resultados observados nesse estudo demonstraram que o Al^{+3} causou efeitos adversos em *P. gardneriana* cultivada *in vitro*. A utilização de Al^{+3} no meio de cultivo limitou o crescimento das plântulas e conseqüentemente diminuiu as trocas periódicas do meio de cultivo, tornando a técnica menos onerosa. O aumento da concentração Al^{+3} foi fator limitante do crescimento das plantas (Gupta et. al., 2013), proporcionou decréscimo do comprimento, número de folhas, área foliar e biomassa das plantas, sem ocasionar danos, exceto na concentração de $960 \mu\text{mol L}^{-1}$, na qual foi observado alteração na morfologia dos estômatos, conforme observado (Figura 4 J).

Notou-se que as plantas de *P. gardneriana* possuem certa tolerância ao Al^{+3} , pois, os parâmetros fisiológicos, teores de clorofilas *a*, *b* e carotenoides, clorofila total e índice feofitinação não foram afetados pela presença Al^{+3} no meio. De acordo com

Andrade et al. (2011) estudos com *Vochysiaceae* mostrou mecanismos de acúmulo desse elemento nas folhas sem causar danos as organelas, indicando que futuros estudos deverão ser desenvolvidos sobre possível interação do alumínio com parte fisiológica da espécie.

Estudos relatam na maioria das vezes, toxicidade do Al^{+3} nas plantas. De acordo com Li e Xing (2011) observaram alterações ultraestruturais no mesofilo foliar de *Arabidopsis* relacionados com a produção de espécies reativas de oxigênio e induziu a morte celular programada pela toxicidade do Al^{+3} . Identificou-se na condição *in vitro* suplementado com $960 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Al^{+3} foi imprópria para cultivo de *P. gardneriana*. Nesta concentração de Al^{+3} , as alterações morfoanatômicas observadas na estrutura estomática foram nítidas, e pode comprometer o funcionamento normal dos estômatos nas trocas gasosas e assim interferir na sobrevivência das plantas.

As espécies nativas do cerrado vêm sendo citadas como tolerantes ao alumínio. Para espécie *Stenocalyx dysentericus* (DC) O. Berg, nas concentrações de 150, 300 e $600 \mu\text{M}$ de Al^{+3} , demonstrou ser tolerante ao alumínio, promovendo crescimento radicular, indicando que as espécies do cerrado são adaptadas a solos mesmo em altas concentrações de Al^{+3} (Rodrigues et al., 2016).

Os resultados do presente estudo demonstraram que o Al^{+3} causou efeitos adversos em *P. gardneriana* cultivada *in vitro*, como menor crescimento, diminuição da parte aérea uma vez que as plantas não possuem raízes, indicando que o efeito do Al^{+3} não está restrito ao sistema radicular, podendo também estar relacionado com a parte aérea. Diante disso, verificou-se que o aumento na concentração de Al^{+3} reduziu na parte aérea, massa seca total, área foliar, porém na parte anatômica, como resposta ao estresse houve maior espessura mesofilo, parênquima paliçádico e esponjoso.

A ação fitotóxica do Al^{+3} é um fenômeno que afeta as estruturas da parte aérea. As modificações ocorrem nas membranas celulares com inibição da síntese do DNA, levando à paralisação da divisão e alongamento das células, prejudicando, por consequência do desenvolvimento dos tecidos aéreos do vegetal (Hartwig et al., 2007).

As espécies *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L, desenvolveram mudanças na espessura de tecidos do mesofilo foliar para possibilitar melhor plasticidade as diferentes condições de estresse. Esse incremento das células do parênquima são alterações que ocorram na tentativa de contornar estresse que pode ter ocorrido (Melo et al., 2007). Quando a densidade estomática é reduzida pode favorecer parcialmente o crescimento da planta e adaptação sob algum estresse (Ouyang et al.,

2010; Orsini et al., 2012). No presente trabalho observou-se que a densidade estomática foi reduzida enquanto as células do mesofilo se expandiram como forma de adaptação e resistência ao Al^{+3} .

Esse resultado demonstra que o cátion Al^{+3} foi absorvido pela base do caule das plântulas e translocado até as folhas, onde foi acumulado sem ocasionar danos estruturais ou fisiológicos na concentração de $480\mu\text{mol L}^{-1}$. A absorção e translocação de Al^{+3} nas plantas ainda é pouco compreendida (Malta et al., 2016). O Al^{+3} pode ser um íon livre transportado via xilema (Poschenrieder et al., 2015) ou complexado por ácidos orgânicos como citrato, malato e oxalato (Grevenstuk e Romano, 2013). A presença do Al^{+3} no caule e nas folhas pode ser indícios de possível acumulação do elemento na planta (Bressan et al., 2016).

As alterações estruturais identificadas nas características de crescimento e anatômicas, não reduziram a capacidade fotossintética das mesmas, visto que características fisiológicas não diferiram entre si em relação diferentes concentrações de alumínio no meio de cultivo. Apesar de ter observado que a espécie de *P. gardneriana* tem relativa tolerância ao Al^{+3} , há necessidade de novos estudos avaliando influência do Al^{+3} com macro e micronutrientes presentes no meio e a relação com efeito tóxico, relacionando-se com estresse oxidativo.

CONCLUSÃO

O incremento do meio de cultivo com Al^{+3} inibiu o crescimento das plântulas *P. gardneriana* cultivada *in vitro*, alterando negativamente a anatomia foliar, causando danos estomáticos, sendo prejudicial para o crescimento *in vitro*. Embora tenha verificado danos anatômicos, resultados já esperados, não se observou variação nos teores de pigmentos cloroplastídicos. Futuros trabalhos com alumínio serão estabelecidos *in vitro* enfatizando os resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

Andrade, L. R. M., Barros, L. M. G., Echevarria, G. F., Amaral, L. V., Gotta, M. G., Rossato, D. R., Haridasan, M., Franco, A. C. (2011). Al-hyperaccumulator vochysiaceae from the brazilian cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. *Environmental and Experimental Botany*, v. 70, n. 1, p. 37-42.

Arnott, H. J. (1959). Leaf clearings. *Turtox News*, v. 37, n. 8, p. 192-194.

Bressan, A. C. G., Coan, A. I., Habermann, G. (2016). X-ray spectra in SEM and staining with chrome azurol S show Al deposits in leaf tissues of Al-accumulating and non-accumulating plants from the cerrado. *Plant and Soil*. v. 404. p. 293-306.

Costa, A. C., Rosa, M., Megguer, C. A., Silva, F. G., Pereira, F. D., Otoni, W. C. (2014). A reliable methodology for assessing the *in vitro* photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marruboides* and *Hancornia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 117, n. 3, p. 443-454.

Crestani, M., Silva, J. A. G., Tessmann, E. W., Silveira, S. F. S., Norberg, R., Ribeiro, G., Carvalho, F. I. F., Oliveira, A. C. (2011). Protocolos para seleção quanto à tolerância ao alumínio em aveia sob cultivo hidropônico. *Revista Brasileira Agrociência*, v. 17, n. 3-4, p. 311-320.

Delhaize, E., James, R. A., Ryan, P. R. (2012). Aluminium tolerance of root hairs underlies genotypic differences in rhizosphere size of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown on acid soil. *New Phytologist*, v. 195, n. 3, p. 609-619.

Eticha, D., Stass, A., Horst, W. J. (2005). Localization of aluminium in the maize root apex: can morin detect cell wall-bound aluminium? *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 415, p. 1351-1357.

Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, n. 6, p.1039-1042.

George, E., Horst, W. J., Neumann, E. (2012). Adaptation of plants to adverse chemical soil conditions. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, v. 3, n.s.n, p. 409-472.

Grevenstuck, T., Romano, A. (2013). Aluminium speciation and internal detoxification mechanisms in plants: where do we stand? *Metallomics*, v. 5, n. 12, p. 1584–1594.

Gupta, N., Gaurav, S. S., Kumar, A. (2013). Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a review. *American Journal of Plant Sciences*, v. 2013, n. 4, p. 21-37.

Haridasan, M. (2008). Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acidic soils. *Journal of plant Physiology*, v. 20, n. 3, p. 183-195.

Hartwig, I., Oliveira, A. C., Carvalho, F. I. F., Bertan, I., Silva, J. A. G., Schmidt, D. A. M., Valério, I. P., Maia, L. C., Fonseca, D. A. R., Reis, C. E. S. (2007). Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 28, n. 2, p. 219-228.

Jesus, A. M. S., Villa, F., Lara, A. C. C., Pasqual, M. (2011). Avaliação do efeito das concentrações de sacarose e dos estádios de desenvolvimento do fruto no cultivo *in vitro* de embriões de frutos de cafeeiro. *Revista Ceres*, v. 58, n. 6, p. 679-684.

Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v. 27, n. 2, p. 137-138.

Li, Z., Xing, D. (2011). Mechanistic study of mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminium phytotoxicity using fluorescence techniques. *Journal of experimental botany*, v. 62, n. 1, p. 331-343.

Malta, P. G., Arcanjo-Silva, S., Ribeiro, C., Campos, N. V., Azevedo, A. A. (2016). *Rudgea viburnoides* (Rubiaceae) overcomes the low soil fertility of the Brazilian Cerrado and hyperaccumulates aluminum in cell walls and chloroplasts. *Plant and Soil*, v. 408, n. 1, p. 369-384.

Melo, H. C., Castro, E. M., Soares, A. M., Melo, L. A., Alves, J. D. (2007). Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. *Hoehnea*, v. 34, n.2, p. 145-153.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497.

Nunes-Nesi, A., Brito, D. S., Inostroza-Blancheteau, C., Fernie, A. R., Araújo, W. L. (2014). The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. *Trends in Plant Science*, v. 19, n. 6, p. 399-407.

O'Brien, T. P., Feder, N., McCully, M. E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, v. 59, n. 2, p. 368-373.

Orsini, F., Alnayef, M., Bona, S., Maggio, A., Gianquinto, G. (2012). Low Stomatal density and reduced transpiration facilitate strawberry adaptation to salinity. *Environmental and Experimental Botany*, v. 81, n. 1, p.1-10.

Ouyang, S. Q., Liu, Y. F., Liu, P., Lei, G., He, S. J., Ma, B., Zhang, W. K., Zhang, J. S., Chen, S. Y. (2010). Receptor-like kinase OsSIK1 improves drought and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) plants. *The Plant Journal*, v. 62, n. 2, p. 316–329.

Poschenrieder, C., Tolrà, R., Hajiboland, R., Arroyave, C., Barceló, J. (2015). Mechanisms of hyper-resistance and hyper-tolerance to aluminum in plants. In: Aluminum stress adaptation in plants. *Springer International Publishing*, v. 24, n. s.n, p. 81–98.

Rocha, W. S., Lopes, R. M., Silva, D. B., Vieira, R. F., Silva, J. P., Agostini-Costa, T. S. (2011). Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 4, p. 1215-1221.

Rodrigues, A. A., Vasconcelos Filho, S. C., Rodrigues, D. A., Rodrigues, C. L., Sales, J. F., Vital, R. G. (2016). Influence of aluminum on root growth and anatomy of *Stenocalyx dysentericus* (D C.) O. Berg. *African Journal of Biotechnology*, v. 15, n. 24, p. 1193-1200.

Ryan, P. R., Josep, M. D., Kochian, L. V. (1993). Aluminium toxicity in roots: investigation of spatial sensitivity and the role of root cap. *Journal of Experimental Botany*, v. 44, n. 259, p. 437-446.

Schuch, M. W., Cellini, A., Masia, A., Mariano, G. (2010). Aluminum-induced effects on growth, morphogenesis and oxidative stress reactions *in vitro* cultures of quince. *Scientia Horticulturae*, v. 125, n. 2, p. 151-158.

Silva, D. B., Silva, A. S., Junqueira, N. T. V., Andrade, L. R. M. (2001). Frutas do Cerrado. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 178 p.

Souza, L. T., Cambraia, J., Ribeiro, C., Oliveira, J. A., Silva, L. C. (2016). Effects of aluminum on the elongation and external morphology of root tips in two maize genotypes. *Bragantia*, v. 75, n. 1, p. 19-25.

Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, v. 144, n. 3, p. 307-313.

Zhang, M., Zhao, D., Ma, Z., Li, X., Xiao, Y. (2009). Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. *HortScience*, v. 44, n. 3, p. 757-763.

CAPÍTULO II

MORPHOANATOMY AND PHYSIOLOGY OF *Pouteria gardneriana* Radlk PLANTLETS GROWN *IN VITRO* AT VARIATION IN PHOTOSYNTHETIC PHOTON FLUX DENSITIES

MORPHOANATOMY AND PHYSIOLOGY OF GUAPEVA PLANTLETS

MORFOANATOMIA E FISILOGIA DE PLÂNTULAS DE *Pouteria gardneriana* Radlk, CULTIVADAS *IN VITRO* SOB DIFERENTES DENSIDADES DE FLUXO DE FÓTONS FOTOSSINTÉTICOS

MORFOANATOMIA E FISILOGIA DE PLÂNTULAS DE GUAPEVA

(Normas de acordo com Revista Acta Scientiarum Agronomy- Artigo aceito para
publicação)

ABSTRACT. Micropropagation is an important tool for the multiplication of native cerrado species. However, understanding the responses of these species under *in vitro* culture conditions is still incipient. Thus, the present study aimed to analyze the growth, anatomical behavior and physiology of *Pouteria gardneriana* cultivated *in vitro* under photoautotrophic conditions. Nodal segments were cultured at Photosynthetic Photon Flux Densities (PPFD) of 75, 100 and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and in culture medium MS 50% solidified with 3.5 g L⁻¹ of agar and 2.0 g L⁻¹ of activated charcoal added, in the absence and presence of 30 g L⁻¹ of sucrose. After 60 days of *in vitro* culture, the *P. gardneriana* plantlets only regenerated when sucrose was present in the culture medium. Higher fresh and dry weights, higher palisade parenchyma thickness and larger stomatal polar

and equatorial diameters were observed in the plantlets cultured at the PPF_D 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. PPF_D difference used in the present study was sufficient for understanding the behavior of this species *in vitro*.

Keywords: Cerrado, photoautotrophism, Sapotaceae.

RESUMO. A micropropagação constitui ferramenta importante para multiplicação de espécies nativas do cerrado. No entanto, o conhecimento sobre as respostas destas espécies sob condições de cultivo *in vitro* ainda é incipiente. Assim, objetivou-se com este trabalho, analisar o crescimento, comportamento anatômico e fisiológico de *Pouteria gardneriana* cultivadas *in vitro* em condições fotoautotróficas. Os segmentos nodais foram cultivados nas densidades de fluxo de fótons fotossintéticos de 75, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e meio de cultivo MS 50% solidificado com 3.5 g L⁻¹ de ágar e 2.0 g L⁻¹ de carvão ativado, na ausência e presença de 30 g L⁻¹ de sacarose. Após 60 dias de cultivo *in vitro* observou-se regeneração de plântulas de *P. gardneriana* apenas quando a sacarose estava presente no meio de cultivo. Maior massa fresca e seca, maior espessura do parênquima paliçádico e diâmetro polar e equatorial foram observadas nas plântulas cultivadas no PPF_D de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As diferentes PPF_D utilizadas neste estudo foram suficientes para compreender o comportamento desta espécie *in vitro*.

Palavras-chave: Cerrado, fotoautotrófismo, Sapotaceae.

INTRODUCTION

Guapeva (*Pouteria gardneriana* Radlk) is a native Cerrado tree species belonging to the family Sapotaceae, which is known in Brazil as 'pêssego-do-campo' and 'cabo-de-machado'. These plants have economic importance, as the fruits either are used raw or are processed by the population for the production of desserts, juices, jellie and liqueurs (Vieira, Agostini-Costa, Silva, Ferreira & Sano, 2006; Rocha et al., 2011). *P. gardneriana* seeds have been described as recalcitrant, a characteristic that limits their storage (Cabral, Sales, Silva, Branquinho & Oliveira, 2013) and compromises species conservation. Given these factors, plant tissue culture is a viable tool to mass produce plantlets, benefiting reforestation programs or commercial cultivations.

Traditional *in vitro* culture comprises plants management in a growth room at low photosynthetic photon flux densities (PPFD) and low gas exchange, with sucrose

use as the metabolic energy source for the explants to sustain their growth (Jesus, Villa, Lara & Pasqual, 2011; Zhang, Zhao, Ma, Li & Xiao, 2009). Plantlets cultured in this system demonstrate heterotrophic character, with low capacity to perform photosynthesis and consequently low survival during the acclimatization process (Brondani, de Wit Ondas, Baccarin, Gonçalves & de Almeida, 2012; Fernandes, Azevedo, Costa & Brondani, 2013; Greenway, Phillips, Lloyd, Hubstenberger & Phillips, 2012). Thus, photoautotrophic micropropagation has been evaluated to obtain plants with anatomical and physiological characteristics that make them able to survive the conditions *ex vitro* like higher chlorophyll content and active photosynthetic apparatus (Xiao, Niu & Kozai, 2011, Zhang et al., 2009).

Among the photoautotrophic techniques, greater gas exchange between the environment and the inside of the culture flasks is highlighted (Iarema et al., 2012; Saldanha et al., 2012), enriching the atmosphere with CO₂ combined with or without more porous support materials (Saldanha et al., 2014), increased PPF (Shin et al., 2013; Sáez, Bravo, Latsague, Sánchez & Ríos, 2012) and decreased or eliminated sucrose from the culture medium (Xiao and Kozai, 2006). Studies that seek to improve the environmental conditions for the *in vitro* culture of native species offer a promising challenge and help in understanding the optimal environmental factors to obtain plantlets with better performance during the acclimatization process.

Light is one of the most important requirements for plant growth and development. Plants cultured at different PPF demonstrate morphological, photosynthetic and metabolic differences (Dai et al., 2009). Overall, plants that grow in an environment with optimal light conditions undergo normal development compared to plants that grow in environments with low or high irradiance. Plants grown at low PPF have low photosynthetic capacity and a low CO₂ assimilation rate. In contrast, an environment with high irradiance can negatively affect photosystem II (PSII) and photosynthesis declines (Guo, Guo, Zhou, Hu & Shen, 2006).

Although native Cerrado fruits trees are important ecologically e economically, little is known regarding the growth conditions of this species. Studies seeking to understand the optimal PPF for the anatomical and physiological development of *P. gardneriana* plantlets cultured *in vitro* are extremely relevant and can aid in obtaining high-quality plants, favoring their successful acclimatization and large-scale plantlets production.

Studies focused on adjusting of the culture environment, such as PPF and determining the sucrose requirement by plants in the culture medium are essential. Thus, the present study aimed to test how PPF can interfere with the growth, anatomy and physiology of *P. gardneriana* plantlets during *in vitro* culture.

MATERIALS AND METHODS

Obtainment of the plant material

Mature fruits of *P. gardneriana* Radlk were collected between November 2014 and January 2015 at the Goiano Federal Institute – Rio Verde Campus (latitude 17°48'202"S, longitude 50°54'397"W and elevation of 749 m) and at the Água Amarela farm in Ouroana municipality in Goiás State, Brazil (latitude 18°11'824"S, longitude 50°34'180"W and elevation of 656 m).

Mucilage attached to the seeds was removed by immersing them in 5% sodium hydroxide solution for 5 minutes. One hundred seeds were germinated in plastic trays (53x37x8 cm) in the presence of washed and sieved coarse sand as substrate and were kept in a growth room with a mean temperature of $25 \pm 3^\circ\text{C}$ and a 16-hour photoperiod until seedlings were obtained. Pest control of the seedlings consisted of spraying a commercial product (0.2% Derosal[®] systemic fungicide solution) 24 hours before inoculation. The seedlings were watered every 15 days with nutrient solution consisting of 50% of the MS medium salts (Murashige and Skoog, 1962).

***In vitro* establishment and experimental conditions**

Healthy and homogenous *P. gardneriana* seedlings were selected and 2.0 cm long nodal segments with one axillary bud were used for the *in vitro* establishment. The segments were covered by gauze and washed under running water for 15 minutes. Next, the disinfection methods were conducted under a laminar flow hood. The explants were dipped in 70% alcohol for one minute and in 20% sodium hypochlorite - NaOCl solution (commercial bleach 2.0 – 2.5% active chlorine) for 20 minutes and were then rinsed three times with sterile water.

After disinfection, the explants were cultured in test tubes (25 x 150 mm) containing 20 mL of MS medium with 50% salts, with 2 g L^{-1} of activated charcoal and solidified with 3.5 g L^{-1} of agar for 30 days. The explants were kept in a growth room with an average temperature $25 \pm 3^\circ\text{C}$, 16-hour photoperiod, active photosynthetic

radiation of $45\text{-}55 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, with was generated using white fluorescent bulbs. After this period, these explants were transferred into flasks containing 50 mL of MS 50% medium, with 2 g L^{-1} of activated charcoal added and solidified with 3.5 g L^{-1} of agar. The pH of the culture medium was adjusted to 5.7 ± 0.03 and the medium was then autoclaved at 121°C for 20 minutes. PVC (polyvinylchloride) film was used to seal the flasks after inoculation.

After 30 days *in vitro* establishment, the nodal segments were cultured in the absence and presence of 30 g L^{-1} of sucrose. The flasks were placed in a climatized chamber (Fitotron[®]) and three PPFD were evaluated ($75, 100$ and $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) using white fluorescent bulbs. These light intensities were adjusted using a photosynthetically active radiation sensor, QSO-S model (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). All treatments were kept at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ with 60% air relative humidity in the climatized chamber (Fitotron[®]).

Biometric analyses

The biometric evaluations were conducted after 60 days of *in vitro* culture using the following characteristics: fresh weight (g), dry weight (g), leaf area (cm^2), shoot percentage (%), leaf number and seedling length (cm). Leaf area was obtained from image integration in ImageJ[®] software (Rasband, W. S.; U. S. ImageJ. Bethesda, MD, USA). The length measurements were obtained using a millimeter ruler. After drying the material in an air-circulation oven at 65°C for 72 hours until obtaining constant weights, the fresh and dry weights were determined using a digital analytical balance.

Chlorophyll *a* fluorescence

Chlorophyll *a* fluorescence analysis was conducted to obtain the maximum quantum yield (F_v/F_m), photochemical quenching (q_P), effective quantum yield ($\Delta F/F_m'$), relative electron transport rate - ETR (Bilger, Schreiber & Bock, 1995) and non-photochemical quenching - NPQ (Bilger & Bjorkman, 1990).

Chlorophyll *a* fluorescence was measured using a mini-PAM modulated fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany). The analyses were conducted using the methods by Bilger et al. (1995) and Rascher, Liebig and Lüttge (2000), which were adapted for *in vitro* plants according to Costa et al. (2014). First, the leaves were dark-acclimated for 30 minutes and were then exposed to a pulse of low-intensity red light

($0.03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to measure the initial fluorescence (F_0). Next, the leaves were exposed to a pulse of saturating actinic light ($> 6.000 \mu\text{mol of m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 0.8 s to measure maximum fluorescence (F_m). Next, the same plantlets were placed in a climatic chamber (Fitotron[®]) for 20 minutes at the same aforementioned growth irradiance to measure the light fluorescence parameters.

Determination of the chlorophyll content

The chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, carotenoid and total chlorophyll pigment levels and pheophytinization index were determined according to Costa et al. (2014) with adaptations to the method. Three leaf disks (5 mm wide) were incubated in closed flasks wrapped in aluminum foil containing 5 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) saturated with calcium carbonate - CaCO_3 (50 g L^{-1}) for a 24-hour period at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ in a water bath. Next, the absorbance of the extract was determined using an Evolution 60S UV-VIS spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Madison – USA). The wavelengths, equations and calculations to determine the pigment levels were based on the study by Wellburn (1994).

Anatomical characterization

The anatomical analyses of the *P. gardneriana* leaves were performed using two methods. The first was the diaphanization process, which analyzes the tissue surface and the second was fixation, in which the leaf tissue was embedded in resins to obtain cross-sections.

During diaphanization, the leaves were immersed in 5% sodium hydroxide for 24 hours, clarified with chloral hydrate 1:6:1 (p/v) for 24 more hours and stained with 1% safranin in 50% ethanol (Arnott, 1959). Upon studying the leaf surface, the *P. gardneriana* leaves were classified regarding stomatal location, stomatal morphology, stomatal density and stomatal polar and equatorial diameters.

The leaves were fixed in Karnovsky solution (Karnovsky, 1965) for 48 hours. Next, the leaves were dehydrated in an ascending ethanol series and pre-infiltrated and infiltrated with historesin (Historesin Leica, Erviegas Ltda: São Paulo- SP, Brazil) to obtain historesin blocks with included plant material. After drying the blocks in silica gel, the material was transversely sectioned $5 \mu\text{m}$ thick in a rotary microtome (RM 2155 model, Leica). The obtained cuts were stained with 0.05% toluidine blue, pH 4.0

(O'Brien, Feder & McCully, 1964) to evaluate palisade parenchyma thickness, adaxial and abaxial epidermis thickness and mesophyll thickness.

The images were captured using an optical microscope (BX61 model, Olympus Corporation - Tokyo, Japan) with the U-photo system. The micromorphometric measurements were obtained using image integration in image analysis software (ImageJ®).

Experimental design and statistical analysis

The experiment was conducted in a completely randomized design (CRD) in factorial arrangement (2x3) in the absence and presence of 30 g L⁻¹ of sucrose and at three PPF levels (75, 100 and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), with eight replicates and three explants per flask. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA), applying the F test and the means were compared using the Tukey test (5% probability). The percentage data were arc-sine $\sqrt{x/100}$ transformed and the number count was $\sqrt{x+0.5}$ transformed. SISVAR software (Ferreira, 2011) was used for the data analysis.

RESULTS

Plant growth and development at variation in photosynthetic photon flux densities

After 60 days of culture, different growth and development profiles were observed in *P. gardneriana* plantlets cultured at different light intensities in the presence and absence of sucrose (Figure 1). Some species have the capacity to grow *in vitro* in the absence of sucrose under light and gas exchange conditions sufficient for them to undergo photosynthesis. However, in the present study, the increase in environmental PPF did not suppress the requirement for sucrose by the shoots in the culture medium and plantlets growth did not occur (Figure 1D, E and F).

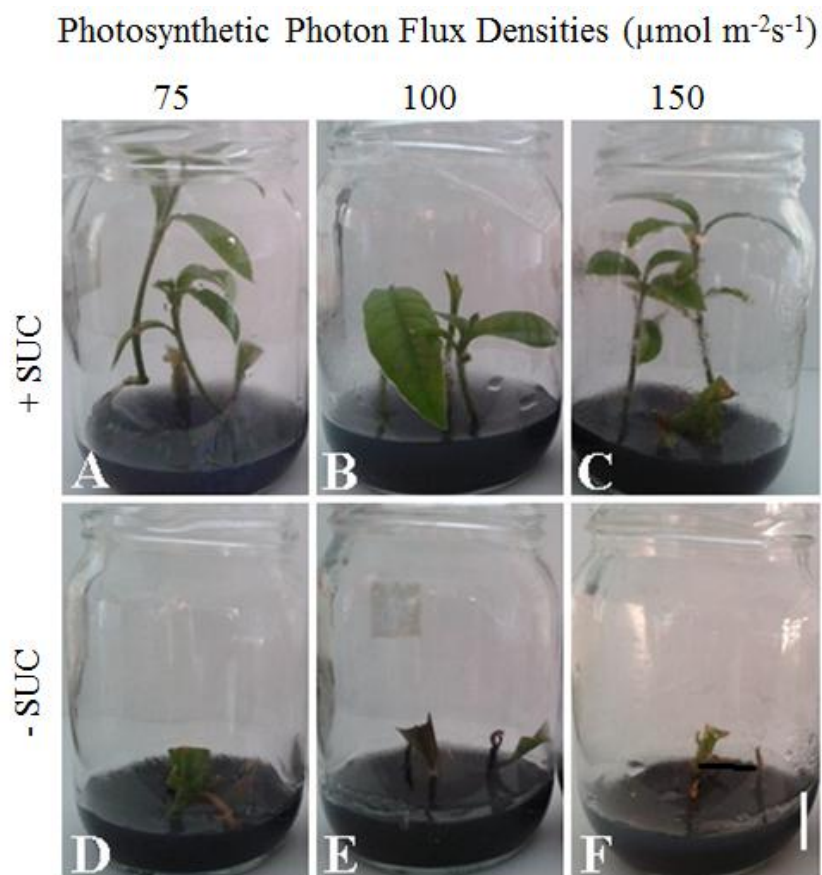


Figure 1. *P. gardneriana* Radlk plantlets growth in MS 50% culture medium supplemented with 30 g L^{-1} of sucrose (A - C) (+ SUC) and in sucrose-free medium (D - F) (- SUC) at PPFD of 75, 100 and $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively. Scale bar: 1 cm.

A PPFD of $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ positively affected plant biomass. Higher fresh and dry weights were obtained at an irradiance of $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with means of 0.55 and 0.28 g, respectively, consistent with the observed leaf area value (22.7 cm^2). There were no differences between the irradiances for the shoot percentage, leaf number and plantlets length characteristics (means of 46.96%, 1.56 and 4.66 cm, respectively) (Table 1).

Table 1- Fresh weight (g), dry weight (g), leaf area (cm²), shoot percentage (%), leaf number and shoot length (cm) of *Pouteria gardneriana* Radlk cultured in MS 50% for 60 days in medium supplemented with 30 gL⁻¹ in sucrose at PPFD of 75, 100 and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

PPFD ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Biometric characteristics					
	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Leaf area (cm ²)	Shoot	Leaf number	Shoot Length (cm)
75	0.47±0.02*b ^z	0.23±0.01b	20.30±3.47ab	47.40±0.81a	1.60±0.08a	4.96±0.22a
100	0.43±0.02b	0.19±0.01b	14.60±4.76b	48.21±0.01a	1.41±0.13a	4.00±0.32a
150	0.55±0.02a	0.28±0.01a	22.70±5.09a	45.28±2.15a	1.67±0.25a	5.04±0.69a

^zMeans followed by the same letter do not differ statistically using the Tukey test at 5% probability. *Standard error of the mean.

Parameters and photosynthetic pigments

Photosynthetic pigment levels (Cl.a, Cl.b, carotenoids and total chlorophyll) and pheophytinization index did not vary in relation to variation PPFD (Table 2). The observed means for these pigments were 18.38, 7.78, 4.50, 26.17 and 1.32 $\mu\text{g cm}^{-2}$, respectively.

Table 2. Chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, carotenoids, total chlorophyll and pheophytinization index (P.I.) of *Pouteria gardneriana* Radlk plantlets cultured in MS 50% for 60 days in medium supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose at PPFD of 75, 100 and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

PPFD ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Physiological characteristics				
	Chlorophyll <i>a</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Chlorophyll <i>b</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Carotenoids ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Total Chlorophyll ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	P.I (A ₄₃₅ /A ₄₁₅)
75	18.11±1.31*a ^z	7.27±0.61a	4.20±0.25a	25.39±1.83a	1.30±0.02a
100	18.16±1.41a	7.64±0.33a	4.53±0.27a	25.80±1.72a	1.35±0.02a
150	18.88±1.64a	8.44±0.47a	4.78±0.24a	27.33±1.88a	1.31±0.03a

^zMeans followed by the same letter do not differ statistically using the Tukey test at 5% probability. *Standard error of the mean.

The effect of PPFD on chlorophyll *a* fluorescence in *P. gardneriana* plantlets is shown in Table 3. The highest Fv/Fm value was obtained at PPFD 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$,

with a mean of 0.73; however, the Fv/Fm did not differ from the 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with a mean of 0.70. The lowest Fv/Fm value (0.67) was obtained at 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. PPFd did not differ for the qP, NPQ, $\Delta\text{F}/\text{Fm}'$ and ETR characteristics, with means of 0.39, 0.87, 0.22 and 38.36, respectively.

Table 3. Maximum quantum yield (Fv/Fm), photochemical quenching (qP), non-photochemical fluorescence quenching (NPQ), effective quantum yield ($\Delta\text{F}/\text{Fm}'$) and electron transport rate (ETR) in the leaves of *Pouteria gardneriana* Radlk plantlets cultured in MS 50% for 60 days in medium supplemented with 30 gL^{-1} sucrose at PPFd of 75, 100 and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

PPFD ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Physiological characteristics				
	Fv/Fm	qP	NPQ	$\Delta\text{F}/\text{Fm}'$	ETR
75	0.73 \pm 0.01*a ^z	0.37 \pm 0.04a	0.45 \pm 0.10a	0.24 \pm 0.02a	41.8 \pm 4.30a
100	0.70 \pm 0.02ab	0.38 \pm 0.03a	0.93 \pm 0.17a	0.21 \pm 0.03a	36.2 \pm 4.69a
150	0.67 \pm 0.01b	0.44 \pm 0.03a	1.24 \pm 0.31a	0.22 \pm 0.03a	37.1 \pm 5.96a

^zMeans followed by the same letter do not differ statistically using the Tukey test at 5% probability. *Standard error of the mean.

Anatomical plasticity

PPFD affected the evaluated anatomical characteristics, especially the palisade parenchyma thickness and stomatal polar and equatorial diameters. This information supports understanding of the physiological responses observed in the *P. gardneriana* plantlets (Table 4).

Greater palisade parenchyma and stomatal polar and equatorial diameters were observed at the PPFd 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with means of 19.3, 20.0 and 15.9 μm , respectively. There were no differences between the PPFd for the adaxial and abaxial epidermis thickness, mesophyll thickness and stomatal density characteristics, with means of 7.26, 7.5, 67.6 μm and 388.2 stomata mm^{-2} , respectively (Table 4).

Table 4- Palisade parenchyma (P.P.), polar diameter (P.D.), equatorial diameter (Eq.D.), adaxial (Ad.Ep.T.) and abaxial epidermis thickness (Ab.Ep.T), mesophyll thickness (Me) (μm) and stomatal density (S.D.) in the leaves from *Pouteria gardneriana* Radlk plantlets cultured in MS 50% in for 60 days in medium supplemented with 30 g L^{-1} sucrose at PPFD of 75, 100 and $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

PPFD ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Anatomical characteristics						
	P.P. (μm)	P.D. (μm)	Eq.D. (μm)	Ad. Ep. T. (μm)	Ab.Ep.T. (μm)	Me (μm)	S.D. (Stomata/ mm^2)
75	16.9 \pm 0.4*b ^z	15.6 \pm 0.2b	13.7 \pm 0.4b	7.7 \pm 0.4a	7.8 \pm 0.1a	68.6 \pm 0.9a	425.5 \pm 37.4a
100	15.9 \pm 0.1b	15.7 \pm 0.2b	14.0 \pm 0.1ab	7.4 \pm 0.3a	7.4 \pm 0.4a	67.3 \pm 4.6a	399.7 \pm 58.8a
150	19.3 \pm 0.5a	20.0 \pm 0.1a	15.9 \pm 0.7a	6.7 \pm 0.6a	7.3 \pm 0.5a	66.9 \pm 4.6a	339.5 \pm 33.2a

^zMeans followed by the same letter do not differ statistically using the Tukey test at 5% probability. *Standard error of the mean.

The epidermis of both faces of the *P. gardneriana* leaves was uniseriate, consisting of rectangular cells with flat or slightly convex periclinals, external walls. The organization of the mesophyll was dorsoventrally heterogeneous, with palisade parenchyma consisting of juxtaposed columnar cells and stratified spongy parenchyma with irregular-shaped cells (Figure 2a, b, c).

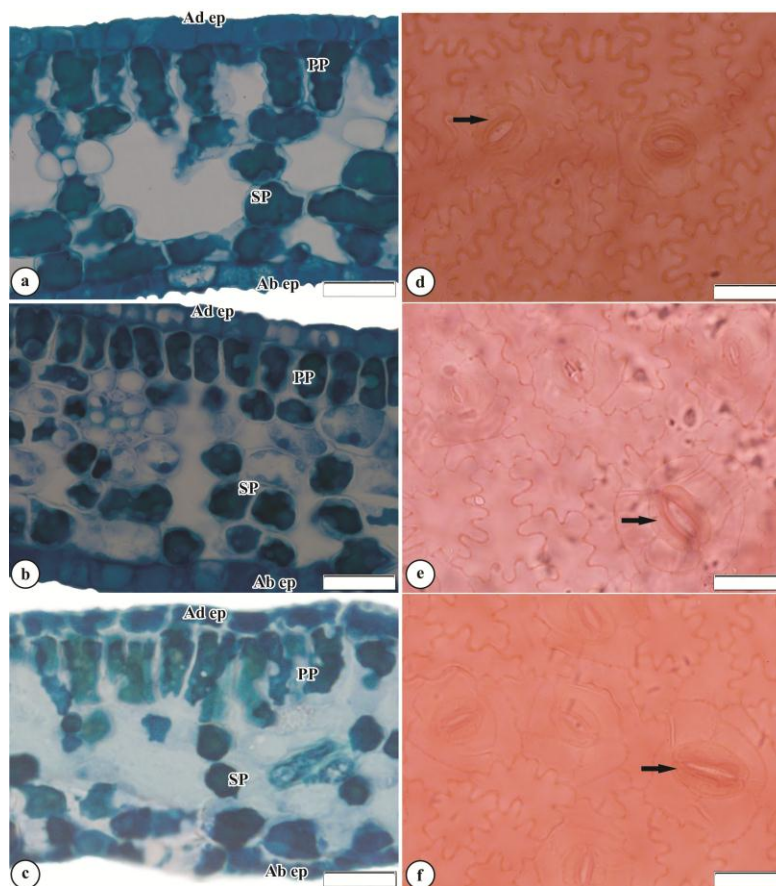


Figure 2. Electron photomicrographs of cross-sectional regions of the leaf (a - c) and the abaxial face surface (d - f) from *Pouteria gardneriana* Radlk cultured in medium supplemented with 30 g L⁻¹ of sucrose at PPFD of 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (a and d), 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b and e), and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (c and f). Adaxial epidermis (Ad ep), abaxial epidermis (Ab ep), palisade parenchyma (PP) and spongy parenchyma (SP). Arrows = stomata. Scale bar: 50 μm .

Stomata presence was identified only on the abaxial face, characterizing the leaf as hypostomatic. Regarding the organization of the subsidiary cells, the stomata were classified as anisocytic. These characteristics were observed in all *P. gardneriana* plantlets, being genetic trait was little affected by the variation in PPFD. According to the ratio between their polar and equatorial diameters, it was observed the shape ellipsoid with increased PPFD (Figure 2d, e, f).

DISCUSSION

Sucrose requirement by *P. gardneriana* plantlets in the culture medium was unsuppressed by the increase in environmental photosynthetic photon flux densities

Under light and gas exchange conditions sufficient for the plants to undergo photosynthesis *in vitro*, many species have the capacity to grow in the absence of sucrose in the culture medium, as observed in *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Iarema et al., 2012; Saldanha et al., 2014) and hybrids of orchid *Doritaenopsis* (Shin, Park & Paek, 2013). For *Mouriri elliptica* (Mart.), a native cerrado species, the increased PPFD ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) decreases the requirement of sucrose in the culture medium and led to plantlets growth (Assis et al., 2016). However, in the present study, shoot formation of the *P. gardneriana* was dependent on the sucrose addition in the culture medium.

A sucrose requirement as the metabolic energy source for the growth and development of seedlings *in vitro* has been observed in several species, including the herbaceous plant *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) (Flores, Uliana, Pimentel & Garlet, 2013) and the tree species *Acrocomia aculeata* (Jacq.) (Bandeira, Xavier, Lani & Otoni, 2013). According to Jesus et al. (2011), sucrose allows viable or normal plants to be obtained in most species, as observed for the plant under study.

Physiological profile of the *P. gardneriana* plantlets subjected at variation in photosynthetic photon flux densities

In the present study, it was possible to evaluate the photosynthetic capacity of *P. gardneriana* seedlings cultured at PPFD of 75, 100 and $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Chlorophyll content is an important parameter that determines the photosynthetic pattern and regulates plant growth. In this study, there were no changes in the pigment levels of the plantlets as responses to the variation in light. These results indicate that the different PPFD used in the study do not influence the pigment levels and structural responses (Table 2).

Data regarding the effective quantum yield of photosystem II ($\Delta F/F_m$), non-photochemical quenching (NPQ), electron transport rate (ETR) and photochemical quenching (qP) did not differ between the plantlets cultured at different PPFD. However, the F_v/F_m values varied ranging from 0.67 to 0.73. A lower F_v/F_m value

(0.67) was observed at PPFD $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, corroborating the results described by Shin et al. (2013); however, the difference in this parameter can be characteristic of the species used.

The capacity to maintain high Fv/Fm ratios can be indicative of use radiation efficiency by photochemistry and consequently carbon assimilation (Tester & Bacic, 2005). Fan et al. (2013) considered excess light to reduce photosynthetic efficiency due to the inability of the photosynthetic apparatus to dissipate this excess; thus, photoinhibition and damage in the photosystem reaction centers can occur. Although a lower Fv/Fm ratio was observed in the plantlets cultured at $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ they did not demonstrate photoinhibition and the biomass accumulation was higher. Photoinhibition characteristic was observed in apple plants cultured *in vitro* (Zanandrea, Bacarin, Falqueto, Braga & Peters, 2007) and in young 'jatobá-do-cerrado' (*Hymenaea stigonocarpa*) plants grown in a greenhouse (Costa et al., 2015), when they were exposed to PPFD higher than the ideal range for photosynthesis.

Anatomical characteristics: low anatomical plasticity was observed in leaves from *P. gardneriana* cultured *in vitro* at variation in photosynthetic photon flux densities

The *P. gardneriana* plants cultivated at PPFD $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ showed structural alterations palisade parenchyma with greater expansion, suggesting variation anatomical adaptability. In the study conducted by Fan et al. (2013) when tomato culture was subjected to PPFD of 300 and $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the mesophyll thicker and palisade parenchyma was higher. In *Mouriri elliptica* (Mart.) the variations morphoanatomic observed in the leaves were attributed to plasticity and adaptive characteristic of the species, an important factor of the seedlings when they are subjected to *ex vitro* culture conditions (Assis et al., 2016).

Stomatal density is another anatomical characteristic that correlates well with the photosynthetic capacity of plants, as the higher the number of stomata/ mm^2 , the lower the resistance to leaf gas diffusion (Lima Jr., Alvarenga & Castro, 2006). According to Chirinéa, Pasqual, Araújo, Pereira and Castro (2012), stomatal density in the leaves varies with the species and culture conditions. None of the PPFD used in the present study led to elevation of this variable in the *P. gardneriana* leaves.

The stomata in the *P. gardneriana* leaves were formed by cells with kidneys format and ellipsoid characteristic with increase of PPFD, showing their functionality. Consistent with these results, many studies demonstrate that the structural

characteristics of the stomata are related to its functionality (Hazarika, 2006). In *Castanea sativa* observed ellipsoid characteristic of stomata when grown in PPFD of $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Sáez et al., 2012).

The structural alterations of the palisade parenchyma of plantlets cultivated at PPFD $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ have not reduced the photosynthetic capacity, because it do not differ from other parameters, like effective quantum yield from photosystem II ($\Delta F/F_m'$) and were able to increase CO_2 assimilation, consistent with dry matter content observed in these plantlets.

The variation PPFD used in the present study was sufficient for understanding the behavior of this species *in vitro* and to inform future studies, thus seeking higher, better quality plantlets production. Although the sucrose requirement by the species is observed in the culture medium, considered important the development of new studies evaluating lower concentrations thus 30 g L^{-1} of this supplement combined with higher PPFD, atmosphere CO_2 enrichment and alternative substrates is interesting.

CONCLUSIONS

Shoot formation of *P. gardneriana* plants *in vitro* was dependent on sucrose addition to the culture medium. The organization of leaf tissue was characteristic phenotypic little influenced at variation PPFD used in this work. However, photosynthetic photon flux densities $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ led to higher biomass accumulation and certain anatomical adaptability with expansion of the leaf palisade parenchyma.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior — CAPES), the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico — CNPq) and the Goiano Federal Institute (Instituto Federal Goiano — IF Goiano), Rio Verde Campus, for the financial aid awarded to this research. Thanks also to teacher Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho for sharing the anatomy laboratory.

REFERENCES

- Arnott, H. J. (1959). Leaf clearings. *Turtox News*, 37(8), 192-194.
- Assis, E. S., Rubio Neto, A., Lima, L. R., Silva, F. G., Rosa, M., Vasconcelos Filho, S. C. & Leite, M. S. (2016). *In vitro* culture of *Mouriri elliptica* (Mart.) under conditions that stimulate photoautotrophic behavior. *Australian Journal of Crop Science*, 10(2), 229-236.
- Bandeira, F. S., Xavier, A., Lani, E. R. G. & Otoni, W. C. (2013). Germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de macaúba influenciada por temperaturas de armazenamento dos frutos e concentrações de sacarose. *Revista Árvore*, 37(4), 691-700. doi:10.1590/S0100-67622013000400012.
- Bilger, W. & Björkman, O. (1990). Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research*, 25(3), 173-185. doi:10.1007/BF00033159.
- Bilger, W., Schreiber, U. & Bock, M. (1995). Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia*, 102(4), 425-432. doi:10.1007/BF00341354.
- Brondani, G. E., de Wit Ondas, H. W., Baccarin, F. J. B., Gonçalves, A. N. & Almeida, M. (2012). Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 48(5), 478-487. doi:10.1007/s11627-012-9449-9.
- Cabral, J. S. R., Sales, J. F., Silva, F. G., Branquinho, A. C. & Oliveira, R. C. (2013). Physiological quality of guapeva (*Pouteria gardneriana* Radlk.) seeds during storage. *Global Science and Technology*, 6(1), 127-133. doi:10.14688/1984-3801.v06n01a11.
- Chirinéa, C. F., Pasqual, M., Araújo, A. G. d, Pereira, A. R. & Castro, E. M. d. (2012). Acclimatization and leaf anatomy of micropropagated fig plantlets. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34(4), 1180-1188. doi:10.1590/S0100-29452012000400027.
- Costa, A. C., Rezende-Silva, S. L., Megguer, C. A., Moura, L. M. F., Rosa, M. & Silva, A. A. (2015). The effect of irradiance and water restriction on photosynthesis in young jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa*) plants. *Photosynthetica*, 53(1), 118-127. doi:10.1007/s11099-015-0085-6.

- Costa, A. C., Rosa, M., Megguer, C. A., Silva, F. G., Pereira, F. D. & Otoni, W. C. (2014). A reliable methodology for assessing the *in vitro* photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marrubioides* and *Hancornia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117(3), 443-454. doi:10.1007/s11240-014-0455-y.
- Dai, Y., Shen, Z., Liu, Y., Wang, L., Hannaway, D. & Lu, H. (2009). Effects of shade treatments on the photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence and chlorophyll content of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg. *Environmental and Experimental Botany*, 65(2-3), 177-182. doi:10.1016/j.envexpbot.2008.12.008.
- Fan, X., Xu, Z., Liu, X., Tang, C., Wang, L. & Han, X. (2013). Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under a combination of red and blue light. *Scientia Horticulturae*, 153(4), 50-55. doi:10.1016/j.scienta.2013.01.017.
- Fernandes, D. A., Azevedo, P. H., Costa, R. B. & Brondani, G. E. (2013). Tipos de vedação e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Tectona grandis* L. f. *Revista de Agricultura*, 88(3), 218-228.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6), 1039-1042.
- Flores, R., Uliana, S. C., Pimentel, N. & Garlet, T. M. B. (2013). Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 4(3), 192-199.
- Greenway, M. B., Phillips, I. C., Lloyd, M. N., Hubstenberger, J. F. & Phillips, G. C. (2012). A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 48(4), 403-410. doi:10.1007/s11627-012-9452-1.
- Guo, Y. P., Guo, D. P., Zhou, H. F., Hu, M. J. & Shen, Y. G. (2006). Photoinhibition and xanthophyll cycle activity in bayberry (*Myrica rubra*) leaves induced by high irradiance. *Photosynthetica*, 44(3), 439-446. doi:10.1007/s11099-006-0048-z.
- Hazarika, B. N. (2006). Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108(2), 105-120. doi:10.1016/j.scienta.2006.01.038.

- Iarema, L., Cruz, A. C. F., Saldanha, C. W., Dias, L. L. C., Vieira, R. F., Oliveira, E. J. & Otoni, W. C. (2012). Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110(2), 227–238.
- Jesus, A. M. S., Villa, F., Lara, A. C. D.C. & Pasqual, M. (2011). Avaliação do efeito das concentrações de sacarose e dos estádios de desenvolvimento do fruto no cultivo *in vitro* de embriões de frutos de cafeeiro. *Revista Ceres*, 58(6), 679-684. doi:10.1590/S0034-737X2011000600001.
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27(2), 137–138.
- Lima Jr., E. C., Alvarenga, A. A. & Castro, E. M. (2006). Aspectos fisioanatômicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. *Revista Árvore*, 30(1), 33-41.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- O'Brien, T. P., Feder, N. & Mc Cully, M. E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59(2), 368-373. doi:10.1007/BF01248568.
- Rascher, U., Liebig, M. & Lüttge, U. (2000). Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. *Plant, Cell & Environment*, 23(12), 1397-1405. doi:10.1046/j.1365-3040.2000.00650.x.
- Rocha, W. S., Lopes, R. M., Silva, D. B. d, Vieira, R. F., Silva, J. P. & Agostini-Costa, T. S. (2011). Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(4), 1215-1221. doi:10.1590/S0100-29452011000400021.
- Sáez, P. L., Bravo, L. A., Latsague, M. I., Sánchez, M. E. & Ríos, D. G. (2012). Increased light intensity during *in vitro* culture improves water loss control and photosynthetic performance of *Castanea sativa* grown in ventilated vessels. *Scientia Horticulturae*, 138(1), 7-16.
- Saldanha, C. W., Otoni, C. G., Rocha, D. I., Cavatte, P. C., Detmann, K. S. C., Tanaka, F. A. O., Dias, L. L. C., Damatta, F. M. & Otoni, W. C. (2014). CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and

- ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118(1), 87-99.
- Saldanha, C. W., Otoni, C. G., de Azevedo, J. L. F., Dias, L. L. C., do Rêgo, M. M. & Otoni, W. C. (2012). A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110(3), 413-422. doi:10.1007/s11240-012-0162-5.
- Shin, K., Park, S. & Paek, K. (2013). Sugar metabolism, photosynthesis and growth of *in vitro* plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49(4), 445-454. doi:10.1007/s11627-013-9524-x.
- Tester, M. & Bacic, A. (2005). Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiology*, 137(3), 791-793. doi:10.1104/pp.104.900138.
- Vieira, R. F., Agostini-Costa, T., Silva, D. B., Ferreira, F. R. & Sano, S. M. (2006). *Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 320p. ISBN 978-85-87697-44-8.
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307-313. doi:10.1016/S0176-1617(11)81192-2.
- Xiao, Y. & Kozai, T. (2006). *In vitro* multiplication of static plantlets using sugar-free media. *Scientia Horticulturae*, 109(1), 71-77. doi:10.1016/j.scienta.2006.02.029.
- Xiao, Y., Niu, G. & Kozai, T. (2011). Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105(2), 149-158. doi:10.1007/s11240-010-9863-9.
- Zanandrea, I., Bacarin, M. A., Falqueto, A. R., Braga, E. J. B. & Peters, J. A. (2007). Características fotossintéticas de macieira cultivada *in vitro*. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(2), 885-887.
- Zhang, M., Zhao, D., Ma, Z., Li, X. & Xiao, Y. (2009). Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. *Hortscience*, 44(3), 757-763.

CAPÍTULO III

PRÉ-CONDICIONAMENTO DE PLÂNTULAS *Pouteria gardneriana* Radlk CULTIVADAS *IN VITRO* PARA ACLIMATIZAÇÃO

RESUMO: A aclimatização é uma etapa decisiva para o sucesso da micropropagação podendo ocorrer alta mortalidade das plantas devido ao dessecamento e a alteração da condição heterotrófica (*in vitro*) para autotrófica (*ex vitro*). Objetivou-se com esse trabalho avaliar o pré-condicionamento das plântulas de *P. gardneriana* estabelecidas *in vitro* para aclimatização e garantir maior sobrevivência. Para isso, aos 90 dias de cultivo *in vitro*, utilizaram-se plântulas que foram divididas em dois grupos de raiz e um controle sem raiz sendo: plântulas com raízes, plântulas com poda parcial na raiz a 2 cm e controle (remoção total das raízes). As mesmas foram transferidas para vasos plásticos contendo substrato comercial Bioplant[®], mantidas em casa de vegetação com sombreamento de 50%. As avaliações foram realizadas aos 53 dias de aclimatização, plântulas com raízes obtiveram maior área foliar (33,21 cm²), maior número de folhas (7,70), número de segmentos (2,93), área de raiz (3,33 cm²), comprimento de raiz (11,12 cm), número de raiz secundárias (7,59), maior MFF (410 mg), MSF (122 mg), MFR (240 mg), MSR (35 mg), maior teor de clorofila *a* (25,28 µg cm⁻²), clorofila *b* (7,02 µg cm⁻²) e clorofila total (32,30 µg cm⁻²). O enraizamento *in vitro* proporcionou incremento na biomassa de *P. gardneriana*, ressaltando a importância das raízes no desempenho das plantas após o transplante e suas atividades fisiológicas das quais dependem o crescimento das mudas.

Palavras-chave: Guapeva, micropropagação, produção de mudas, enraizamento *in vitro*, sapotaceae.

INTRODUÇÃO

As frutíferas nativas do cerrado possuem características próprias, oferecendo grande quantidade de frutos comestíveis de qualidade, utilizados na alimentação ou medicina popular (Duboc, 2008). São fundamentais no ecossistema por serem consideradas como fonte de compostos de alto interesse biotecnológico, contribuindo com as indústrias de forma inovadora, proporcionando desenvolvimento competitivo, sendo destaque tanto na indústria médica quanto na de alimentos (Damiani et al., 2011).

A guapeva (*Pouteria gardneriana* Radlk) espécie arbórea nativa do Cerrado, pertencente à família Sapotaceae, que é conhecida por pêssego-do-campo e cabo-de-machado. Tem potencial econômico, seus frutos são utilizados pela população, *in natura*, ou processados para a produção de doces, sucos, geleias e licores (Vieira et al., 2006; Rocha et al., 2011). As sementes possuem característica de espécie recalcitrante (Cabral et al., 2013), e limita seu armazenamento e por consequência conservação da espécie. Diante disso, a micropropagação é uma alternativa viável para produção de mudas.

A micropropagação é uma maneira de superar dificuldades para produção de mudas em larga escala, devido à natureza recalcitrante das sementes, frutificação irregular e ausência de propagação vegetativa natural da espécie. Verifica-se que a germinação de sementes de fruteiras nativas do Cerrado em ambiente controlado, como germinadores e *in vitro*, é um desafio devido aos diversos fatores que interferem na conservação e produção de mudas dessas espécies, tais como a contaminação e a falta de protocolos para o cultivo *in vitro*. Este processo torna-se ainda mais difícil, quando se necessita produzir mudas em escala comercial (Pinhal et al., 2011).

Um dos maiores obstáculos da micropropagação é a dificuldade de transferir com sucesso as mudas da condição *in vitro* para *ex vitro*, devido baixa sobrevivência, ocasionada pela perda excessiva de água e mudança de metabolismo heterotrófico para autotrófico, em que a presença de raízes nas plântulas é de suma importância para o crescimento e sobrevivência, sobretudo na aclimatização, sofrendo processo de adaptação climática por ser transferida para um novo ambiente (Chandra et al., 2010; Kumar e Rao, 2012; Barboza et al., 2006).

As mudas micropropagadas necessitam de um período de aclimatização em viveiros, permanecendo em recipientes com substratos até atingir o porte ideal para o transplante no campo (Nomura et al., 2008). Redução de mortalidade associada ao rápido crescimento de mudas na aclimatização é fator que pode contribuir

significativamente para que mudas micropropagadas cheguem ao consumidor, de forma mais rápida e barata (Oliveira et al., 2008).

O enraizamento *ex vitro*, diretamente no substrato, produz sistema radicular desenvolvido e funcional, com maior número de raízes secundárias, sem formação intermediária de calo, que dificulta a conexão do sistema vascular entre caule e raiz, o que garante alta porcentagem de sobrevivência quando aclimatizada. Um sistema radicular bem formado aumenta a área de solo explorado, promovendo absorção de água e nutrientes, permitindo maior crescimento das plântulas (Resende et al., 2010).

A poda tanto no sistema radicular quanto na parte aérea, é favorável ao desenvolvimento das mudas com a finalidade de adequar o balanço do desenvolvimento em altura e do sistema radicular, com objetivo de aumentar a sobrevivência, propiciar mudas robustas, formar sistema radicular fibroso e estimular a formação de raízes laterais, mantendo equilíbrio entre raiz e parte aérea (Souza et al., 2006; Li et al., 2013). Não há relatos sobre período completo da aclimatização de mudas de *Pouteria spp.*, produzidas por meio da micropropagação. Com isso, objetivou-se avaliar o pré-condicionamento das plântulas de *P. gardneriana* estabelecidas *in vitro* para aclimatização e garantir maior sobrevivência.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

Os frutos foram coletados maduros entre os meses de novembro de 2015 a janeiro de 2016, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde (Latitude 17°48'202''S, Longitude 50°54'397''W e Altitude 749 m).

Para a retirada da mucilagem aderida à semente, as mesmas foram imersas em solução de hidróxido de sódio a 5% por 5 minutos. Foram semeadas 100 sementes por bandejas plásticas (53x37x8 cm), observou-se 80% de semente emergida em substrato areia grossa lavada e peneirada (Figura 1A). As mesmas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura média de 25 ± 3 °C, fotoperíodo de 16 horas, por 90 dias até a obtenção das plantas (Figura 1B). O controle fitossanitário das plântulas foi realizado com pulverizações de solução fungicida sistêmica de Derosal[®] a 0,2% do produto comercial 24 horas antes da inoculação das plântulas *in vitro*. As plântulas foram ferti-irrigadas a cada 15 dias com solução nutritiva composta por 50% dos sais do meio MS (Murashige e Skoog, 1962).

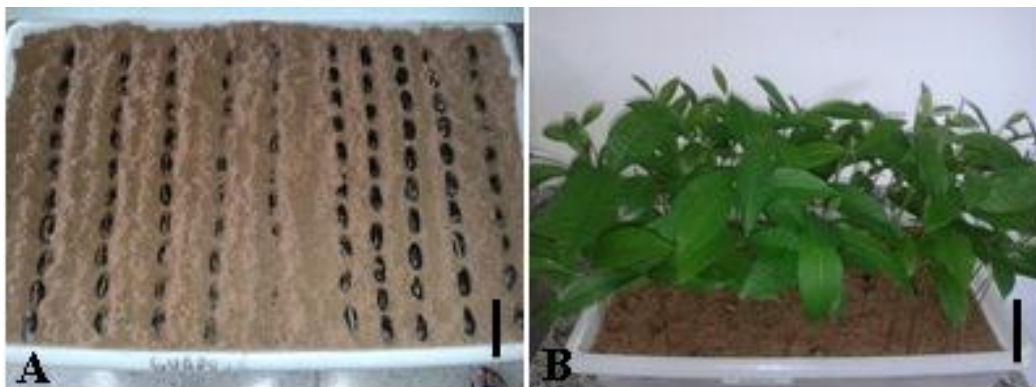


Figura 1- Sementes de *Pouteria gardneriana* Radlk. semeadas em bandejas plásticas (A) plantas com 60 dias (B), mantidas em sala de crescimento. Barra: 4 cm.

Estabelecimento *in vitro*

Plântulas vigorosas (com formação da parte aérea) de *P. gardneriana* foram selecionadas e, para o estabelecimento *in vitro*, utilizou-se segmentos nodais com 2 cm de comprimento e com uma gema axilar. Os segmentos foram revestidos por gaze e lavados em água corrente por 15 min. Em seguida foram feitos os métodos de assepsia na câmara de fluxo laminar. Os explantes foram imersos em álcool 70% por 1 minuto, e em solução a 20% de hipoclorito de sódio - NaOCl (água sanitária comercial 2,0 – 2,5% de cloro ativo) por 20 minutos e enxaguados por três vezes com água esterilizada.

Após a desinfestação, os explantes foram cultivados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 20 mL de meio MS com 50% de sais, com incremento de 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado e solidificado com 3,5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,7 ± 0,03, e, em seguida o meio foi autoclavado à temperatura de 121°C por 20 minutos. Para a vedação dos tubos após a inoculação foi utilizado o vedafilme PVC (polivinilcloro). Os tubos com as explantes foram mantidos por 90 dias em sala de crescimento, sem troca de meio de cultivo, ocorrendo o enraizamento sem uso de regulador de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 3°C, umidade relativa 45% e radiação fotossintética ativa de 45-55 μmol m⁻²s⁻¹.

Aclimatização

Plântulas de *P. gardneriana* cultivadas *in vitro* aos 90 dias, com raízes sem uso de reguladores de crescimento. Plântulas bem formadas, vigorosas, coloração verde-escura, características da espécie, foram selecionadas para a fase de aclimatização. Realizou-se pré-aclimatização, os tubos contendo os explantes tiveram três furos no

vedafilme, permanecendo por cinco dias na sala de crescimento. Posteriormente as plântulas foram retiradas dos tubos de ensaio e tiveram suas raízes lavadas em água corrente para remoção do meio de cultivo.

As plântulas de *P. gardneriana* com: raízes, poda nas raízes (2 cm) e remoção total raízes (Figura 2 A - C), foram transferidas para vasos plásticos de 500 mL, perfurados, para drenagem do excesso de água, contendo substrato Bioplant® (Figura 2 D - F). Todos os vasos foram cobertos com um saco plástico transparente (20 x 30 cm) que foi preso com um elástico de borracha para formar uma câmara úmida, por 30 dias.

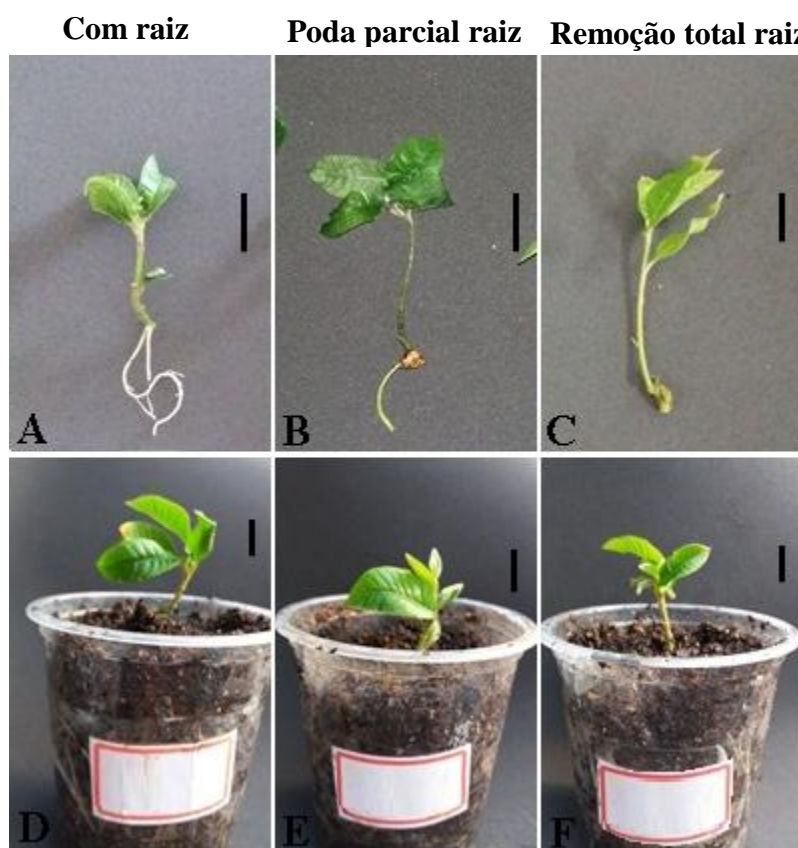


Figura 2- Plântulas de *P. gardneriana* Radlk cultivadas *in vitro* com raiz (A e D), poda parcial na raiz com 2cm (B e E) e remoção total das raízes (C e F), transferidas para vasos plásticos, contendo substrato Bioplant®. Barra: 2cm.

Os vasos contendo as plântulas foram mantidos em casa de vegetação sob irradiância que variou no decorrer do dia, sendo a mínima de $29 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e máxima de $322 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, com temperatura média de $26 \text{ }^\circ\text{C}$, umidade relativa de 66% e sombreamento de 50%. A irrigação foi manual, ocorrendo semanalmente com volume de 10 mL por vaso. A cada duas semanas, a ferti-irrigação foi realizada com solução nutritiva em todos os tratamentos, composta pelos sais do meio $\text{MS}\frac{1}{2}$, no volume de 10

mL por vaso.

A cada sete dias realizou-se corte nos sacos plásticos, até chegar a sua total abertura, totalizando quatro cortes. Após 30 dias os sacos plásticos foram retirados mantendo-se a irrigação manual com água, que passou a ocorrer todos os dias e solução nutritiva a cada duas semanas no volume de 10 mL, permanecendo mesmo ambiente anteriormente.

Características biométricas

Realizou-se avaliações biométricas no tempo zero a fim de obter homogeneidade das plântulas e ao final dos 53 dias, avaliou-se: taxa de sobrevivência (%), número de raiz, número de raiz secundária, comprimento maior raiz (cm), número de folhas, número de segmentos, comprimento da plântula (cm), massa fresca folha (g), massa seca folha (g), massa fresca raiz (g), massa seca raiz (g), massa fresca caule (g), massa seca caule (g), área foliar (cm²), área de raiz (cm²). A área foliar e área de raiz foram obtidas a partir da integração das imagens em *Software ImageJ*[®] (Rasband, W. S.; U. S. ImageJ. Bethesda, Md, USA). As medidas de comprimento foram obtidas com régua milimétrica. A massa fresca e seca foi determinada em balança analítica digital após a secagem do material em estufa de ventilação forçada à temperatura de 65°C por 72 horas até a obtenção do peso constante.

Características fisiológicas

Para a obtenção da clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total, utilizou-se o clorofilog (Falker[®]), para taxa de transpiração (*E*), condutância estomática (gs), taxa fotossintética (*A*), relação entre concentração atmosférica e a intercelular de CO₂ (*C_i/C_a*), medidos com um sistema medidor portátil de fotossíntese modelo LI-6400XT (Li-Cor, Lincoln, NE, EUA). A assimilação líquida de CO₂ foi avaliada entre 8 e 10h, folhas totalmente expandidas. O ar foi coletado de fora do cultivo protegido, transportado para dentro de um galão de proteção e bombeado para a câmara. Foi utilizada uma densidade de fluxo de fótons de 1000 μmol m⁻² s⁻¹ de uma fonte de luz red-blue LED, e a temperatura média do ambiente 27,2 °C, umidade relativa 65,8%.

Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com 3 tratamentos (plântulas com raiz, poda parcial na raiz e remoção total da raiz) de 5

repetições com 6 plantas, totalizando 90 plântulas. O material foi selecionado visando homogeneização e respeitando o princípio da aleatoriedade. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante à análise de variância, aplicando-se o teste F, com comparação das médias pelo teste Tukey (5% de probabilidade).

RESULTADOS

Características Biométricas

Plântulas *P. gardneriana* aclimatizadas aos 53 dias em casa de vegetação oriundas do cultivo *in vitro*, com presença de raiz, poda parcial na raiz e remoção total da raiz, pode ser observada na Figura 3 (A – C).



Figura 3. Plântulas de *P. gardneriana* Radlk aclimatizadas em casa de vegetação aos 53 dias. Plantas estas oriundas do cultivo *in vitro* com presença raiz (A), poda parcial na raiz (B) e remoção total raiz (C). Barra: 4 cm.

Plântulas aclimatizadas com raízes exerceram efeito positivo na biomassa vegetal (Figura 4), bem como na área foliar, número de folhas e segmentos nodais, MFF e MSF foram obtidos nas plântulas com raízes, médias de 33,21 cm²; 7,70 e 2,93, 410 e 122 mg, respectivamente, porém não diferenciou das plântulas com poda na raiz, médias de 27,01 cm²; 6,06; 2,39; 290 e 80 mg, respectivamente. Os menores valores foram na remoção total de raiz, médias de 15,27 cm²; 4,23; 1,69; 190 e 60 mg, respectivamente (Figura 4A - B).

Plântulas aclimatizadas com raízes tiveram maior investimento na formação de novas raízes. Maior área raiz, comprimento maior raiz, número raiz secundária, MFR e MSR foram observadas nas plântulas aclimatizadas com raízes, médias de 3,33 cm², 11,12 cm, 7,59, 240 e 35 mg, respectivamente. As menores médias, 1,00 cm², 2,82 cm, 0,79, 0,06 e 0,014 mg, respectivamente, foram obtidas quando houve remoção total das raízes (Figura 4 C e D).

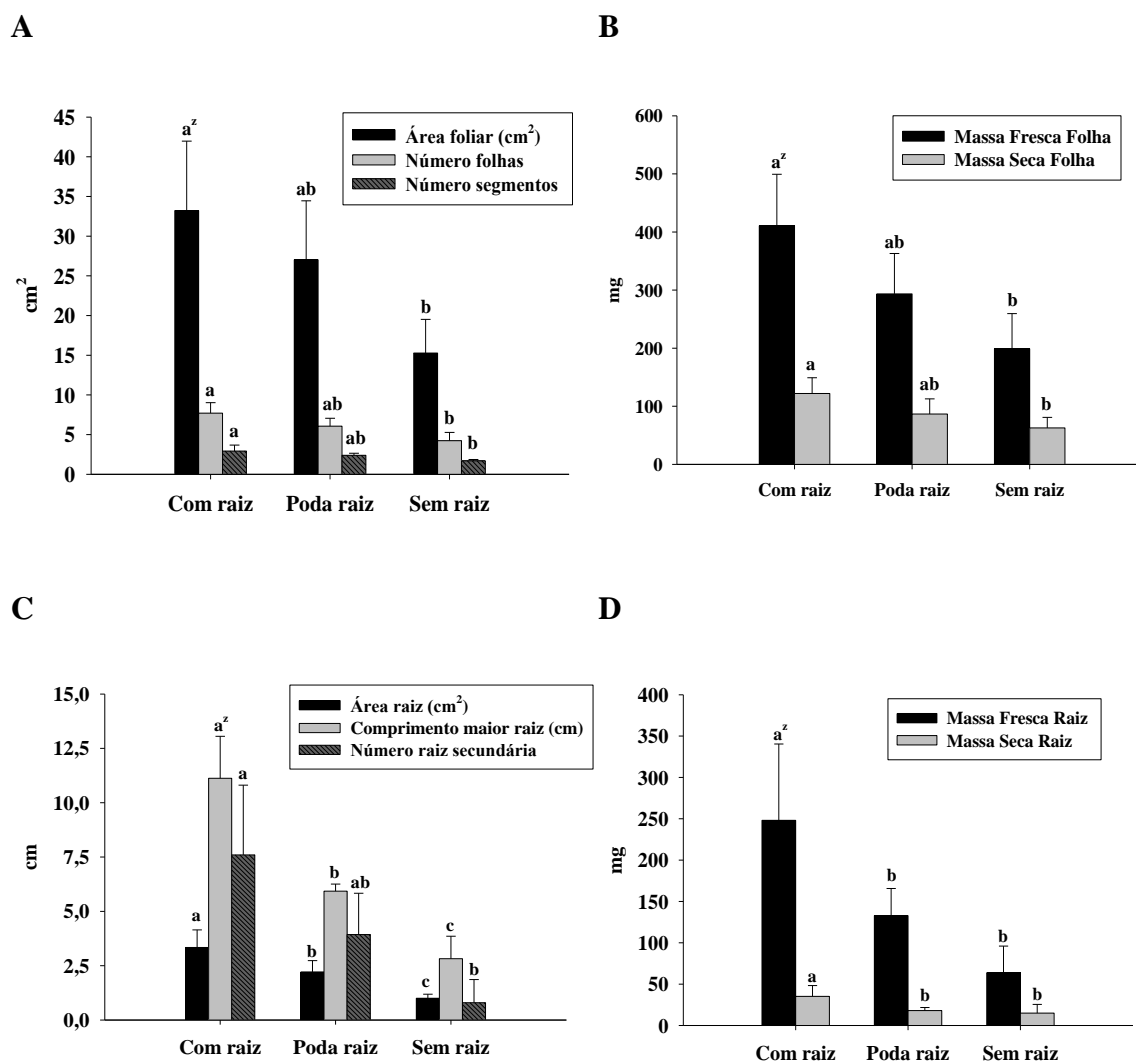


Figura 4- Área foliar de plântulas de *P. gardneriana*, número de folhas e número de segmentos (A), massa fresca folha e massa seca folha (B), área raiz, comprimento maior raiz, número de raiz secundária (C) e massa fresca e seca raiz (D), aos 53 dias de aclimatização em resposta a diferentes condições, com raiz, poda parcial na raiz e remoção total das raízes cultivadas *in vitro*. ^zMédias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 0,05 de probabilidade.

O comprimento das plântulas, número de raiz, porcentagem de sobrevivência, MFC e MSC não variou em função plântulas com raiz, poda na raiz e remoção total das raízes. As médias observadas para essas características foram de 5,11 cm; 2,50; 62,21%; 210 e 42 mg, respectivamente (Tabela 1). Portanto, independente das condições de raízes das plântulas oriundas do cultivo *in vitro*, a espécie demonstrou elevada porcentagem de sobrevivência durante a aclimatização.

Tabela 1- Comprimento da planta de *P. gardneriana* Radlk (cm), número de raízes, porcentagem de sobrevivência (%), Massa Fresca Caule (mg) e Massa Seca Caule (mg) aos 53 dias de aclimatização em resposta a diferentes condições, com raiz, poda parcial na raiz e remoção total das raízes cultivadas *in vitro*.

	Características Biométricas				
	Comprimento Plântula (cm)	Número de Raízes	Porcentagem Sobrevivência (%)	MFC (mg)	MSC (mg)
Com Raiz	5,61 ± 0,97 ^{NS}	2,83 ± 0,30	69,99 ± 9,72	230,0 ± 39,2	43,0 ± 6,56
Poda Raiz	4,89 ± 0,54	2,92 ± 0,30	56,66 ± 4,08	220,0 ± 23,1	40,0 ± 3,94
Sem Raiz	4,84 ± 0,30	1,76 ± 0,52	59,99 ± 8,49	200,0 ± 13,1	45,0 ± 3,10
Média	5,11 ± 0,60	2,50 ± 0,37	62,21 ± 7,43	210,0 ± 25,1	42,0 ± 4,53

^{NS} Não significativo pelo teste de F. ± Erro padrão da média.

Características Fisiológicas

Os maiores teores de clorofila *a*, *b*, total e taxa fotossintética (*A*) foram obtidos nas plântulas aclimatizadas com raízes (médias de 25,28; 7,02; 32,30 $\mu\text{g cm}^{-2}$ e 1,72 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente), e/ou com poda na raiz (médias de 21,45; 5,41; 26,86 $\mu\text{g cm}^{-2}$ e 1,22 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente), evidenciando a importância das raízes na aclimatização. As menores médias, 18,10, 4,31 e 22,41 $\mu\text{g cm}^{-2}$, 0,03 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente, foram obtidas quando houve remoção total das raízes (Figura 5 A e B).

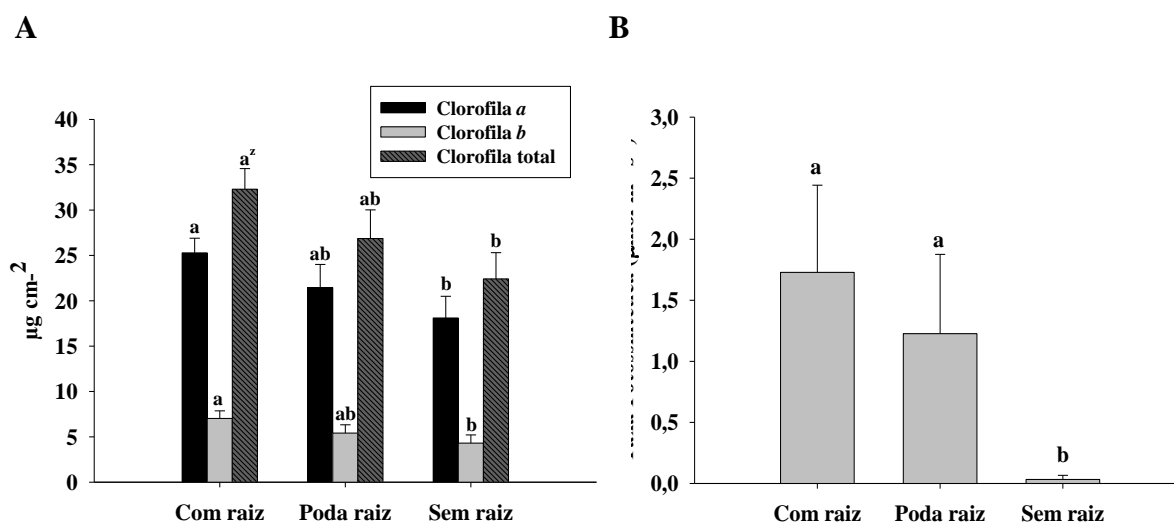


Figura 5- Clorofila *a*, *b*, total e taxa fotossintética (A) de plântulas de *P. gardneriana*, aos 53 dias de aclimatização em resposta a diferentes condições, com raiz, poda parcial na raiz e remoção total das raízes cultivadas *in vitro*. ^zMédias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 0,05 de probabilidade.

Taxa de transpiração, condutância estomática e relação Ci/Ca, avaliado aos 53 dias de aclimatização não houve diferença para plântulas com raiz, poda na raiz e remoção total das raízes. As médias observadas para essas características foram 0,41, 0,34 mol m⁻² s⁻¹ e 0,79 mol, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2- Taxa de transpiração de *Pouteria gardneriana* Radlk (*E*), condutância estomática (*G*_s), razão Ci/Ca, aos 53 dias de aclimatização em resposta a diferentes condições, com raiz, poda parcial na raiz e remoção total das raízes cultivadas *in vitro*.

	Características Fisiológicas		
	<i>E</i> (mol m ⁻² s ⁻¹)	<i>G</i> _s (mol m ⁻² s ⁻¹)	Relação Ci/Ca (mol)
Com Raiz	0,33 ± 0,11 ^{NS}	0,028 ± 0,01	0,67 ± 0,07
Poda Raiz	0,51 ± 0,22	0,042 ± 0,02	0,80 ± 0,10
Sem Raiz	0,40 ± 0,21	0,032 ± 0,02	0,92 ± 0,11
Média	0,41 ± 0,18	0,034 ± 0,01	0,79 ± 0,09

^{NS} Não significativo pelo teste de F. ± Erro padrão da média.

DISCUSSÃO

Plântulas de *P. gardneriana* cultivadas *in vitro* com raízes foi de grande importância no processo de aclimatização, sendo observado incremento na produção da biomassa tanto parte aérea quanto radicular. Sabe-se que a aclimatização é uma etapa crítica do processo de micropropagação, as mudas micropropagadas ao serem retiradas do ambiente *in vitro* (heterotrófico) e transferidas para condições *ex vitro* (autotrófico) passam por adaptações que garantam suas atividades fisiológicas, morfológicas, permitindo sua sobrevivência (Wagner Júnior et al., 2012).

O enraizamento *in vitro* sem uso de regulador de crescimento representa uma vantagem econômica, pois reflete na imediata redução de custos, prática visada na automação da micropropagação. A formação de raízes *in vitro* sem reguladores de crescimento provavelmente ocorre pelo acúmulo de auxinas endógenas provenientes de folhas e principalmente de gemas formadas nas brotações regeneradas, resultando em aumento da atividade metabólica do tecido e, conseqüentemente translocação de auxina endógena para as raízes (Vieira et al., 2014).

Os resultados observados no presente trabalho mostram a dependência da fase de enraizamento *in vitro* durante a formação das mudas de *P. gardneriana* na técnica de micropropagação. Resultados semelhantes ao trabalho de Prudente et al. (2016) obtiveram sucesso na aclimatização de *Miconia ligustroides* (DC) Naudin., quando enraizadas *in vitro* em meio de cultivo MS e sem adição de reguladores de crescimento.

Para obtenção de mudas de *P. gardneriana* bem formadas durante a fase de enraizamento (pré-aclimatização) e aclimatização, visando aumentar a taxa de sobrevivência destas, verificou no presente estudo que aos 53 dias de aclimatização não houve diferença entre os fatores para taxa de sobrevivência, média de 62,2 %. Dados semelhantes foram observados para *Calophyllum brasiliense* (Cambess.), em que plântulas com 90 dias de cultivo e enraizadas *in vitro* quando aclimatizadas tiveram taxa de sobrevivência 60% (Silveira et al., 2016). De acordo com Reis et al. (2008) em estudo com *Melissa officinalis* L., obtiveram 70% taxa de sobrevivência quando aclimatizou plantas enraizadas *in vitro*.

Embora não tenha observado diferença na porcentagem de sobrevivência das plântulas, verificou-se maior performance nas plântulas aclimatizadas com raiz, obtendo maior área foliar, número de folhas, número de segmentos, MFF e MSF, área de raiz, comprimento maior raiz, número de raiz secundárias, MFR e MSR, fato que comprova a importância das raízes formadas *in vitro* para processo de aclimatização. Dados

corroborar com Braga et al., (2010) em estudos com *Crisântemo c.v. Rage*, obtiveram aumento número de folhas, raízes, comprimento parte aérea e raízes quando as plântulas com raízes foram aclimatizadas com 53 dias em casa de vegetação.

Plântulas com poda na raiz tiveram redução no comprimento da maior raiz (5,93 cm) quando comparada com as plântulas com raiz (11,12 cm). Em estudos com *Triticum aestivum* L., verificou-se que a poda na raiz reduziu o comprimento da raiz, massa seca raiz, menor área foliar, indicando que as plantas possuem mecanismo controlador que equilibra relação parte aérea e raiz (Li et al., 2013).

Neste estudo foi possível avaliar a capacidade fotossintética das plântulas aclimatizadas, e foi constatado maior conteúdo de clorofila *a*, *b* e total e a taxa fotossintética (*A*) quando as mesmas foram aclimatizadas com raízes. O conteúdo de clorofila é importante parâmetro que determina o padrão fotossintético e analisa o crescimento vegetal.

Verificou-se que as plântulas enraizadas *in vitro* dispõem de vantagens na aclimatização, uma vez que essa etapa é crítica, podendo comprometer todo o sistema de produção de mudas obtidas por essa técnica (Santos et al., 2013). Tais vantagens tornam importantes uma vez que taxa de sobrevivência é um fator fundamental nesse processo.

Os resultados obtidos neste estudo são contribuições que poderão otimizar a propagação *in vitro* em larga escala de *P. gardneriana* Radlk, visando futuros estudos com a espécie com adição de bactérias (*Acinetobacter sp* e *Enterobacter ludwigii*) visando aumentar taxa de sobrevivência na aclimatização e obtenção maior biomassa tanto parte aérea quanto radicular.

CONCLUSÃO

Plântulas de *Pouteria gardneriana* Radlk com raízes formadas *in vitro* demonstrou ser importante fator na fase de aclimatização obtendo maior biomassa da parte aérea e radicular e maior taxa fotossintética, garantindo a sobrevivência, visando produção de mudas de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barboza, S. B. S. C., Graciano-Ribeiro, D., Teixeira, J. B., Portes, T. A., Souza, L. A. C. (2006). Leaf anatomy of micropropagated pineapple plants. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 2, p. 185-194.

Braga, F. T., Pasqual, M., Castro, E. M., Dignart, L., Rafael, G. C., Nunes, C. F. (2010). Natural light and seal systems on *in vitro* propagation of chrysanthemum cv. rage: anatomical and physiological alterations. *Plant Cell Culture Micropropagation*, v. 6, n. 2, p. 83-89.

Cabral, J. S. R., Sales, J. F., Silva, F. G., Branquinho, A. C., Oliveira, R. C. (2013). Physiological quality of guapeva (*Pouteria gardneriana* Radlk.) seeds during storage. *Global Science and Technology*, v. 6, n. 1, p.127–133.

Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., Chandra, R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology letters*, v. 32, n. 9, p. 1199-1205.

Damiani, C., Boas, V., Barros, E. V., Asquieri, E. R., Lage, M. E., Oliveira, R. A., Silva, F.A., Pinto, D.M., Rodrigues, L.J., Silva, E.P., Paula, N. R. F. (2011). Characterization of fruits from the savanna: Araça (*Psidium guinnensis* Sw.) and Marolo (*Annona crassiflora* Mart.). *Food Science and Technology*, v. 31, n. 3, p. 723-729.

Duboc, E. (2008). Sistemas agroflorestais e o Cerrado. Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. *Embrapa Cerrados*, p. 965-985.

Kumar, K., Rao, I. U. (2012). Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in–*ex Vitro* conditions-A Review. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*, v. 2, n. 4, p. 271-283.

Li, F. M., Yang, S. J., Li, C. X., Xu, B. C., Zhang, X. C. (2013). Effects of root pruning on non-hydraulic root-sourced signal, drought tolerance and water use efficiency of winter wheat. *Journal of Integrative Agriculture*, v. 12, n. 6, p. 989-998.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. v. 15, n. 3, p. 473-497.

Nomura, E. S., Lima, J. D., Garcia, V. A., Rodrigues, D. S. (2008). Crescimento de mudas micropropagadas da bananeira cv. Nanicão, em diferentes substratos e fontes de fertilizante. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 30, n. 3, p. 359-363.

Oliveira, J. P., Costa, F. H. S., Pereira, J. E. S. (2008). Growth of micropropagated banana plantlets acclimatized on conditions of South West Amazon under the influence of different substrates and recipients. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30, n. 2, p. 459-465.

Pinhal, H. F., Anastácio, M. R., Carneiro, P. A. P., Silva, V. J. D., Morais, T. P. D., Luz, J. M. Q. (2011). Applications of tissue culture techniques in Brazilian Cerrado fruit trees. *Ciência Rural*, v. 41, n. 7, p. 1136-1142.

Prudente, D. O., Nery, F. C., Paica, R., Reis, M. V., Paiva, P. D. O., Nery, M. C. (2016). Cultivo *in vitro* de *Miconia ligustroides* (D.C.) Naudim. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, v. 12, n. 1, p. 13-19.

Reis, É. S., Pinto, J. E. B. P., Rosado, L. D. S., Corrêa, R. M. (2008). Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. *Revista Ceres*, v. 55, n. 3, p. 160-167.

Resende, S. V., Lima-Brito, A., Santana, J. R. F. (2010). Effect of substrate and rooting on acclimatization of *in vitro* propagated *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo. *Revista Ceres*, v. 57, n. 6, p. 803-809.

Rocha, W. S., Lopes, R. M., Silva, D. B. D., Vieira, R. F., Silva, J. P. D., Agostini-Costa, T. D. S. (2011). Total phenolics and condensed tannins in native fruits from brazilian savanna. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 4, p. 1215-1221.

Santos, E. M., Azevedo, B. M., Marinho, A. B., Carvalho, A. C. P. P., Saraiva, K. R. (2013). Acclimatization of micropropagated seedlings of *Torch Lily* in containers of different capacities. *Revista Ceres*, v. 60, n. 1, p. 134-137.

Silveira, S. S., Cordeiro-Silva, R., Degenhardt-Goldbach, J., Quoirin, M. (2016). Micropropagation of *Calophyllum brasiliense* (Cambess.) from nodal segments. *Brazilian Journal of Biology*, v. 76, n. 3, p. 656-663.

Souza, G. L., Ribeiro, M. C. C., Cardoso, E. A., Pires, G. S, Souza, P. A. (2006). Efeito da época de poda do sistema radicular no crescimento de mudas de Algarobeira. *Revista Caatinga*, v. 19, n. 3, p. 250-254.

Vieira, R. L., Silva, A. L. D., Zaffari, G. R., Feltrim, A. L. (2014). *In vitro* morphogenesis of garlic plants: The role of growth regulators in bulb induction and development. *Ciência Rural*, v. 44, n. 3, p. 439-445.

Vieira, R. F., Agostini-Costa, T., Silva, D. B., Ferreira, F. R., Sano, S. M. (2006). *Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 320 p.

Wagner Júnior, A., Franzon, R. C., Couto, M., Conceição, P. C., Fortes, G. R. L. (2012). Níveis de vermiculita em mistura de substrato na aclimatização de plantas de amoreira-preta “Tupy”. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 18, n. 2-4, p. 188-195.

CONCLUSÕES GERAIS

- O cultivo *in vitro* de plântulas de *Pouteria gardneriana* Radlk é uma alternativa viável para a produção de mudas da espécie.
- A suplementação com alumínio no meio de cultivo causou alterações estruturais nas características biométricas e anatômicas, porém não verificou danos fisiológicos para espécie de *P. gardneriana* Radlk cultivadas *in vitro*.
- Verificou-se que as diferentes PPFD utilizadas neste estudo foram suficientes para compreender o comportamento desta espécie *in vitro*, visando assim maior produção de mudas com qualidade.
- A PPFD de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ levaram a maior acúmulo de biomassa e certa adaptabilidade anatômica com a expansão foliar do parênquima paliçádico.
- Plântulas de *P. gardneriana* Radlk cultivadas *in vitro* com raiz exerceu maior acúmulo de biomassa favorecendo processo de aclimatização.
- Sacarose ao meio de cultivo é essencial para regeneração das plântulas *P. gardneriana* Radlk passíveis de serem aclimatizadas.