

Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*

Juliana Lischka Sampaio Mayer¹, Luciana Lopes Fortes Ribas¹, Cleusa Bona^{1,2} e Marguerite Quoirin¹

Recebido em 23/10/2006. Aceito em 11/06/2007

RESUMO – (Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*). Na fase de cultivo *in vitro*, as plantas são mantidas em ambiente com alta umidade relativa do ar, baixa luminosidade e trocas gasosas restritas, o que resulta em taxa de transpiração reduzida. Portanto, quando essas mudas são expostas ao meio *ex vitro*, sofrem estresse que pode causar a morte. O objetivo desse trabalho foi comparar a estrutura anatômica das mudas de *Cymbidium* ‘Joy Polis’ cultivadas *ex vitro* (planta matriz e aclimatizada) e *in vitro* e verificar se a estrutura anatômica das plantas *in vitro* influencia no processo de aclimatização. As plantas *ex vitro* foram mantidas em casa-de-vegetação, em vasos individuais com o substrato fibra de coco em pó combinada com fibra de coco, e as plantas *in vitro* foram mantidas em meio de cultura MS. Para a análise anatômica qualitativa foram coletadas amostras de folhas e raízes de plantas *ex vitro* e *in vitro*. As plantas aclimatizadas apresentaram estrutura morfoanatômica semelhante à da planta matriz. A estrutura anatômica das plantas *in vitro* não influenciou a sobrevivência das mudas durante a aclimatização devido à plasticidade fenotípica desse cultivar. As plantas de *Cymbidium* ‘Joy Polis’ possuem grande capacidade de aclimatização ao ambiente, sendo provavelmente este um dos fatores responsáveis pela sobrevivência de 100% das mudas.

Palavras-chave: orquídea, cultura *in vitro*, morfologia, aclimatização

ABSTRACT – (Comparative leaf and root anatomy of *ex vitro* and *in vitro* cultured *Cymbidium* Hort. plants). During *in vitro* culture plants are kept in an atmosphere with high relative humidity, low light intensity and reduced gas exchange, resulting in low transpiration rates. Therefore, when these plants are exposed to *ex vitro* conditions, they suffer stress, which can induce mortality. The purpose of this study was to compare the anatomical structure of *Cymbidium* ‘Joy Polis’ plants from *ex vitro* (mother plant and acclimatized plants) and *in vitro* cultures and to verify if the anatomical structure of *in vitro* cultured plants affects acclimatization. The *ex vitro* plants were kept in a greenhouse in pots containing a mixture of coconut-fiber powder and coconut fiber. The *in vitro* plants were kept in MS culture medium. For the qualitative anatomical analysis, samples of leaves and roots were collected from *ex vitro* and *in vitro* plants. The acclimatized plants presented morphological and anatomical structure similar to the mother plant. The anatomical structure of *in vitro* plants did not affect plant survival during the acclimatization process, as this cultivar has great phenotypic plasticity. *Cymbidium* ‘Joy Polis’ plants have high capacity of adaptation to the environment and this characteristic is likely to be responsible for their survival rate of 100% during acclimatization.

Key words: orchid, *in vitro* culture, morphology, acclimatization

Introdução

As orquídeas do gênero *Cymbidium* Hort. estão entre as comercialmente mais importantes no mundo, sendo esse gênero muito popular no Japão (Begum *et al.* 1994). É constituído de numerosas espécies e plantas híbridas, artificialmente melhoradas (Lorenzi & Souza 2001).

A micropropagação é utilizada para a propagação clonal em grande escala de plantas comercialmente importantes, como, por exemplo, espécies da família Orchidaceae. As maiores vantagens do cultivo *in vitro* são a multiplicação rápida e a obtenção de populações

homogêneas oriundas de matrizes melhoradas geneticamente (Govil & Gupta 1997). Os métodos convencionais de propagação vegetativa pela separação, divisão de touceiras ou de pequenas mudas que se formam nos rizomas e em hastes florais são extremamente lentos, apesar de proporcionarem uma descendência geneticamente idêntica à planta matriz (Sagawa & Kunisaki 1984).

Plantas micropropagadas, quando em ambiente *in vitro*, crescem sob alta umidade relativa do ar (UR%), baixa luminosidade e trocas gasosas restritas, resultando em baixas taxas de transpiração e fotossíntese (Shackel *et al.* 1990). Durante o processo

¹ Universidade Federal do Paraná, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Jardim das Américas, C. Postal 19031, 81531-970 Curitiba, PR, Brasil

² Autor para correspondência: cleusabona@ufpr.br

de aclimatização em casa-de-vegetação das plantas crescidas *in vitro*, ocorrem mudanças morfológicas, anatômicas e fisiológicas, tornando-as capazes de crescer nesse novo ambiente (Sutter *et al.* 1992). Esse processo pode causar estresse para as plantas, sendo um fator limitante no processo da micropropagação (Sutter 1988). Em angiospermas, a cutícula delgada, os estômatos não funcionais e o parênquima paliçádico pouco desenvolvido são citados como a principal causa da mortalidade de plantas transferidas de um ambiente *in vitro* para um *ex vitro* (Brainerd & Fuchigami 1982; Dhawan & Bhojwani 1987; Reuther 1988; Díaz-Pérez *et al.* 1995).

Os estômatos das plantas *in vitro* podem se apresentar levemente projetados e abertos, com diferentes tamanhos e formatos e não uniformemente distribuídos (Donnelly & Vidaver 1984; Johansson *et al.* 1992). Também pode haver redução no número de elementos condutores, como registrado por Albarello *et al.* (2001) em *Rollinia mucosa*. Essas alterações anatômicas nas plantas cultivadas *in vitro* podem inviabilizar a aclimatização das mesmas (Albarello *et al.* 2001).

O objetivo desse trabalho foi comparar a estrutura anatômica das mudas de *Cymbidium* 'Joy Polis' cultivadas *ex vitro* (planta matriz e aclimatizada) e *in vitro* e verificar se a estrutura anatômica das plantas *in vitro* influencia o processo de aclimatização.

Material e métodos

Híbridos de *Cymbidium* 'Joy Polis' de cinco anos de idade cultivados *ex vitro* (planta matriz) foram mantidos em casa-de-vegetação em vasos individuais com fibra de coco natural e em pó, como substrato, na proporção 1:1. As plantas cultivadas *in vitro* foram obtidas de brotações laterais de 5-7 cm de comprimento da planta matriz, das quais foram retirados meristemas das gemas laterais. Os meristemas foram cultivados em meio de Murashige & Skoog (1962) (MS), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar (Vetec®), com pH ajustado para 5.8 antes da autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos. As plantas *in vitro* estavam enraizadas e o tempo de permanência *in vitro* foi de oito meses. As plantas regeneradas com 4 a 6 folhas, de 2-3 cm de comprimento, apresentando raízes, foram removidas do meio de cultura, lavadas com água e transferidas para vasos individuais com 5,5 cm de diâmetro e 4 cm de altura. Estas foram aclimatizadas por 45 dias no mesmo substrato utilizado para a planta matriz. Permaneceram em casa-de-

vegetação com nebulização intermitente por cinco dias. No sexto dia passaram a ser irrigadas conforme a necessidade. A temperatura e UR% mínima e máxima da casa-de-vegetação foram 11,1 °C e 25,1 °C e 54% e 99%, respectivamente.

Foram coletadas amostras de folhas e raízes de plantas *ex vitro* (matrizes e aclimatizadas) e *in vitro*, as quais foram fixadas em FAA 70 (Johansen 1940). Esses materiais foram destinados à preparação de lâminas permanentes, sendo incluídos em 2-hidroxietilmeta-acrilato (historresina-Leica), segundo a técnica de Feder & O'Brien (1968) e as indicações do fabricante. Os blocos foram seccionados em micrótomo de rotação; os cortes foram obtidos com 7 µm de espessura e corados com azul de toluidina (Feder & O'Brien 1968). As lâminas foram montadas com resina sintética (Permalte®). As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Zeiss com câmera digital Sony Cyber-shot P200® acoplada. Testes microquímicos com lugol e cloreto férrico foram utilizados para detecção de amido nos ápices de raiz e de compostos fenólicos nas folhas, respectivamente.

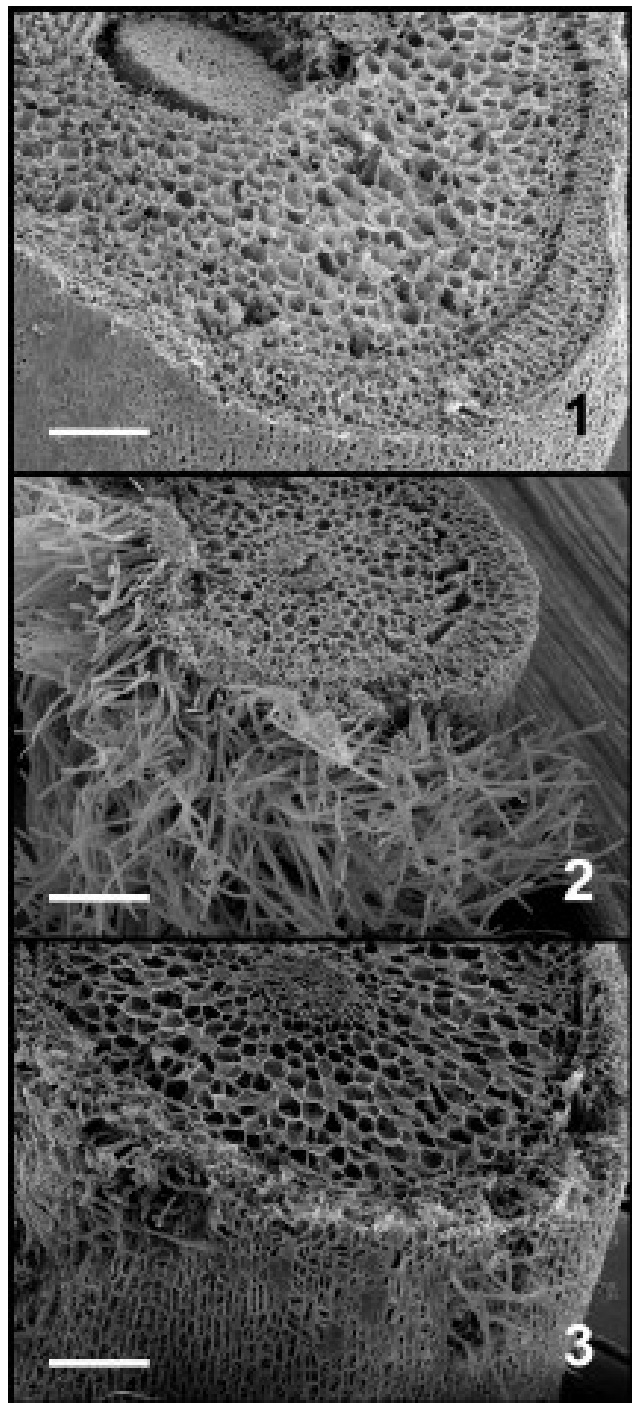
Para a análise da superfície epidérmica das folhas e análise das raízes em microscopia eletrônica de varredura (MEV), o material botânico foi fixado em FAA 70 (Johansen 1940), desidratado em série etílica, e posteriormente pelo método do ponto crítico com CO₂ no aparelho Bal-Tec CPD 030. Após o ponto crítico, o material foi colado em suportes metálicos e metalizado com ouro, a vácuo, no equipamento Balzers union FL 9496 SCD 030. A análise e o registro eletromicrográfico foram realizados com microscópio eletrônico de varredura Jeol (JSM 6360 LV), no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Resultados

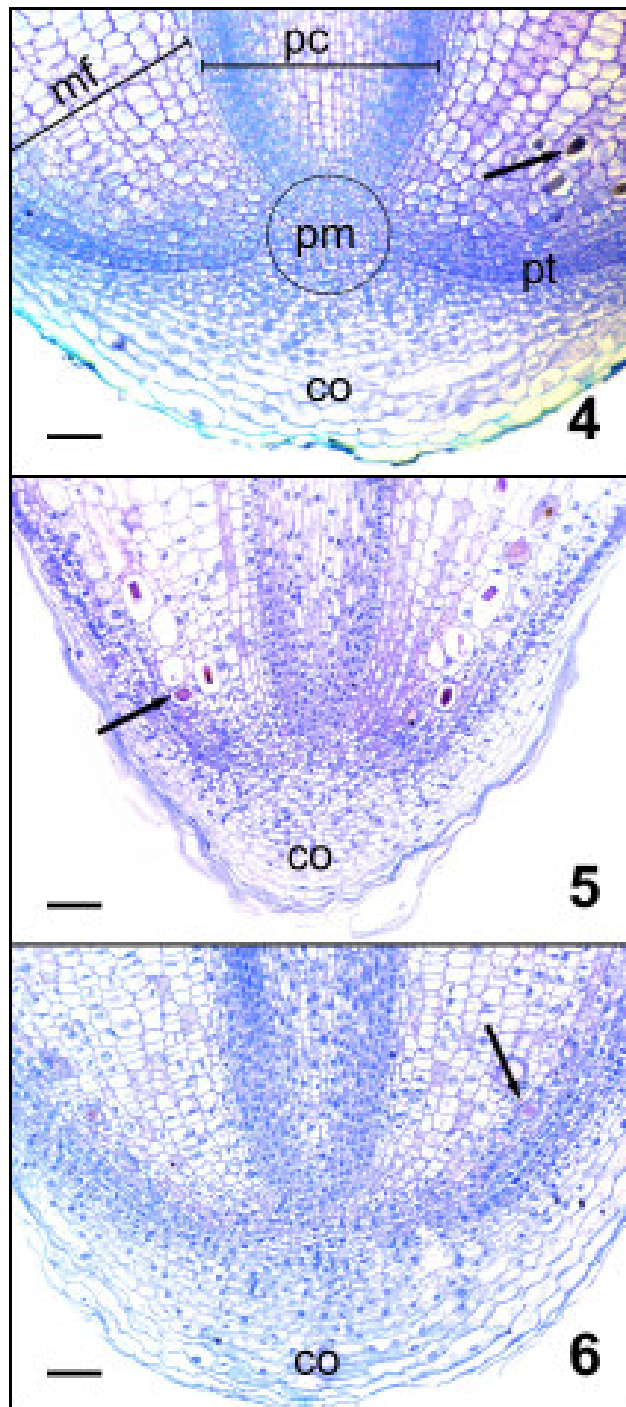
As plantas aclimatizadas nas condições experimentais deste trabalho apresentaram 100% de sobrevivência. O teste com lugol não evidenciou a presença de amido em nenhuma das plantas nos três ambientes. Na raiz da planta matriz, é possível observar a ausência de pêlos radiculares e maior diâmetro (Fig. 1). Ao contrário, a planta cultivada *in vitro* apresenta grande quantidade de pêlos radiculares e menor diâmetro (Fig. 2). Nas plantas aclimatizadas, os pêlos radiculares ocorrem em grupos dispersos (Fig. 3). As raízes das plantas cultivadas *in vitro* apresentam gravitropismo negativo, mas durante a aclimatização essas tornam a crescer normalmente.

O ápice da raiz da planta matriz, em secção longitudinal, apresenta promeristema com iniciais comuns que originam a coifa, protoderme, meristema fundamental e procâmbio (Fig. 4). O formato do ápice de raiz da planta matriz é obtuso enquanto o da planta

in vitro é mais agudo (Fig. 4-5). Na planta *in vitro* as camadas meristemáticas apresentam células com citoplasma menos denso (Fig. 5). Já nas plantas aclimatizadas (Fig. 6), o meristema apical e a coifa se assemelham a raízes da planta matriz. No meristema



Figuras 1-3. Eletromicrografias da raiz de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes ambientes de cultivo. 1. Planta cultivada no ambiente *ex vitro*. 2. Planta cultivada no ambiente *in vitro*. 3. Planta aclimatizada. Barras = 500 μ m.



Figuras 4-6. Secções longitudinais do ápice de raiz de *Cymbidium* 'Joy Polis'. 4. Planta cultivada no ambiente *ex vitro*. 5. Planta cultivada no ambiente *in vitro*. 6. Planta aclimatizada. co = coifa. mf = meristema fundamental. pc = procâmbio. pm = promeristema. pt = protoderme. seta = idioblastos com ráfides. Barras = 100 μ m.

fundamental das plantas cultivadas nos três ambientes ocorrem idioblastos contendo ráfides, estando em maior número na planta *in vitro* (Fig. 4-6).

A raiz da planta matriz em corte transversal tem características típicas da família Orchidaceae, como velame, córtex com exoderme e endoderme bem definidas e cilindro vascular poliarco. O velame das raízes da planta matriz é constituído por nove camadas de células. As células da exoderme possuem paredes periclinais externas e anticlinais espessadas, estando alternadas com células de passagem. O parênquima cortical é constituído de 14 a 16 camadas de células ligeiramente alongadas no sentido radial (Fig. 7). A endoderme é unisseriada com células espessadas em O nas regiões opostas ao floema e células de passagem opostas ao xilema. O periciclo também apresenta porções com células de parede espessada próximas ao floema e de parede delgada próximas ao xilema. O cilindro vascular é composto de 15 pólos floemáticos e xilemáticos, e medula parenquimática. O floema é totalmente envolvido por células de paredes espessadas (Fig. 8).

Nas plantas cultivadas *in vitro*, a raiz em secção transversal, possui diâmetro reduzido (Fig. 9). O velame é constituído de duas a três camadas e a exoderme e endoderme possuem células com paredes pouco espessadas (Fig. 9-10). O córtex é menos desenvolvido, com células arredondadas, delimitando espaços intercelulares maiores que na planta matriz (Fig. 9-10). O cilindro vascular é sólido com cinco pólos de floema e xilema envolvidos por células de paredes finas (Fig. 10).

As raízes das plantas aclimatizadas ainda apresentam velame com três a quatro camadas de células, mas as células da exoderme voltam a ter formato semelhante à planta matriz e há espessamento na parede periclinal externa. A endoderme não apresenta paredes espessadas como na planta matriz, somente leve espessamento de parede nas células próximas ao floema. O córtex é semelhante ao da planta matriz (Fig. 11). O cilindro vascular apresenta medula reduzida e sete pólos de floema e xilema, e o floema é envolvido por células de paredes ligeiramente espessadas (Fig. 12).

Os estômatos das folhas da planta matriz encontram-se levemente abaixo da linha das demais células epidérmicas, com pequenos ostíolos (Fig. 13-14). Os estômatos das plantas *in vitro* são levemente projetados acima da epiderme, e o ostíolo é aparentemente, maior (Fig. 15-16). Nas plantas aclimatizadas, o ostíolo é relativamente grande e os estômatos já retornam à posição levemente abaixo do

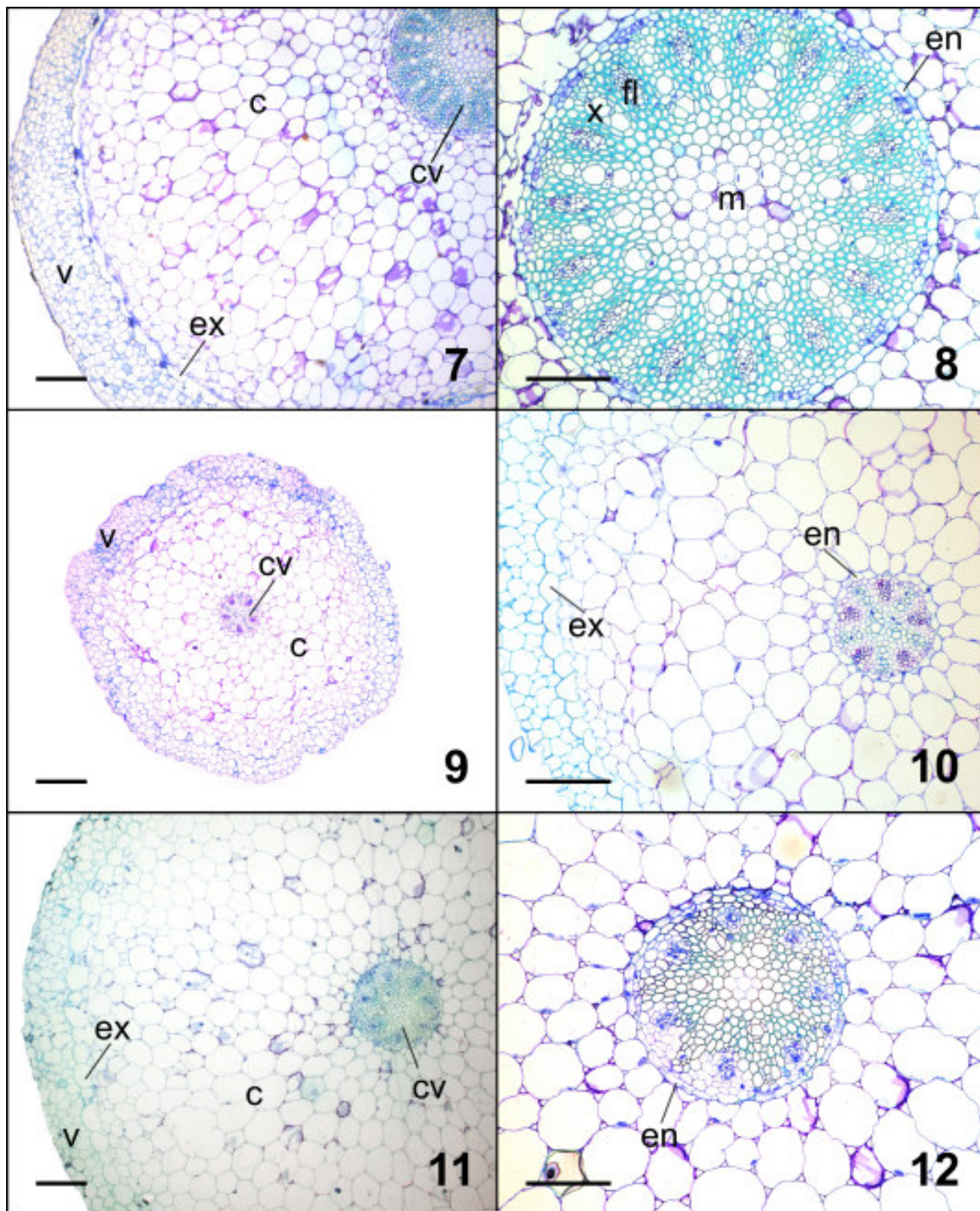
nível das demais células epidérmicas (Fig. 17-18). A disposição dos estômatos, paralelos ao maior eixo da folha, é igual nos três ambientes, no entanto o formato do estômato é ligeiramente mais arredondado nas plantas *ex vitro*.

Em secção transversal, as folhas das plantas nos três ambientes apresentam células epidérmicas da face adaxial maiores que as da face abaxial. Como observado em vista frontal, os estômatos ocorrem em posição ligeiramente aprofundada nas folhas da planta matriz (Fig. 19-20) e abertos e projetados acima das células epidérmicas nas folhas das plantas *in vitro* (Fig. 21-22). A cutícula é mais espessa nas plantas matrizes, muito delgada nas plantas *in vitro* e intermediária nas plantas aclimatizadas (Fig. 20, 22 e 24). O mesofilo é homogêneo com células arredondadas e de maior tamanho na região central em todos os ambientes. Feixes de fibras estão dispostos próximos às faces adaxial e abaxial ao longo de toda a folha da planta matriz (Fig. 19-20). Nas plantas *in vitro* e aclimatizadas, as folhas são mais delgadas e possuem feixes de fibras menos evidentes e com paredes mais delgadas. O mesofilo das plantas matrizes possui células com conteúdo celular mais denso pela maior quantidade de cloroplastos e compostos fenólicos (Fig. 23-24).

Na região da nervura central das folhas da planta matriz, ocorre uma proeminência na face abaxial com feixe vascular de grande porte do tipo colateral, sendo o floema totalmente envolvido por fibras (Fig. 19). Já nas folhas das plantas *in vitro*, o feixe vascular da nervura central é pouco desenvolvido, com uma menor proporção de fibras ao redor do floema, quando comparado a folhas da planta matriz (Fig. 19 e 21). Nas folhas das plantas aclimatizadas, a nervura central é mais proeminente que na planta matriz e *in vitro*. O feixe vascular nessa região ainda é menos desenvolvido que nas folhas da planta matriz (Fig. 23). No mesofilo de todas as plantas são observados idioblastos contendo ráfides (Fig. 23-24).

Discussão

No presente trabalho foi observado gravitropismo negativo nas raízes das plantas cultivadas *in vitro* como registrado por Werckmeister (1971). Este autor observou que raízes de *Cymbidium* cultivadas em meio de cultura na ausência do carvão ativado se desenvolviam para cima, em direção à luz. Segundo o autor, com a adição de carvão ativado, elas passavam a crescer para dentro do meio de cultura. Como o teste com lugol não evidenciou a presença de amido em

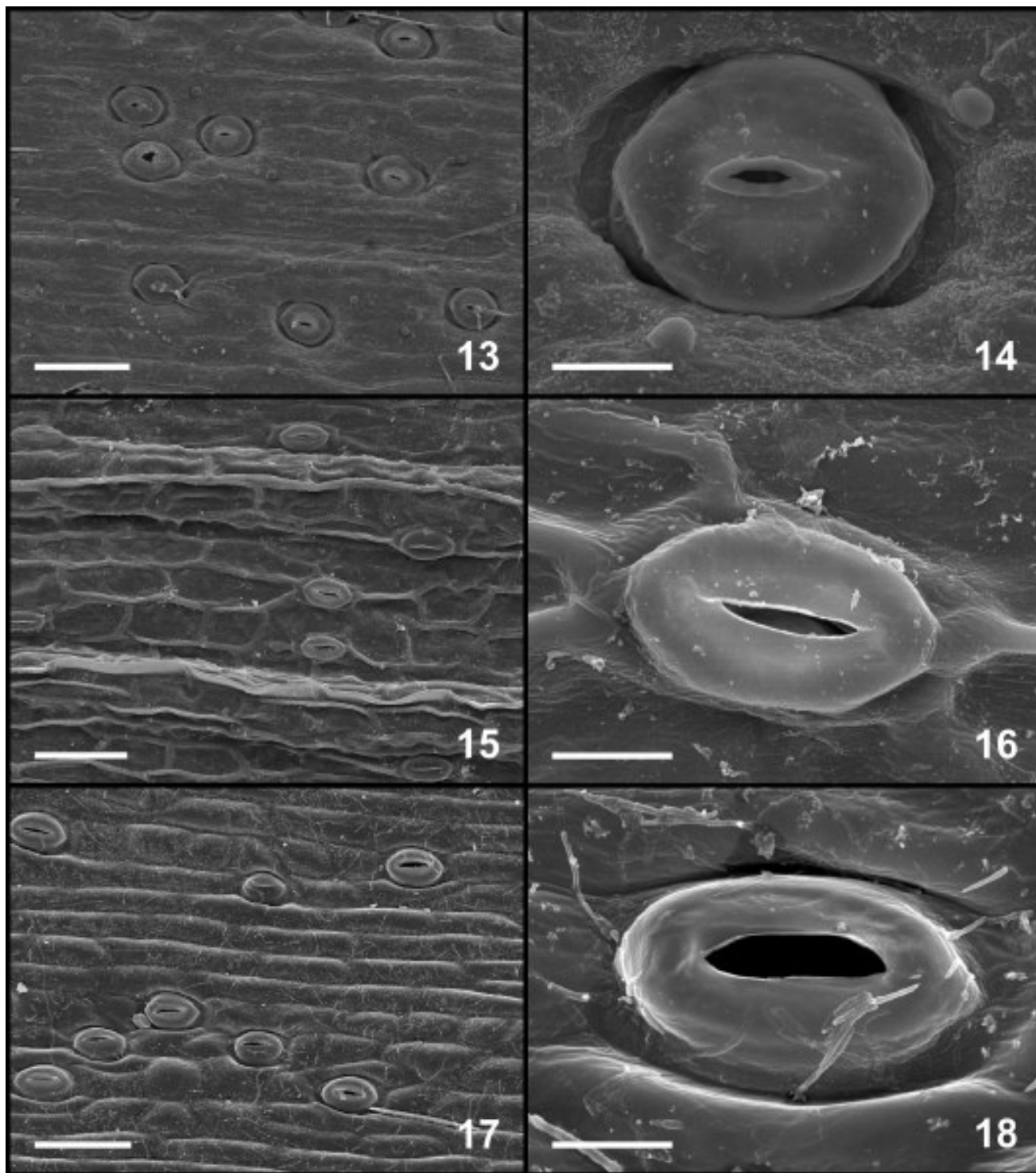


Figuras 7-12. Secções transversais da raiz de *Cymbidium* 'Joy Polis'. 7-8. Planta cultivada no ambiente *ex vitro*. 9-10. Planta cultivada no ambiente *in vitro*. 11-12. Planta aclimatizada. c = córtex. cv = cilindro vascular. ex = exoderme. en = endoderme. fl = floema. m = medula. x = xilema. v = velame. Barras = 7, 9 e 11 = 300 μ m; 8, 10 e 12 = 200 μ m.

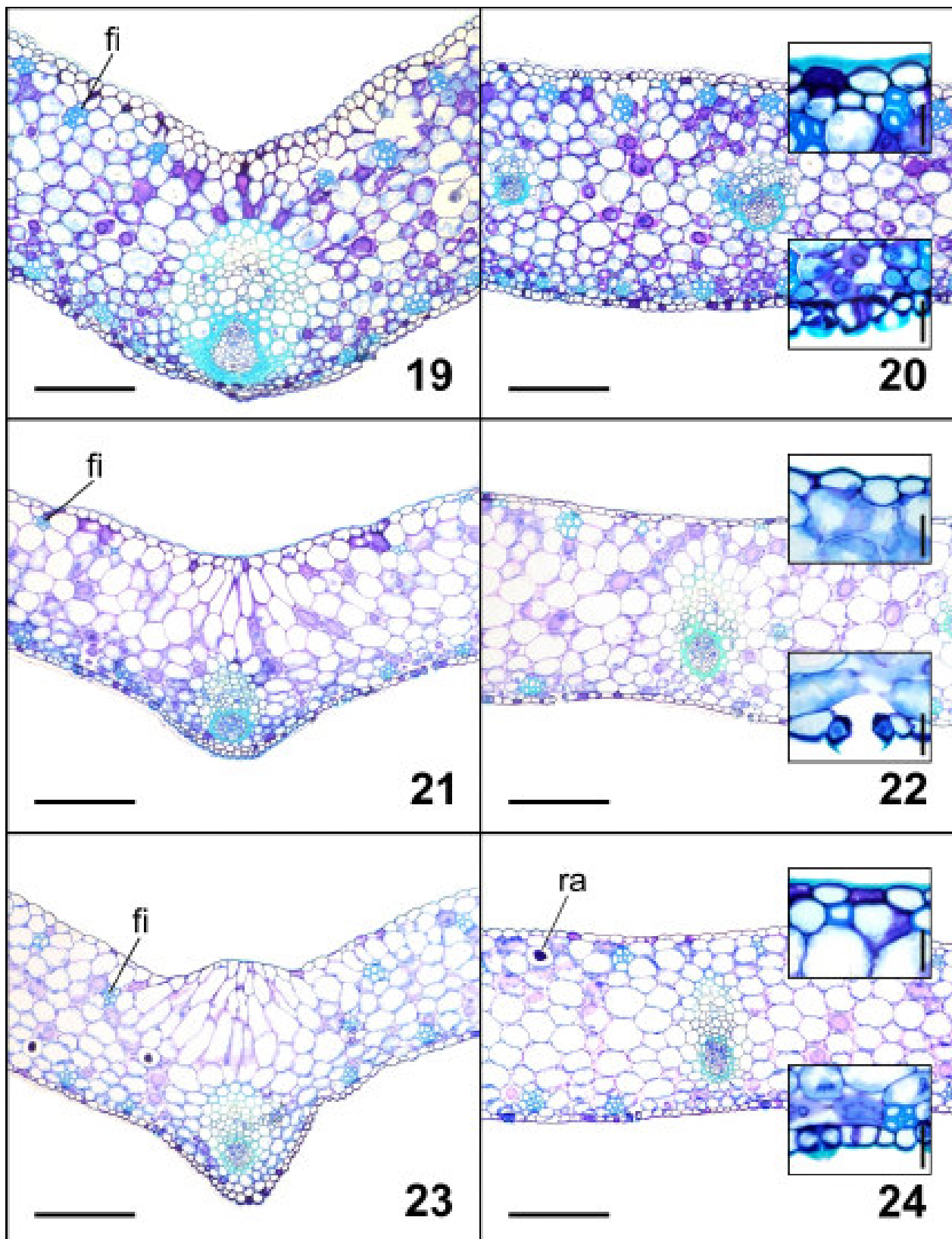
nenhuma das plantas nos três ambientes, nessas condições experimentais, não se pode relacionar o gravitropismo negativo à ausência de estatólitos.

O número de camadas do velame em *Cymbidium*

variou conforme o ambiente de cultivo. Plantas *in vitro*, apresentaram drástica redução no número de camadas de células, provavelmente devido ao ambiente protegido e com alta umidade relativa. Portanto, nossas



Figuras 13-18. Vista frontal da epiderme da face abaxial de folhas de *Cymbidium* 'Joy Polis' em diferentes ambientes de cultivo. 13-14. Planta cultivada no ambiente *ex vitro*. 15-16. Planta cultivada no ambiente *in vitro*. 17-18. Planta aclimatizada. Barras = 13, 15 e 17 = 2500 μ m; 14, 16 e 18 = 50 μ m.



Figuras 19-24. Secções transversais da nervura e do limbo de *Cymbidium* 'Joy Polis'. 19-20. Planta cultivada no ambiente *ex vitro*. 21-22. Planta cultivada no ambiente *in vitro*. 23-24. Planta aclimatizada. 20, 22 e 24. Observar detalhe da epiderme de ambas as faces. fi = fibras, ra = idioblatos com ráfides. Barras = 200 μ m. Barras do detalhe da epiderme = 25 μ m.

observações mostram que a mesma espécie pode variar a espessura do velame de acordo com a umidade atmosférica, ficando evidente a função de reserva de umidade como proposto por Benzing *et al.* (1982). Esses autores acreditam que o velame das orquídeas atua como uma esponja, permitindo à raiz manter um reservatório temporário de umidade e sais minerais. Essa função também foi admitida por Pita & Menezes (2002) ao analisarem espécies de *Dyckia* (Bromeliaceae) de ambiente xérico. Sanford & Adanlawo (1973) citam que espécies com velame mais espesso são nativas de florestas áridas e Silva & Milaneze-Gutierrez (2004) observaram que o número de camadas de células no velame e no córtex varia conforme a espécie.

Devido à estrutura anatômica delicada (diâmetro e sistema vascular reduzidos) das raízes *in vitro*, nas plantas aclimatizadas novas raízes se formaram e as raízes formadas *in vitro* cessam o crescimento, sendo provavelmente pouco eficientes. Pierik (1990) também observou que as raízes produzidas *in vitro* são fracas e pouco funcionais. Donnelly *et al.* (1985) observaram que raízes de framboesa cultivadas *in vitro* são delgadas e recobertas por pêlos radiculares diferindo das raízes das plantas desenvolvidas sob condições naturais.

As plantas *in vitro* se desenvolvem num microambiente dentro dos fracos de cultura com trocas gasosas restritas, resultando no aumento da concentração de gás carbônico e etileno, como foi observado por De Proft *et al.* (1985) na cultura de *Magnolia soulageana*. No presente trabalho, as raízes da planta cultivada *in vitro* apresentam grande quantidade de pêlos radiculares, já nas raízes das plantas aclimatizadas os pêlos radiculares ocorrem em grupos dispersos e na planta matriz os pêlos radiculares estão ausentes. Uma provável razão para o desenvolvimento desses pêlos radiculares nas plantas cultivadas *in vitro* é a presença de alta concentração de etileno, visto que esse regulador vegetal promove a formação de muitos pêlos radiculares (Taiz & Zeiger 2004). Segundo Colli (2004), a formação de pêlos tanto na zona de alongamento quanto em outras partes das raízes de orquídeas tem sido promovida pela aplicação do etileno.

Segundo Zindler-Frank *et al.* (2001), a presença de cristais de oxalato de cálcio formados nos diferentes órgãos de uma planta está diretamente relacionada com a quantidade de cálcio disponível para a planta. A ocorrência desses cristais pode estar associada com o processo de eliminação do excesso de cálcio no citosol (Kostman *et al.* 2001). Portanto, a presença de idioplastos com ráfides no meristema fundamental, em

maior proporção nas plantas *in vitro* (apesar de se detectarem nas plantas cultivadas nos três ambientes), pode estar relacionada ao meio de cultura MS. Este meio é rico em macro e micronutrientes, contendo 2,99 mM de sais de Ca^{2+} .

Alterações fenotípicas relacionadas à limitação de recurso representam uma resposta às condições adversas e podem ser uma vantagem para o organismo (Wells & Pigliucci 2000). Na cultura *in vitro*, as plantas estão submetidas a um ambiente com elevada UR% e baixa intensidade luminosa. Estas condições possivelmente levaram a alterações estruturais nas plantas de *Cymbidium* 'Joy Polis'. Redução na deposição de cutícula nas plantas cultivadas *in vitro* também foi registrada para *Liquidambar styraciflua* L., quando comparada à planta matriz (Wetzstein & Sommer 1982). Segundo Sutter (1984), a natureza química da cera depositada na superfície das folhas cultivadas *in vitro* é diferente da depositada sob condições naturais. Para Pospíšilová *et al.* (1999), as alterações mais importantes nas plantas durante a aclimatização são o desenvolvimento da cutícula e de estômatos funcionais.

Estômatos levemente projetados e abertos como os observados nas folhas das plantas cultivadas *in vitro*, também ocorreram em outras espécies cultivadas *in vitro* (Donnelly & Vidaver 1984; Wetzstein & Sommer, 1983; Lee *et al.* 1988; Blanke & Belecher 1989). Quanto ao retorno dos estômatos para a posição abaixo das células epidérmicas, o que é característico de ambientes com menor grau de umidade, Johansson *et al.* (1992) verificaram a mesma alteração em plantas de rosa cultivadas *in vitro*. Essa característica provavelmente se deve à maior umidade do ambiente *in vitro*, o que também é registrado em plantas aquáticas (Sculthorpe 1967). Hazarika *et al.* (2002) registraram células guardas arredondadas ou em forma de meia lua nas folhas de *Citrus* cultivado *in vitro* e células reniformes em casa-de-vegetação. Essa característica difere de *Cymbidium* 'Joy Polis', onde as células guardas permaneceram com formato reniforme em todos os ambientes, ficando o estômato mais arredondado no ambiente *ex vitro* (Fig. 13-14).

Os feixes vasculares das plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas, mais reduzidos que da planta matriz também foram registrados em folhas de *Rollinia mucosa*, nas quais o sistema vascular apresentou um reduzido número de elementos condutores (Albarello *et al.* 2001). Segundo esses autores, apesar dessa alteração nas plantas *in vitro*, elas são aptas a passar pelo processo de aclimatização. A redução do tecido

vascular, especialmente o xilema, é uma característica típica de plantas de ambientes úmidos (Sculthorpe 1967), como é o caso do ambiente *in vitro*.

Algumas dicotiledôneas, como o *Liquidambar styraciflua* L., quando cultivadas *in vitro*, deixam de apresentar diferenciação entre os parênquimas paliádico e lacunoso (Wetzstein & Sommer 1982). Em *Rollinia mucosa*, essa organização é mantida; fato que, segundo os autores, favorece a fase de aclimatização (Albarello *et al.* 2001), já que essa etapa não foi alcançada no caso de *Liquidambar styraciflua* (Wetzstein & Sommer 1982). Em *Cymbidium* 'Joy Polis' o parênquima é homogêneo e não houve alteração no formato das células, somente redução na espessura do limbo nas plantas cultivadas *in vitro*. Segundo Hazarika (2006), o mesófilo pouco diferenciado e o frágil sistema vascular das folhas formadas *in vitro* tornam essas plantas altamente susceptíveis ao estresse durante a aclimatização. Fica claro que *Cymbidium* 'Joy Polis' não sofreu alterações significativas na estrutura do mesófilo, o que pode ter reduzido o estresse e facilitado a aclimatização.

Os primórdios foliares desenvolvidos *in vitro* originam folhas com características anatômicas intermediárias entre as folhas das plantas *in vitro* e as das matrizes durante a aclimatização. Somente as folhas novas formadas após as plantas terem sido removidas da cultura *in vitro* são semelhantes às formadas no ambiente *ex vitro* (Donnelly *et al.* 1985). Durante a aclimatização, as folhas formadas *in vitro* podem persistir ou podem sofrer senescência. A persistência das folhas depende da espécie e das condições do ambiente durante a aclimatização (Fabbri *et al.* 1986). As plantas cultivadas *in vitro* podem apresentar um aparato fotossintético competente ou não. Nas culturas não competentes, como a do morango, as folhas deterioram rapidamente durante a aclimatização, contribuindo somente com os nutrientes preexistentes (Grout & Millam 1985). O crisântemo é fotossinteticamente competente quando cultivado *in vitro* e suas folhas persistem após o plantio em casa-de-vegetação (Grout & Donkin 1987). As mudas de *Cymbidium* mantiveram as folhas formadas *in vitro* por todo o período de 45 dias avaliado, indicando que, apesar das alterações anatômicas observadas, essa cultivar pode possuir aparato fotossintético competente.

Segundo Pospíšilová *et al.* (1999), as alterações morfoanatômicas e fisiológicas das plantas cultivadas *in vitro* podem ser revertidas durante a aclimatização, sendo que algumas espécies necessitam de uma mudança gradual das condições ambientais. A estrutura

anatômica das plantas aclimatizadas de *Cymbidium* 'Joy Polis' possui mais características semelhantes à da planta matriz, demonstrando a capacidade de aclimatização desta planta ao novo ambiente.

Em conclusão, pelas alterações anatômicas observadas, as plantas de *Cymbidium* 'Joy Polis' possuem grande capacidade de aclimatização ao ambiente, sendo provavelmente a capacidade de reversão das características anatômicas, um dos fatores responsáveis pela sobrevivência de 100% das mudas durante a aclimatização.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado à primeira autora e a RF Orquídeas, por gentilmente ceder o material vegetal indispensável para a realização deste trabalho; ao Laboratório de Botânica Estrutural e Centro de Microscopia Eletrônica, pelo apoio nas análises anatômicas.

Referências bibliográficas

- Albarello, N.; Figueiredo, S.F.L.; Viana, V.R.C. & Neves, L.J. 2001. Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 4: 35-46.
- Benzing, D.H.; Ott, D.W. & Friedman, W.E. 1982. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex. **American Journal of Botany** 69: 608-614.
- Begum, A.A.; Tamaki, M. & Kako, S. 1994. Formation of protocorm-like bodies (PLB) and shoot development through *in vitro* culture of outer tissue of *Cymbidium* PLB. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science** 63: 663-673.
- Blanke, M.B. & Belecher, A.B. 1989. Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue Organ Culture** 19: 85-89.
- Brainerd, K.E. & Fuchigami, L.H. 1982. Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA and CO₂. **Journal of Experimental Botany** 33: 388-392.
- Colli, S. 2004. Etileno. In: G.B. Kerbauy. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan.
- De Proft, M.P.; Maene, L.J. & Debergh, P.C. 1985. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* culture *in vitro*. **Physiologia Plantarum** 65: 375-379.
- Díaz-Pérez, J.C.; Sutter, E.S. & Shackel, K.A. 1995. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum** 95: 225-232.

- Dhawan, V. & Bhojwani, S.S. 1987. Hardening *in vitro* and morphophysiological changes in the leaves during acclimatization of micropropagated plants of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Plant Science** **53**: 65-72.
- Donnelly, D.J. & Vidaver, W.E. 1984. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. **Journal of the American Society for Horticultural Science** **109**: 172-176.
- Donnelly, D.J.; Vidaver, W.E. & Lee, K.Y. 1985. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell Tissue Organ Culture** **4**: 43-50.
- Fabbri, A.; Sutter, E.G. & Dunston, S.K. 1986. Anatomical changes in persistent leaves of tissue cultured strawberry plants after removal from culture. **Scientia Horticulturae** **28**: 331-337.
- Feder, N. & O'Brien, T.P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany** **55**: 123-142.
- Govil, S. & Gupta, S.C. 1997. Commercialization of plant tissue culture in India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **51**: 65-73.
- Grout, B.W.W. & Donkin, M.E. 1987. Photosynthetic activity of cauliflower meristem cultures *in vitro* and at transplanting into soil. **Acta Horticulturae** **212**: 323-327.
- Grout, B.W.W. & Millam, S. 1985. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. **Annals of Botany** **55**: 129-131.
- Hazarika, B.N. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae** **108**: 105-120.
- Hazarika, B.N.; Parthasarathy, V.A. & Nagaraju, V. 2002. Anatomical variation in *Citrus* leaves from *in vitro* and greenhouse plants: scanning electron microscopic studies. **Indian Journal Horticulture** **59**: 243-246.
- Johansen, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. New York, MacGraw-Hill Book Co.
- Johansson, M.; Kronstedt-Robards, E.C. & Robards, A.W. 1992. Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation. **Protoplasma** **66**: 165-176.
- Kostman, T.A.; Tarlyn, N.M.; Loewus, F.A. & Franceschi, V.R. 2001. Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. **Plant Physiology** **125**: 634-640.
- Lee, N.; Wetzstein, H.Y. & Sommer, H.E. 1988. Quantum flux density effects on anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science** **113**: 167-171.
- Lorenzi, H. & Souza, H.M. 2001. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3ª ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** **15**: 473-497.
- Pierik, R.L.M. 1990. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. 3ª ed. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa.
- Pita, P.B. & Menezes, N.L. 2002. Anatomia da raiz de espécies de *Dyckia* Schult. f. e *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil), com especial referência ao velame. **Revista Brasileira de Botânica** **25**: 25-34.
- Pospíšilová, J.; Tichá, I.; Kadleček, P.; Haisel, D. & Plzánková, Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum** **42**: 481-497.
- Reuther, G. 1988. Comparative anatomical and physiological studies with ornamental plants under *in vitro* and greenhouse conditions. Propagation of ornamentals. **Acta Horticulturae** **226**: 91-97.
- Sagawa, Y. & Kunisaki, J.T. 1984. Clonal propagation: Orchids. **Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants** **1**: 61-67.
- Sanford, W.W. & Adalawo, I. 1973. Velamen and exodermis characters of West African epiphytic orchids in relation to taxonomic grouping and habitat tolerance. **Botanical Journal of the Linnean Society** **66**: 307-321.
- Sculthorpe, C.D. 1967. **The biology of aquatic vascular plants**. New York, St. Martin's Press.
- Shackel, K.A.; Novello, V. & Sutter, E.G. 1990. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. **Journal of the American Society for Horticultural Science** **115**: 468-472.
- Silva, C.I. & Milaneze-Gutierrez, M.A. 2004. Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences** **26**: 91-100.
- Sutter, E.G. 1984. Chemical composition of epicuticular wax in cabbage plants grown *in vitro*. **Canadian Journal of Botany** **62**: 74-77.
- Sutter, E.G. 1988. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science** **113**: 234-138.
- Sutter, E.G.; Shackel, K. & Díaz, J.C. 1992. Acclimatization of tissue cultured plants. **Acta Horticulturae** **314**: 115-119.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2004. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre, Artmed.
- Wells, C.L. & Pigliucci, M. 2000. Adaptive phenotypic plasticity: the case of heterophylly in aquatic plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics** **3**: 1-18.
- Werckmeister, P. 1971. Light Induction of Geotropism, and the Control of Proliferation and Growth of *Cymbidium* in Tissue Culture. **Botanical Gazette** **132**: 346-350.
- Wetzstein, H.Y. & Sommer, H.E. 1982. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. **American Journal of Botany** **69**: 1579-1586.
- Wetzstein, H.Y. & Sommer, H.E. 1983. Scanning electron microscopy of *in vitro* cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. **Journal of the American Society for Horticultural Science** **108**: 475-480.
- Zindler-Frank, E.; Honow, R. & Hesse, A. 2001. Calcium and oxalate content of the leaves of *Phaseolus vulgaris* at different calcium supply in relation to calcium oxalate crystal formation. **Journal of Plant Physiology** **158**: 139-144.