

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

PAULO ROBERTO DINIZ DA SILVA

**ESTUDOS DE MICROPROPAGAÇÃO EM CONDIÇÕES FOTOAUTOTRÓFICAS E
MÉTODOS HISTOQUÍMICOS EM *EUGENIA UNIFLORA* L. (MYRTACEAE).**

São Gabriel

2016

PAULO ROBERTO DINIZ DA SILVA

**ESTUDOS DE MICROPROPAGAÇÃO EM CONDIÇÕES FOTOAUTOTRÓFICAS E
MÉTODOS HISTOQUÍMICOS EM *EUGENIA UNIFLORA* L. (MYRTACEAE).**

Dissertação apresentada ao programa de Pós graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Valdir Marcos Stefenon

São Gabriel

2016

PAULO ROBERTO DINIZ DA SILVA

**ESTUDO DE MICROPROPAGAÇÃO EM CONDIÇÕES FOTOAUTOTRÓFICAS E MÉTODOS
HISTOQUÍMICOS EM *EUGENIA UNIFLORA* L. (MYRTACEAE).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação
em Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas (Cultura de Tecidos
Vegetais).

Qualidade Ambiental


Dissertação defendida e aprovada em: 28, abril de 2016.

Banca examinadora:



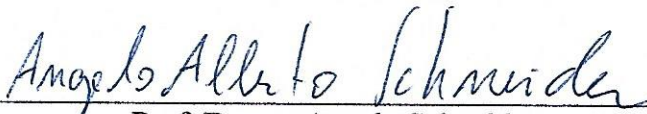
Prof. Doutor .Valdir Marcos Stefenon

Orientador
UNIPAMPA



Prof. Doutor Igor Poletto

UNIPAMPA



Prof. Doutor Angelo Schneider

UNIPAMPA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

S586e Silva, Paulo Roberto Diniz da Silva
ESTUDOS DE MICROPROPAGAÇÃO EM CONDIÇÕES FOTOAUTOTRÓFICAS E
MÉTODOS HISTOQUÍMICOS EM EUGENIA UNIFLORA L. (MYRTACEAE). /
Paulo Roberto Diniz da Silva Silva.
53 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2016.

"Orientação: Valdir Marcos Stefenon Stefenon".

1. fotossintética. 2. sacarose. 3. polifénóis. 4.
estômatos. 5. ventilação natural. I. Título.

AGRADECIMENTOS

À Natureza, pelo esplendor do dom da vida e pode contemplá-la.

A minha família; esposa Graciela pela paciência e meu filho pela educação.

À Nação Brasileira, que através da estrutura facilitou minha formação profissional, científica e acadêmica durante o período em que estudei nas universidades públicas.

Aos meus pais; Cordolino Diniz da Silva (*in memorian*) pelo ensinamento da perseverança e de luta pelos meus objetivos e a Cândida Diniz da Silva pelo dom da Botânica Popular.

Ao Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon pela orientação, paciência e pelo apoio que realizasse o trabalho de micropropagação de espécies nativas do Pampa e pela minha caminhada na vida acadêmica.

Ao amigo Leonardo Noletto, pelas explicações sobre o Cerrado e Fisiologia Vegetal, principalmente, à dedicação a Cultura de Tecidos Vegetais.

Aos meus eternos mestres que me ensinaram o amor pela Botânica; aos Professores José Elias de Paula -Unb (*in memorian*), Nagib Nasser (Unb), Maria Elisa Ribeiro Calbo (Unb) e Linda Styer Caldas (*in memorian*) e o Cláudio Vinícius de Senna Gastal Júnior (*in memorian*).

Aos professores Andrés Delgado Cañedo, Antônio Batista Pereira, Luiz Fernando Roesch, José Ricardo Ribeiro, Cristhian Bugs, Jeferson Franco, José Ricardo Ribeiro e Juliano Tomazzoni Boldo pelos ensinamentos.

Aos técnicos administrativos de educação Daiane Balconi Bevilaqua, Susiane Cavinatto Meira e Adriano Alves de Paula pela cooperação e camaradagem.

Aos colegas do Núcleo de Tecidos Vegetais; Fernanda Gallon Illamas, Tatiana Silveira Moura, Suelen Martinez Guterres, Denise Czanescki da Silva, Ferdinando Bisogno de Castro, Igor Rodrigues Brito e do NEVA; Mônica Munareto Minozzo e Geferson Fernando Metz, pela dedicação e compreensão.

"Os anos deixam rugas na pele, mas a falta de entusiasmo deixa rugas na alma"

Michael Lynberg

"A criatividade deve andar em ritmo mais avançado que a tecnologia."

Hans Donner

RESUMO

A *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) é uma espécie nativa, que apresenta potencial econômico e farmacológico. A micropropagação é uma importante ferramenta na obtenção de plantas saudáveis e de alta qualidade. A aclimatização é uma fase limitante devido ao estresse hídrico, decorrente às baixas sobrevivência e capacidade fotossintética são causadas pelas concentrações de sacarose, a alta umidade e a baixa irradiância. A micropropagação fotoautotrófica emprega reduções do açúcar do meio de cultura e da umidade relativa nos recipientes. Também, o aumento do gás carbônico e de ventilação natural ou ventilação forçada. Este trabalho teve por objetivo de testar a micropropagação fotoautotrófica de *Eugenia uniflora* L., com utilização de quatro concentrações de sacarose (0, 10, 20 e 30 g) e ventilação natural. A interação dos resultados demonstraram que a micropropagação fotoautotrófica testada não apresentou bom desempenho e o problema não está na concentração de gás carbônico ou na ventilação natural, mas na qualidade de luz dentro da câmara de crescimento.

Palavras-chave: fotossintética, sacarose, estômatos, ICF e ventilação natural

ABSTRACT

Eugenia uniflora L. (Myrtaceae) is a native species, which has economic and pharmacological potential. The micropropagation is an important tool in raising healthy plants and high quality. Acclimatization is a limiting stage due to water stress, due to the low survival and photosynthetic capacity are caused by concentrations of sucrose, high humidity and low irradiance. The photoautotrophic micropropagation employs sugar reductions of the culture medium and the relative humidity in the containers. Also, the increase in carbon dioxide and natural ventilation or forced ventilation. This study aimed to test the photoautotrophic micropropagation of *Eugenia uniflora* L., using four sucrose concentrations (0, 10, 20 and 30 g), and natural ventilation. The interaction of the results demonstrated that the micropropagation Photoautotrophic tested did not show good performance and the problem is not in concentration of carbon dioxide or natural ventilation, but the quality of light within the growth chamber.

Keywords: photosynthesis, sucrose, stomata, ICF and natural ventilation

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	7
HIPÓTESES	10
OBJETIVO GERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
METODOLOGIA EMPREGADA	11
REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 1. Estudos de micropropagação em condições fotoautotróficas e métodos histoquímicos em <i>Eugenia uniflora</i> L.(MYRTACEAE).....	14
CAPÍTULO 2. A new approach for light microscopy studies of stomatal complex using sodium hydroxide staining	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	53

INTRODUÇÃO

A micropropagação é um método de propagação vegetativa muito estudada em várias espécies vegetais, sendo uma ferramenta muito difundida na cultura de tecidos. Entre as vantagens de sua aplicabilidade estão: a possibilidade de obter várias plantas a partir de um explante inicial, independente da estação do ano; redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; as ótimas condições sanitárias do meio de cultivo de meristemas tratados com termoterapia; a eliminação de fitopatógenos. O rejuvenescimento dos tecidos de plantas adultas pode ser obtido através de sucessivos subcultivos através da micropropagação que aumenta a necessidade na fidelidade da multiplicação do genótipo da planta-mãe, a micropropagação de espécies de difíceis propagações vegetativas pelos diversos métodos e a micropropagação é útil para manter o germoplasma de diversas espécies em um pequeno espaço por longo período de tempo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Porém, a produção de mudas com utilização da micropropagação na produção de mudas em escala comercial pode ser limitado, por causa do alto custo para obtenção das plântulas. Então, é necessária a diminuição dos custos para viabilizar comercialmente a produção das mudas pela micropropagação. Assim, tornando a produção competitiva em relação métodos tradicionais como estaquia, enxertia e mergulhia (ALTMAN, 1999).

Também, a micropropagação é conhecida como micropropagação convencional, esta pode ser de natureza heterotrófica ou fotomixotrófica conforme a fonte de carbono para o crescimento das plantas, sendo responsável pela maioria dos fatores relacionados ao custo de produção (KOZAI, KUBOTA, 2001). Neste método, as plantas são cultivadas em recipientes sem que ocorra troca gasosa, com alta umidade relativa do ar (entorno de 98%), alta concentração de etileno (30 a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) e a baixa concentração de gás carbônico (900 a $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), baixa luminosidade ($30 - 50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a utilização de sacarose como principal fonte de energia metabólica (ARIGITA et al., 2002). Esses fatores afetam o metabolismo dos explantes que deixam a planta com baixa taxa fotossintética (KOZAI; KUBOTA, 2001). Entretanto, essa ferramenta apresenta alguns problemas devido às perdas causadas pela contaminação endógena, por desordens fisiológicas e morfológicas nas plantas pela baixa percentagem de sobrevivência das plantas na fase de aclimatização nas condições *ex vitro*, à necessidade de mão-de-obra especializada (KOZAI; KUBOTA, 2001; KURATA;

KOZAI, 1992) e pelo alto custo do funcionamento e manutenção das salas de crescimento com luz artificial e temperatura controlada (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999).

As desordens fisiológicas e morfológicas podem ser causadas por adição de altas concentrações de sacarose ao meio de cultura pela baixa concentração de gás carbônico, pela baixa irradiância, pela qualidade da luz e pela vedação dos frascos, dificultando a adaptação do metabolismo heterotrófico para o autotrófico e a subsequente sobrevivência *ex vitro* (SILVA, A. P. et al. 2008).

As altas concentrações de sacarose do meio afetam a morfologia e a funcionalidade do mecanismo de fechamento estomático. Dessa maneira, a alta umidade relativa do ar dificulta a formação de cera epicuticular e o controle da transpiração, levando a rápida perda de água e as mudanças na estrutura da cutícula nas células do mesófilo e nas estômatos das folhas (HEMPEL, 1993), tornando as plantas suscetíveis ao estresse hídrico (FACHINELLO et al., 1995) e a perda significativa dos explantes pela contaminação microbiana (KOZAI & KUBOTA, 2001).

A fim de melhorar as condições de adaptação das plântulas *in vitro* na preparação para aclimatização, os pesquisadores começaram a busca da micropropagação fotoautotrófica. O desenvolvimento de sistemas de micropropagação fotoautotrófica para produção de micropropágulos que utilizam meios de cultura isentos de sacarose, no qual o crescimento das plântulas dependem em parte da fotossíntese, da absorção de nutrientes inorgânicos e gás carbônico para desenvolvimento (KOZAI, KUBOTA, 2005). Também, existem outros fatores que são utilizados; os substratos mais porosos tais como vermiculita e perlita (OH et al., 2012; XIAO, KOZAI, 2006), fluxo de fótons fotossintéticos (KOZAI et al., 1997), fotoperíodo, ventilação natural com tampas com filtros (ERIG, SCHUCH, 2005) ou forçada e uso de luz natural ou substituída por iluminação à base de diodos LED (PENCHEL et al., 2007).

Esses fatores mencionados aumentam a eficiência da micropropagação fotoautotrófica associada à luz natural em relação à convencional, aumentam o crescimento das plantas, reduzem o risco de contaminação microbiana em virtude da remoção da sacarose do meio, melhoram as características fisiológicas vegetais devido às condições ambientais de cultivo mais naturais, reduzem o estresse da planta durante aclimatização aumentando e maximizando a sobrevivência das plantas, reduzem os custos com energia e manutenção, viabilizando

comercialmente produção de plantas (AFREEN et al., 2002; HEMPEL, 1994; KOZAI et al., 2003; ZOBAYED et al., 2000, 2001).

O aumento da concentração de CO₂, a redução da umidade relativa e a concentração de etileno da planta, têm-se conseguido com utilização de tampas nos frascos de cultivo mais permeáveis, tais como, filtros permeáveis a gases ou chumaço de algodão (KOZAI; NGUYEN, 2003; SANTANA et al., 2003). O acréscimo de CO₂ promove o aumento da fotossíntese, em função de seu efeito direto sobre enzima Ribulose 1,5 difosfato carboxilase, conhecida como Rubisco (ARIGITA et al., 2002), promove a regulação fotossintética e estomática e preparam as plantas para as condições fotoautotróficas (ARIGITA et al., 2002).

Atualmente, existem vários estudos sobre micropropagação fotoautotrófica como realizados por Kozai e Kubota (2001), que estudaram espécies lenhosas, como *Acacia mangium* (acácia) e *Coffea arabusta* (cafeeiro) e verificaram que o crescimento dos explantes da maioria das espécies foi maior sob condições fotoautotróficas em comparação a fotomixotróficas.

A micropropagação fotoautotrófica com ventilação natural e iluminação de LED apresenta ótimo potencial para redução dos custos de produção de plantas micropropagadas, por meio da redução do gasto com energia elétrica, melhorando a qualidade das plantas, reduzindo as perdas com a aclimatização e a contaminação microbiana. No entanto, os estudos com micropropagação fotoautotrófica com utilização de ventilação natural e luz LED são praticamente inexistentes. Apesar das vantagens, a implementação de novas tecnologias exige estudos para melhorar o setor de produção de mudas.

HIPÓTESE

A utilização da micropropagação fotoautotrófica reduz a mortalidade das plântulas de *Eugenia uniflora* L. no processo de aclimação.

OBJETIVO GERAL

Realizar a micropropagação fotoautotrófica com ventilação natural, utilizando 4 concentrações de sacarose (0, 10,20 e 30g) para *Eugenia uniflora* L.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar a melhor concentração de sacarose para crescimento de *E. uniflora*.

Verificar o índice de clorofila de Falker para os tratamentos de sacarose.

Verificar as densidades polares, as densidades equatoriais e as excentricidades estomáticas em função dos tratamentos de sacarose.

Verificar os efeitos das concentrações de sacarose sobre as tonalidades RGB dos complexos estomáticos.

REFERÊNCIAS

- AFREEN, F. et al. **Photoautotrophic culture of Coffea arabusta somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos**. Annals of Botany, London, v.90, p.11-19, 2002.
- ALTMAN, A. **Plant biotechnology in the 21 s t century: the challenges ahead**. EJB Electronic Journal of Biotechnology , Valparaiso, v.2, n.2, p.51-55, 1999.. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol2/issue2/full/1/>> .Acesso em: 15 out. 2003.
- ARIGITA, L. et al. **Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of Actinidia deliciosa explants cultured *in vitro***. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v.115, p.166-173, 2002.
- ERIG, Alan Cristiano; SCHUCH, MárciaWulff. **Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural**. Ciênc. Rural, Santa Maria, v.30, n.4, jul/ago 2005.
- FACHINELLO, J.C. . **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: UFPel, 179p., 1995.
- GRATTAPAGLIA, Dario.; MACHADO, Marcos Antonio. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds) **Cultivo de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: Setor Produção de Informação/Embrapa-Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia; 1998. v.1, p.183-260.
- HEMPEL, M. **From micropropagation to microponics** (part II). Practical Hydroponics & Greenhouses, May/June, p.17-20, 1994. Disponível em: <<http://members.ozemail.com.au/~mhempel/publications/mponic2.htm>> Capturado em: 15 out. 2003.
- KITAYA, Y.; OHMURA, Y.; KUBOTA, C. ; KOZAI, T. 2005. **Manipulation of the culture environment on in vitro air movement and its impact on plantlets photosynthesis**. Plant Cell Tiss Org Cult. 83:251-257. doi: 10.1007/s11240-005-6839-2.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. **Natural light as an alternative light source for the in vitro culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine')**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.55, p.141- 145, 1999.

KOZAI, Toyoki; KUBOTA, Chieri. **Developing a Photoautotrophic Micropropagation System for Woody Plants**. *Journal of Plant Research*, Tokyo, v. 114, p. 525-537, 2001.

KOZAI, T. et al. **Efficient production of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) propagules and transplants using single node leafy cuttings in closed systems with artificial lighting**. Disponível

em:<http://www.mykz.affrc.go.jp/workshop/ws2000/proceedings/pdf/p106_kozai.pdf Acesso em 20 out. 2003

KOZAI, Toyoki.; AFREEN, Fawzia; ZOBAYED, Sayed. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Netherlands: Springer, 316 p., 2005.

KUBOTA, C.; TADOKORO, N. **Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation**. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, New York, v.35, p.296-298, 1999.

OH, Myung Min et al..**Physicochemical properties of mixtures of inorganic supporting materials affect growth of potato (*Solanum tuberosum* L.) planlets cultured photoautotrophically in a nutrient-circulated micropropagation system**. *Hort. Environ. Biotechnol.* 53(6): 497-504, 2013. DOI 10.1007/s13580-012-0043-1

PENCHEL, Ricardo M; OTONI, Wagner Campos; XAVIER Aloisio. **Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica in vitro**. In: BORÉM A (ed.) Biotecnologia florestal. p75-92.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; MIYATA, L.Y.; MELO, L. A.; BRAGA, F. T. 2008. **Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro**. Interciencia. 33(11): 839-843.

XIAO, Yulan; NIU, Genhua. **Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system**. 2011. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 105 (2): 149-158.

ZAPATA-ARIAS, F.J. **Natural light as an alternative light source for the in vitro culture of banana (Musa acuminata cv. "Grande Naine")**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, The Hague, v.55, p.141-145, 1999.

CAPÍTULO 1.

Estudos de micropropagação em condições fotoautotróficas e métodos histológicos em de *Eugenia uniflora* L.(MYRTACEAE).

ABSTRACT

Eugenia uniflora L. (Myrtaceae) is a native species with economic and pharmacological potential. The micropropagation is an important tool in raising healthy plants and high quality. Acclimatization is a limiting stage due to water stress, while low survival and photosynthetic capacity are influenced by concentrations of sucrose, high humidity and low irradiance. The photoautotrophic micropropagation employs exclusion of half sugar, with increased carbon dioxide in containers with reduced relative humidity and natural ventilation or forced ventilation. This study aimed to test the photoautotrophic micropropagation of *Eugenia uniflora* L., using four sucrose concentrations (0, 10, 20 and 30g), and natural ventilation. The design was completely randomized. Data were submitted to t test; the analysis of variance and means were compared by Tukey test ($p \leq 0.05$) for stomatal analysis and Dunnett test ($p \leq 0.05$) for analysis linked to the sucrose concentrations, chi-square for the average survival using the Statistic 7.0 and Rstudio software. The data counts were transformed by equation $(X + 0.5)^{1/2}$ and the percentage, the arc equation $\arcsin(x / 100)^{1/2}$. The Verification of the 30-day explants, leaf number and diameter were not significant for T1, T2 and T3. To 9 average of the three RGB stomatal areas there were no significant differences. The analysis consisted that T1 (45.46) and T2 (11.59) showed significant differences. In vitro samples (58.97), ex vitro (76,22) and without sucrose treatment T0 (67.59) showed no significant differences. T1, T2 and T3 showed significant differences in stomatal density, polar and equatorial diameter, the mean eccentricities and survival percentage, highest average was 59.60% (T2). There were no significant differences in number of leaves, leaf size (T1, T2 and T3), chlorophyll index Falker (T0, T1 and T2) and average eccentricity (T0, T1 and T2). In 90 days, stomatal density, polar and equatorial diameter and 9 average RGB T2 showed significant differences. However the percentage of survival and rooting numbers were very low. The interaction of the results demonstrated that photoautotrophic micropropagation tested did not show good performance and the species problem likely is not carbon dioxide in concentration or natural ventilation, but the quality of light within the growth chamber.

Keywords: photosynthesis, sucrose, stomata, ICF and natural ventilation

RESUMO

A *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) é uma espécie nativa que apresenta potencial econômico e farmacológico. A micropropagação é uma importante ferramenta na obtenção de plantas saudáveis e de alta qualidade. A aclimatização é uma fase limitante devido ao estresse hídrico, decorrente às baixas sobrevivência e capacidade fotossintética são causadas pelas concentrações de sacarose, a alta umidade e a baixa irradiância. A micropropagação fotoautotrófica emprega exclusão a açúcar do meio, com aumento do gás carbônico dentro recipientes, com a redução da umidade relativa e com a ventilação natural ou com a ventilação forçada. Este trabalho teve por objetivo testar a micropropagação fotoautotrófica de *Eugenia uniflora* L., com utilização de quatro concentrações de sacarose (0, 10, 20 e 30 g) e ventilação natural. O delineamento foi completamente casualizado. Dados foram submetidos a teste t; à análise de variância e as médias comparadas pelos teste Tukey ($p \leq 0,05$) para análises estomáticas e Teste Dunnet ($p \leq 0,05$) para as análises ligadas as concentrações de sacarose, Qui-quadrado para as médias de sobrevivência, utilizando os programas Statistic 7.0 e Rstudio. Os dados das contagens foram transformados pela equação $(X+0,5)^{1/2}$ e os, da porcentagem, pela equação $\arcsen(X/100)^{1/2}$. Na verificação dos explantes para 30 dias, a diferença no número de folhas e diâmetro equatorial não foram significativas para T1, T2 e T3. Para 9 médias dos RGB das três áreas estomáticas não existiram diferenças significativas. As análises constaram que os T1 (45,46) e T2 (11,59) apresentaram diferenças significativas entre si. As amostras in vitro (58,97), ex vitro (76,22) e tratamento sem sacarose T0 (67,59) não mostraram diferenças significativas entre si. T1, T2 e T3 apresentaram diferenças significativas para densidade estomática, diâmetros polar e equatorial, médias das excentricidades e para porcentagem de sobrevivência, maior média foi de 59,60% (T2). Não existiram diferenças significativas para número de folhas, tamanho foliar (T1, T2 e T3), índice de clorofila de Falker (T0, T1 e T2) e médias de excentricidades (T0, T1 e T2). Nos 90 dias, densidades estomáticas, diâmetros polares e equatoriais e 9 médias de RGB de T2 apresentaram diferenças significativas. Mas a porcentagem de sobrevivência e o número de enraizamento foram muito baixos. A interação dos resultados demonstrou que micropropagação fotoautotrófica testada não apresentou bom desempenho e o problema da espécie não está na concentração de gás carbônico ou ventilação natural, mas na qualidade de luz dentro da câmara de crescimento.

Palavras-chave: fotossintética, sacarose, estômatos, ICF e ventilação natural

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais centros de diversidade genética de fruteiras nativas do mundo (BARROSO et al. 1999; LORENZI, 1998, 2002; SOUZA e LORENZI, 2005). Porém, pouco se sabe sobre a maioria destas espécies. Estas, em geral; continuam sem estudos agrônômicos que permitam o seu cultivo. Dessa forma, a exploração extrativista dessas espécies tem causado a degradação das florestas nativas (JÚNIOR et al., 2007).

A família Myrtaceae possui 130 gêneros com 4000 espécies de arbustos e árvores (SOUZA e LORENZI, 2005); predominantemente de regiões tropicais e poucas distribuídas nas subtropicais (BARROSO, 1999). Nesta, o gênero *Eugenia* apresenta um terço das espécies que se desenvolvem na América do Norte até a do Sul, ao norte da Argentina (BEZERRA et al., 2000). Neste gênero estão inseridas as espécies com frutos carnosos como *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae).

A *E.uniflora* L. é uma árvore nativa do sul do país, conhecida como pitangueira (ALMEIDA et al., 2012). Esta apresenta potencial de exploração econômica (BAGETTI, 2009; NASCIMENTO et al., 2006; NETO et al., 2012), medicinal (AURICCHIO e BACCHI, 2003; AURICCHIO et al., 2007; COLA et al., 2010; COSTA, 2010; JÚNIOR et al., 2007; KISS et al., 2006; LEE et al., 2000; LOPES, 2009; NASCIMENTO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2012; WANG et al., 1999; SANTOS et al., 2004) e alimentícias (LEDERMAN et al., 1992; LIMA et al., 2000; AURICCHIO, 2003; NASCIMENTO et al., 2006; ALMEIDA et al., 2012). As folhas e frutos verdes apresentam potencial para produção de fármacos, devido as substâncias como as Eugeniflorinas D1 e D2 que possuem ação antimicrobiana (AURICCHIO et al., 2007), a Oenotheina B que inibe a proliferação *in vitro* dos vírus Herpes HSV1 e 2 (LEE et al., 2000), o potencial anti-leishmania (RODRIGUES et al., 2012) e a Pentahidroxiindolizina com propriedade anti-diabética (SHAPOVAL et al., 1994).

O desenvolvimento econômico para esta espécie deve utilizar mudas selecionadas de uma cultivar para obtenção de ótima produção. Atualmente, existe somente uma cultivar para espécie registrada no controle do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, conhecida como Tropicana (JÚNIOR et al., 2007; LEDERMAN et al., 1992). Assim, existe a necessidade de novas metodologias para desenvolvimento dos sistemas de produção como a oferta de mudas uniformes e de qualidade fitossanitárias, de melhoramento genético e a

difusão das informações sobre o cultivo em escala comercial (LEDERMAN et al., 1992) e economicamente viável, principalmente para região sul do Brasil.

A cultura de tecidos vegetais é área de conhecimento que aplica técnicas de cultivo de células vegetais, tecidos e órgãos em um meio nutritivo asséptico (ESPOSITO-POLESI, 2011; KERBAUY, 1999; LOPES, 2009). Milhões de plantas são produzidas anualmente pelo mundo o através da micropropagação de matrizes selecionadas pelas características desejadas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998. A obtenção de plântulas de matrizes para desenvolvimento na micropropagação utiliza as seguintes etapas: 1. o estabelecimento de cultivos e 2. a aclimatização das plântulas (ALCÂNTARA et al., 2011; BANDEIRA et al., 2007; LOPES, 2009; SANTOS, 2004; SOUZA et al., 2008).

A aclimatização é uma fase limitante para micropropagação devido ao estresse hídrico, causado pela passagem do cultivo *in vitro* para *ex vitro*, sendo o principal problema pela perdas nessa fase. A baixa sobrevivência de plantas regeneradas; se deve a alguns fatores, como a baixa capacidade fotossintética. Este fato é observado nos cultivos com adição de altas concentrações de sacarose (BARBOZA et al., 2006). Isso sugere que o mecanismo enzimático de absorção de CO₂ é inibido pela maior concentração de açúcares (INOUE et al., 1998). A alta umidade, a baixa irradiância no interior dos recipientes e a vedação que não permite trocas gasosas são fatores que afetam negativamente a micropropagação (XIAO e NIU 2011). Assim, afetando a organização dos tecidos foliares, o funcionamento dos estômatos e a espessura da camada de cera epicuticular, que dificultam o controle da transpiração (JO et al., 209, SILVA, A.B. et al., 2008).

A micropropagação fotoautotrófica emprega exclusão do açúcar do meio de cultura, com aumentos nas concentrações de gás carbônico, de fluxo de fótons fotossintéticos (KOZAI et al., 1997), do fotoperíodo, de redução da umidade relativa (KAUR, 2015), de ventilação natural com utilização de tampas com filtro ou com ventilação forçada com bomba e filtro (KOZAI, 2010) com a redução da umidade relativa e da concentração de etileno, utilizando tampas de fechamento dos frascos de cultivo mais permeáveis como filtros permeáveis a gases ou chumaços de algodão (KOZAI e NGUYEN, 2003), o uso de substratos mais porosos como vermiculita, perlita e fibras de celulose (OH et al., 2012) e a substituição das lâmpadas fluorescentes pelas fontes de iluminação de diodos LED (PENCHEL et al., 2007), sendo que a maioria das lâmpadas fluorescentes fornecem 100 $\mu\text{mol m}^{-2}$ de intensidade de luz (KOZAI, AFREEN, ZOBAYED, 2005). O monitoramento destes parâmetros são essenciais para

desenvolvimento dos explantes (BAGETTI, 2009; BANDEIRA, 2007; BANDINELLI, 2009; ERIG, 2005; INOUE, 1998), podendo reduzir os custos e os problemas com aclimatização das plântulas (ERIG, 2005; INOUE, 1998).

A adaptação das plantas micropropagadas para condições *ex vitro* é eterna busca de novas estratégias na aclimatização. Ressaltando a importância da preparação das plantas *in vitro* para as condições autotróficas, sendo este principal problema das pitangueiras *in vitro*. Estudos relatam que a diminuição de sacarose no meio *in vitro* ajuda na maturação dos cloroplastos e no aumento da taxa de sobrevivência dos explantes na aclimatização.

A irradiância, o fotoperíodo e a qualidade luminosa são fatores da luz que podem controlar qualidade dos explantes dentro da sala de crescimento (HARTMANN et al., 2009). Dentro das salas de crescimento e aclimatização dos laboratórios, ainda utilizam lâmpadas fluorescentes que emitem luz branca de similaridade espectral das bandas. Assim, essas salas apresentam baixas irradiâncias que afetam aspectos anatômicos e morfológicas e desenvolvem a ineficiência do mecanismo do complexo estomático, afetando sua funcionalidade (REZENDE et al., 2008).

Atualmente, existem estudos de 50 espécies sobre micropropagação fotoautotrófica, sendo basicamente cultivares de interesse comercial, como a batata, o fumo e o eucalipto (KAUR, 2015).

O presente trabalho teve por finalidade contribuir com informações relacionadas à micropropagação fotoautotrófica de *Eugenia uniflora* L., com utilização de quatro concentrações de sacarose (0, 10, 20 e 30g) e ventilação natural, de maneira a aprimorar a produção de mudas dessa espécie nativa do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia da UNIPAMPA (São Gabriel-RS) durante os anos 2014 e 2016. As trezentas sementes de quatro matrizes de *Eugenia uniflora* foram escolhidas aleatoriamente por sorteio; foram desinfestadas em banhos sucessivos na capela de fluxo laminar horizontal; álcool 70 GL (1 min), solução de hipoclorito de sódio a 1,25% cloro ativo (25 min) e três enxágues em água destilada autoclavada. Para germinação *in vitro*, foram confeccionados 1,5 L de meio ½ MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) conforme a Tabela 5, suplementado vitaminas e ágar,

totalizando 30 vidros, na câmara de crescimento em condições de temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e o fotoperíodo de 16 horas de luz, com intensidade luminosa de $30 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ (SILVA, P.R.D. et al., 2014).

a) **Micropropagação fotoautotrófica**

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado composto por quatro tratamentos e quatro repetições de trinta tubos de ensaio cada. Para inoculação dos explantes, foi confeccionado o meio de cultura MS com a metade da composição de sais e as vitaminas conforme relatados por Murashige e Skoog (1962) na Tabela 5, $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido indolbutírico e $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina e o pH ajustado para 5,8 (SILVA, P.R.D. et al., 2014). Os tratamentos foram constituídos das seguintes concentrações de sacarose ($T_0 = 0 \text{ g L}^{-1}$, $T_1 = 10 \text{ g L}^{-1}$, $T_2 = 20 \text{ g L}^{-1}$ e $T_3 = 30 \text{ g L}^{-1}$). Em cada tubo, foram colocadas 2,7 g de vermiculita e 0,3 g de perlita previamente autoclavadas. Estes tubos com substratos foram umedecidos com 2 mL de $\frac{1}{2}$ MS, vitaminas e sacarose (conforme cada tratamento), e tampados com um disco de algodão de 9,2 cm de diâmetro e uma folha de alumínio de 7,4 cm x 15,75 cm. Os tubos prontos foram autoclavados a 121°C e 1,1 atm durante 20 min. Decorridos 45 dias da germinação *in vitro*, as plântulas foram incisadas em ápices caulinares e segmentos nodais, cada explante com mínimo de 1,5 cm. Estes foram inoculados dois explantes por tubo e totalizando 480 tubos de ensaio (conforme os números de tubos, de tratamentos e de repetições) e 960 explantes. Estes tubos foram conduzidos na incubadora de crescimento em condições de temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e o fotoperíodo de 16 horas de luz, 60 ± 5 de umidade relativa do ar, com intensidade luminosa de $100 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ e a iluminância de $5000 \pm 150 \text{ Lux}$ proveniente de lâmpadas LED branca. Após 7 dias de inoculação dos explantes, foram realizadas cinco punções em cada tampa de alumínio para ventilação natural. Semanalmente, os tubos foram destampados em condições assépticas e irrigados com 1,0 mL de água destilada autoclavada e mensalmente, com 1,0 mL de $\frac{1}{2}$ MS complementado com vitaminas e sacarose (conforme o tratamento).

Índice de clorofila Falker (ICF)

Foram coletadas últimas folhas completamente desenvolvidas de cada explante dos tratamentos para 30 e 90 dias. Imediatamente cada retirada, foram realizadas as medidas de ICF entre 09:00h a 11:00h, com o medidor eletrônico de teor clorofila (ClorofiLog), marca

Falker modelo CFL 1030 e foram registradas três medições para cada folha a intervalos de 10 a 15s (FALKER, 2008).

Estudos Histológicos

As folhas oriundas da etapa de eficiência fotossintética foram utilizadas para os cortes paradermicos de cada tratamento e realizados nas faces abaxiais. Essas foram incisadas na região mediana foliar, e divididos em 2 pedaços, retirando a nervura central foliar. Deste fragmento foliar, foram selecionados 4 campos para capturas microfotograficas. Os pedaços foliares foram dissociados em 50% de solução de ácido nítrico a 90° C (modificação de Kraus & Arduin 1997) e, corados em solução de 10% de hidróxido de sódio (SILVA, P.R.D. et al. 2016, submetido). As lâminas foram montadas em 50% de glicerina, conforme a metodologia apresentada por Kraus & Arduin(1997).

Microfotografias

Para os estudos anatômicos, as folhas adultas foram coletadas dos explantes, de cada tratamento e os cortes foliares das seções medianas. Destas foram efetuados cortes nas superfícies abaxiais, próximo da região da nervura central, nos quais obtiveram-se avaliações relativas ao número médio de estômatos por mm², totalizando 20 campos avaliados por tratamento e diâmetro polar e equatorial dos estômatos. Os diâmetros polar e equatorial dos estômatos foram obtidos para as fotomicrografias com objetiva de aumento 400 x, utilizando-se o microscópio de luz IMAGER A2(Carl Zeiss, Germany) e câmara AXIOCAM ERC5S e as imagens foram capturadas com programa AXIOVISION SE64 REL.4.9.1(Carl Zeiss, Germany), nas formas TIFF e JEGP.

Avaliações

As avaliações foram realizadas para micropropagação para 30° e 90°dias: (A) o número de folhas por tratamento, (B) os tamanhos de folhas por tratamento, (C) a porcentagem de sobrevivência, (D) taxa de índice de clorofila de Falker por tratamento e amostras *ex vitro*, *in vitro* e ambiental (E) número de raízes, (F) densidade estomática por tratamento, e amostras *ex vitro*, *in vitro* e ambiental (G) as médias de RGB para o complexo estomáticos por tratamentos, e amostras *ex vitro*, *in vitro* e ambiental e (H) excentricidades estomáticas por tratamento, e amostras *ex vitro*, *in vitro* e ambiental .

As amostras foram visualizadas sob um microscópio de luz Zeiss IMAGER A2 e fotografadas com uma câmera AXIOCAM ERC5S (Carl Zeiss, Alemanha). As imagens foram capturadas em formato TIFF, em amplificação de 400X, utilizando o software AXIO VISION

SE64 REL.4.9.1 (Carl Zeiss, Alemanha). Para espécie, foram avaliadas as imagens de 30 estômatos para cada método de coloração. Onze pontos foram selecionados em cada estômato (dois nas células subsidiárias, seis nas células-guarda e três no ostíolo). As imagens capturadas foram analisadas com software Image J, nos espectro de vermelho, verde e azul em todos os pontos, com valores variando de 0 (tonalidade mais forte) a 255 (tonalidade mais clara). Para cada espécie, foram avaliadas nove capturas espectrais nas três cores (vermelho, verde e azul) por três estruturas estomática (células-guarda, células subsidiárias e ostíolos).

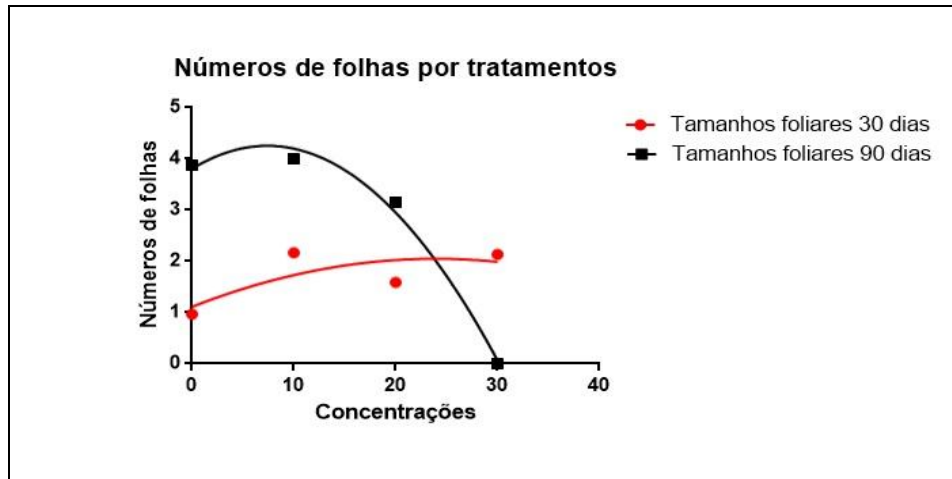
Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado para tratamentos, com quatro repetições de 30 plântulas cada tratamento. Os dados de micropropagação foram submetidos a teste t; à análise de variância e as médias comparadas pelos teste Tukey ($p \leq 0,05$) para análises estomáticas e Teste Dunnet ($p \leq 0,05$) para as análises ligadas às concentrações de sacarose, Qui-quadrado para as médias de sobrevivência, utilizando os programas Statistic 7.0 e Rstudio. Os dados das contagens foram transformados pela equação $(X+0,5)^{1/2}$ e os, da porcentagem, pela equação $\arcsen (X/100)^{1/2}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Número de folhas por tratamento

Não foram observadas diferenças significativas ($p= 0,235$) entre o T1, T2 e o T3 para 30 dias de inoculação. Em 90 dias de crescimento, o número de folhas por tratamento não diferiu significativamente entre os mesmos (T0, T1, T2 e T3). Os resultados do número de folhas para 30 dias mostram que a espécie necessitou inicialmente de sacarose e T2, uma grande quantidade foliar. Neste contexto para 30 dias, os resultados corroboraram com Silva, A.B. et al. (2014), que o maior crescimento *in vitro* para abacaxizeiro foi de meio de cultura com 30 g.L^{-1} no sistema de micropropagação com ventilação natural quanto adição de sacarose (**Figura1**). Mas, os resultados para 90 dias demonstraram que uma queda no número foliar e diminuição na média foliar que contrariaram Silva, A.B. et al. (2014).



Figural: Apresenta o gráfico dos números de folhas por tratamentos de sacarose e ventilação natural para 30 ($f(x) = -0,00967x^2 + 0,21078x + 0,967$) e 90 dias de inoculação ($-0,1614583x^2 + 1,6145833x + 3,875$).

Tamanhos de folhas e raízes

Para 30 dias, existiram diferenças significativas ($p = 0,923$) entre tratamentos T1 e T3 para tamanho foliar, sendo o T1 com melhor média de 4,24 mm e não houve diferenças significativas entre os T0 e T3 ($p = 0,0002$) e T2 e T3 ($p = 0,084$). Para os dados de 90 dias não tiveram diferenças significativas entre T0 e T2 ($p = 0,01597$) e T1 e T2 ($p = 0,04092$). O tratamento sem sacarose (T0) foi de melhor crescimento ao decorrer entre 30 a 90 dias, porém os com acréscimos de sacarose nos meios produziram crescimento um médio para 30 dias e um crescimento lento para 90 dias e os explantes do T3 não adaptaram à aclimatização e ocasionando suas mortes (**Figura2A**).

Quanto ao número de raízes após 30 dias de inoculação, os explantes dos tratamentos T0, T1, T2 e T3 não apresentaram raízes; mas para 90 dias, T0, T1 e T2 apresentaram raízes. Sendo a melhor média de 7,77 para T1. Entretanto, o T0 demonstrou maior número de indivíduos enraizados com melhor vigor (**Figura2B**). Assim, este trabalho corroborou com Kubota e Tadokoro (1999) que relataram sobre os tomateiros oriundos micropropagação fotoautotrófica apresentaram raízes mais desenvolvidas, folhas e ramos mais espessos. Assim, demonstraram melhor crescimento e maior vigor após a aclimatização, quando comparados às plântulas desenvolvidas de forma fotomixotrófica.

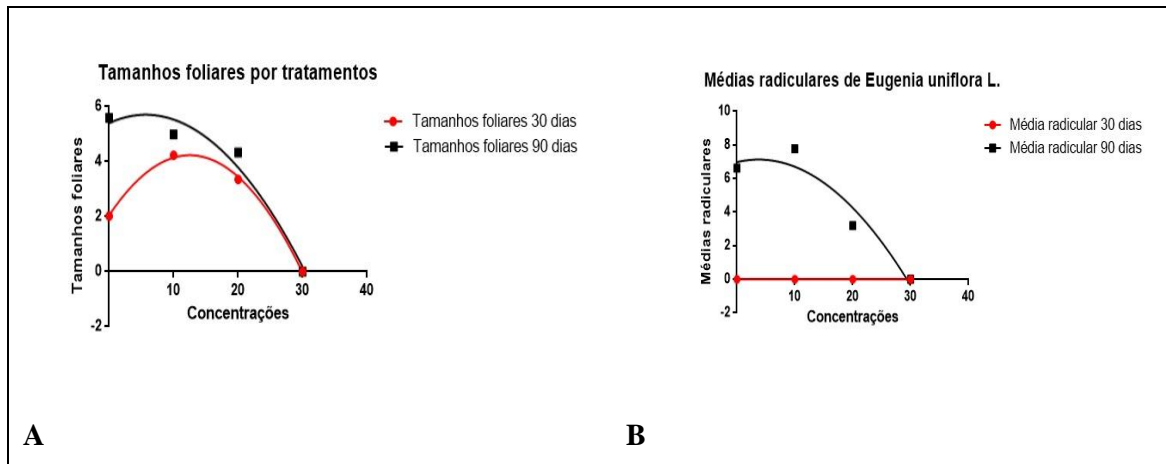


Figura2: Apresenta os gráficos para tamanhos foliares em 30 e 90 dias, respectivas equações $f(x) = -0,0073967x^2 + 0,2958667x + 2,021$ e $-0,2932806x + 5,8656126x + 5,588$ (A) e das médias radiculares dos tratamentos de sacarose para 90 dias $f(x) = -0,046802642x^2 + 0,93605284x + 6,628$ (B).

Porcentagem de sobrevivência

A porcentagem de sobrevivência de 59,60% para o T2 nos 30 dias e para 90 dias, a contagem de explantes foram T0 (3,33%), T1 (2,5%), T2 (7,5%) e T3 (0%). Para este trabalho, a aclimatização foi de 12 semanas e com alta taxa de mortalidade, que contrariou o estudo de Skrebsky et al. (2006) que teve 5 semanas de duração da aclimatização e o estudo de Hoffmann et al.(2001) relataram que sobrevivência de macieiras entre 7 a 21 dias de aclimatização declinou para 85%, devido ao estresse pelo transferência do laboratório para a casa de vegetação.

Índice de clorofila Falker-ICF

O tratamento sem sacarose (T0) não desenvolveu folhas em tamanhos mensuráveis dentro dos 30 dias de inoculação para estudo de ICF. As análises constaram que os valores entre (T1 e T3) e (T2 e T3) apresentaram diferenças significativas, respectivamente, ($p= 0,973$) e ($p= 0,999$). As amostras in vitro (58,97), ex vitro (76,22) e tratamento sem sacarose T0 (67,59) não mostraram diferenças significativas entre si ($p= 0,308$). Mas, os tratamentos com sacarose T1 (73,72), T2 (44,29) e T3(31,79) apresentaram ICF em decaimento, inversamente proporcional à quantidade de sacarose para 30 dias (**Figura 3A**). As amostras in vitro (58,97), ex vitro (76,22) e Ambiental (46,99) apresentaram ICF em decaimento apesar de não possuir adição de sacarose (**Figura 3B**). Este trabalho foi coerente com Fuentes et al. (2005), que relataram que adição de sacarose de 22 g L^{-1} , provocou diminuição da fotossíntese, aumentando a sobrevivência.

Para 90 dias, os valores foram 18,199 (T0), 18,628 (T1) e 18,392 (T2) não existiram

diferenças significativas entre médias ($p= 0,657$) e para T3 não existiram indivíduos vivos (**Figura 3A**). Mas, demonstraram o efeito da sacarose sobre o complexo fotossintético com diminuição do ICF; logo o decaimento dos valores de ICF que revelou mau funcionamento do sistema fotossintético. Assim, todos tratamentos apresentaram deficiências e mau funcionamento para 90 dias (**Figura 3A**). Desta maneira, corroborou com Chapman e Barreto (1997), que relataram a relação do índice de clorofila de Falker (ICF) e o teor de nitrogênio foliar que 50 a 70% do nitrogênio total que integram enzimas associadas aos cloroplastos devido às doses de nitrogênio aplicadas via fertirrigação. Albuquerque et al.(2014) relataram que existiu a relação entre os teores de nitrogênio foliares e os valores de ICF com às doses de nitrogênio aplicadas via fertirrigação para *Myrciara dubia* (Kunth) McVaugh (camucamuzeiro).

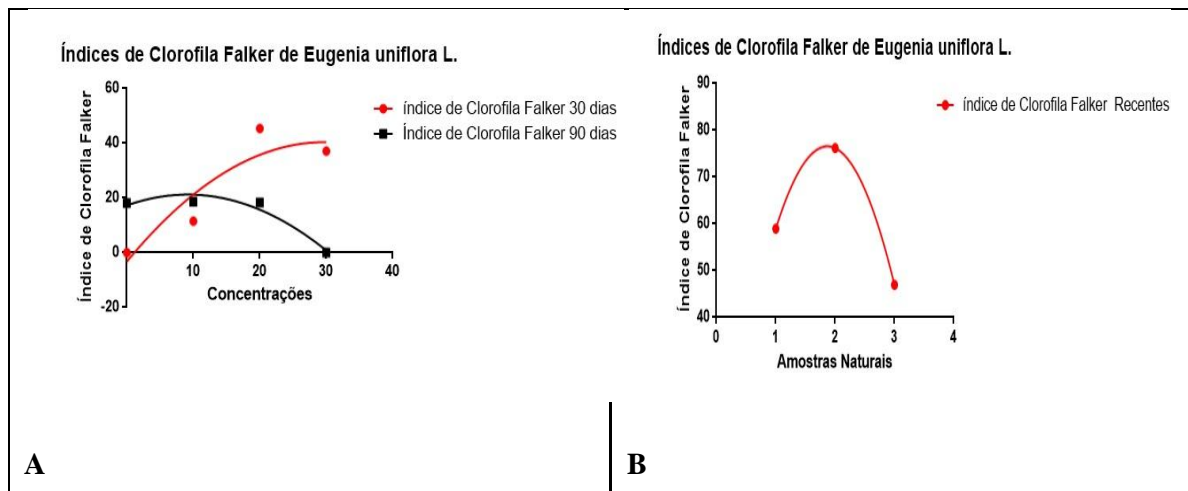


Figura3: Apresenta os gráficos dos Índices de Clorofila de Falker para concentrações de sacarose em 30 dias ($f(x) = - 0,0082765x^2 + 0,1655310x + 67,59$) e em 90 dias ($f(x) = - 0,0141295x^2 + 0,2825911x + 18,199$) (A) e das amostras naturais (B) para In Vitro (1), Ex Vitro (2) e Ambiental (3).

Densidade estomática

Neste trabalho, a densidade estomática de *E. uniflora* em ambiente natural foi de 77,29 estômatos/mm² e, as desenvolvidas no laboratório foi de 100, 23 estômatos/mm²; 65,31 (T1), 73,77 (T2) e 84,02 (T3) para 30 dias. As amostras que foram desenvolvidas dentro tubos nas câmaras de germinação, apresentaram média alta de 232,20 estômatos/mm² para T0 (sem sacarose) e de 107,72 (T1) e 176,83 (T2), com os acréscimos de sacarose houveram diminuições. Existiram diferenças significativas entre os tratamentos com sacarose, plantas do meio natural e das germinadas em laboratório com as maiores densidades de estômatos comparadas com os tratamentos. Os dados demonstraram que a espécie necessitou de

aumento na densidade estomática para compensar o mau funcionamento fotossintético e captação do gás carbônico (Tabela 2).

Este trabalho corroborou com Khan et al. (2003) que relataram que o aumento na densidade estomática nas folhas micropropagadas em comparação às folhas de plantas de ambiente natural, devido à alta umidade relativa dentro do vidro de cultivo e à redução da intensidade de luz. Costa et al.(2009b) relataram que o excesso de transpiração foliar abaxial de plântulas *in vitro* ocorre devido à alta densidade estomática, à falta de controle hídrico dos estômatos e à baixa quantidade de cera epicuticular. Santana et al. (2008) relataram de aumento da variação na densidade estomática das plantas cultivadas *in vitro*, quando comparadas com cultivadas na casa de vegetação. O trabalho de Dignart (2006) com *Cattleya walkeriana*, foram observadas as maiores densidades em casa-de-vegetação sem sombrite e Zabayed et al. (2000) relataram que as folhas de plântulas de batata doce apresentaram estômatos com deficiência funcional sob condições fotomixotrófica com ventilação natural e os estômatos em condições fotoautotróficas com ventilação forçada apresentaram um bom funcionamento, estas análises foram realizadas após 30 e 60 minutos dos recipientes transportados para ambiente *ex vitro*.

Diâmetros polar e equatorial

Para 30 dias, o tratamento sem sacarose (T0) não apresentou foliólulos. Para diâmetro polar, houve um aumento para T1 (6,95µm) mesmo com adição de sacarose no tratamento. Não existiram diferenças significativas entre T1 e amostras germinadas em condições naturais (*Eugenia uniflora* em condições Ambientais e de laboratório). Mas, foram observadas diferenças significativas entre o T2 e T3 (p= 0,987). Existiu uma relação inversa entre o diâmetro polar (diminuição) com a quantidade de sacarose (aumento), para T2 e T3.

Quanto ao diâmetro para 90 dias, foram observadas diferenças significativas (p = 0,019), entre o T0, T1 e T2. Os explantes do tratamento com 30 g de sacarose (T3) morreram. (Tabela 2).

Para diâmetro equatorial, não houve diferença significativa da amostra foliar ambiental e T1 (10g) (p= 0,071). Nos tratamentos T1, T2 e T3; existiram a diminuição nas medições em relação proporcionalmente à quantidade de sacarose (Tabela 2). Oliveira e Migliomanza (2013) relataram a existência de interação de fatores como variedades e a região foliar; porém a densidade estomática, diâmetro equatorial e funcionamento demonstraram somente efeito isolado de variedade de *Manihot esculenta* Crantz. Santana et al. (2008) informaram que *Annona bahiensis*, *Annona cauliflora*, *Annona glabra* e *Annona squamosa*

apresentaram menor diâmetro polar e equatorial durante o cultivo in vitro e estômatos ficaram mais esféricos.

Excentricidades estomáticas

A menor média de excentricidade (ϵ) foi de 0,699 para amostras foliares do meio ambiental (atmosfera e luz naturais). Esta demonstrou mais próximo de 1 tendeu para a forma elíptica ($0 < \epsilon \leq 1$), que caracterizou ótima funcionalidade morfológica do complexo estomático. Para 30 dias, a maior média da excentricidade foi de 0,812 para T1 (com ventilação natural) e apresentou a forma elíptica ($p= 0,348$). Entretanto, os aumentos das médias foram devido à qualidade luminosa, porque existiram nos tratamento sem sacarose (T0) e com acréscimo de sacarose como as médias 0,768 (T2) e 0,720 (T3). Os tratamentos T2 e T3 apresentaram três e uma medições abaixo de 0,50 (forma circular); logo com tendência a problemas morfológicos e mau funcionamento (Tabela 2).

Após 90 dias, as médias de excentricidade foram 0,434 (T0), 0,471 (T1) e 0,383 (T2), que demonstraram a diminuição; porém, não apresentaram diferenças significativas entre as mesmas ($p= 0,571$). Logo, a diminuição das médias não foi causa por falta de sacarose, nem a umidade relativa do ar da câmara de germinação ou falta de ventilação natural. No presente trabalho, apresentou as médias de excentricidade para amostras foliares do meio ambiental, do laboratório, T1, T2 e T3 com tendência a forma mais elípticas para 30 dias de inoculação e, a forma circular para 90 dias (Tabela 2). Khan et al. (2002) relataram o formato elíptico que resulta em uma maior relação dos diâmetros polar e equatorial tal características sugere uma maior funcionalidade desses estômatos. Estudo de Zobayed et al.(2001b) apresentaram fotomicrografias de estômatos na epiderme abaxial das folhas de ápices recolhidos de mudas de couve-flor após 28 dias. As plântulas foram cultivadas em diferentes recipientes com; os hermético selados com rolha de borracha de silicone que apresentaram a morfologias incorretas das células subsidiárias e do ostíolos e com muito deformadas e com mau funcionamento (formas circulares); as com a ventilação difusivo e disco de polipropileno que demonstraram de morfologia incorreta e deformada; com a ventilação forçada lenta de fluxo com $5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ e a ventilação forçada rápida com a taxa de fluxo de $10 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, estas apresentaram estômatos mais elípticos e funcionais.

As médias de RGB para o complexo estomáticos

O tratamento T2 apresentou as tonalidades mais fortes nas três cores (RGB) das três áreas estomáticas, devido a acúmulos de polifenóis que explica a vitalidade e vigor dos

explantes para 30 dias de inoculação. O T3 (171,73) mostrou as tonalidades mais claras que os demais tratamentos, mesmo com acréscimo da amostra ambiental. Porém, não existiram diferenças significativas para as 9 médias de RGB (Tabela 3).

Para 90 dias, existiram diferenças significativas entre três cores (RGB) nos três locais do complexo estomático. Com acréscimo dos valores de RGB das amostras ambientais (T4), esta apresentou tonalidades mais claras dentre 6 das 9 médias de RGB que demonstrou pouco polifénolis, logo pouco metabólitos secundários devido deficiência fotossintética foliar (Tabela 4). Sendo coerente com Kozai e Kubata (2001) relataram a baixa atividade fotoautotrófica e de acordo com Kitaya et al. (2005) a baixa concentração de gás carbônico dentro dos tubos, devido à redução das trocas de gases com ambiente externo, resultando a grande perda de plantas durante aclimatização. Martins e colaboradores (2015) relataram que a micropropagação com altas concentrações de sacarose (45 g.L^{-1} e 60 g.L^{-1}) de *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley reduziram pigmentos fotossintéticos.

CONCLUSÕES

A micropropagação fotoautotrófica com 10 g de sacarose e ventilação natural promoveu o melhor crescimento *in vitro* de plantas de *Eugenia uniflora* L. e, apresentou menores alterações para morfologia estomática e fotossintética para 30 dias de inoculação.

REFERÊNCIAS

- BAGETTI, Milena. **Caracterização físico-química e capacidade antioxidante de pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. Santa Maria, RS. 83 p. 2009. Disponível em : < <http://www.livros01.livrosgratis.com.br/cp086004.pdf>. htm> . Acesso em 20 jan 2016.
- BANDEIRA, Juliana de Magalhães et al. **Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose de *Thymus vulgaris* L.** Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.472-474, jul 2007.
- BANDINELLI, Maurício Guerra. **Micropropagação e miniestaquia na propagação de batata**. Santa Maria, RS. 59 p. 2009. Disponível em: < http://cascavel.ufsm.br/tede//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=2469 > . Acesso em 12 jan 2016.
- BARBOZA, S. B. S. C. et al. **Comparative study of morphological parameters of Grand Nain banana (*Musa* AAA) after in vitro multiplication with growth retardants**. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 41: 185-194, 2005.
- BARROSO, Graziela Maciel et al. F. **Frutos e sementes: Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: Editora UFV, 443 p., 1999.
- CHANG, H.S. et al. **Micropropagation of *Calla lily* (*Zantedeschia albomaculata*) via in vitro shoot proliferation**. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 39:129-134, 2003.
- CHAPMAN, S.C.; BARRETO, H.J. **Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth**. Agronomy Journal, v.89, p.557-562, 1997.

COSTA, Frederico Henrique da Silva et al. **Crescimento e anatomia foliar de bananeiras submetidas a diferentes condições de cultivo in vitro**. *Bragantia*, 68:303-311, 2009a.

COSTA, Frederico Henrique da Silva et al. **Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeira micropropagadas durante a aclimatização**. *Ciência Rural*. Santa Maria, v.39, n.3, p.742-748, mai-jun 2009 b.

DIAS, Maria Jacqueline Thomazini. et al. **Adubação com nitrogênio e potássio em mudas de goiabeira em viveiro comercial**. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.33, suplemento 1, p. 2837-2848, 2012.

DIGNART, Samantha Léa et al. **Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo in vitro de *Cattleya walkeriana***. *Ciência e Agrotecnologia*, 33 (3):780-787, 2009.

ERIG, Alan Cristiano; SCHUCH, Márcia Wulff. **Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural**. *Ciênc. Rural*, Santa Maria, v.30, n.4, jul/ago 2005.

FALKER. **Manual do medidor eletrônico de teor clorofila (ClorofiLOG / CFL 1030)**. Porto Alegre: Falker Automação Agrícola.. 33p, 2008.

FUENTES, Gabriela et al. **Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve fiel survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets**. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, v.41, n.1, p.69-76, 2005.

GEORGE, E.F., DEBERGH, P.C. (Eds). **Micropropagation: Uses and Methods**. In: GEORGE, E.F., HALL, M.A., KLERK, G.J. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3 ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer, p.29-64, 2008.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th ed. São Paulo: Prentice-Hall, 915p., 2011.

HOFFMANN, Alexandre et al. **Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira "Marubakaido"**. Ciência e Agrotecnologia. Lavras, v.25, n.2, p.462-467, 2001.

INOUE, Maria Takao; GRAÇA, Maria Elisa Cortezzi; CORREA, Gabriel. **Capacidade fotossintética de plântulas micropropagadas e de mudas de *Eucalyptus tereticornis* SM.** Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo, n. 36, p.71-77, jan./jun. 1998.

JO, Eun-A et al. **In vitro sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets.** Plant Cell Tissue and Organ Culture. 96: 3, 307-315, 2009.

JOHANSEN, Donald Alexander. **Plant microtechnique.** New York, McGraw-Hill Book Co. Inc., 523 p. 1940.

JUNIOR, Élio Barbieri et al. **Um novo clorofilômetro para estimar os teores de clorofila em folhas de capim Tifton 85.** Santa Maria: Cienc. Rural. v.42, n.12, 2012.

JÚNIOR, José Severino de Lira et al. **Pitangueira.** Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, 87 p, 2007.

KAUR, Ratna Preeti. **Photoautotrophic micropropagation an emerging new vista in micropropagation-A review.** Agricultural Reviews. v. 36, n.3, p. 198-207, 2015.

KISS, A.; KOWALSKI, J.; MELZING, M. **Effect of *Epilobium angustifolium* L. Extracts and polyphenols on cell proliferation and neutral endopeptidaseactivity in selected cell lines.** Pharmazie v.61, p. 66-69, 2006.

KITAYA, Yoshiaki et al. **Manipulation of the culture environment on in vitro air movement and its impact on plantlets photosynthesis.** Plant Cell Tiss Org Cult. v.83, p.251-257, 2005. doi: 10.1007/s11240-005-6839-2.

KOZAI, Toyoki; KUBOTA, Chieri; JEONG, Byoung Ryong. **Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques** . Plant Cell, Tissue and Organ Culture. v.51, n.1, p. 49-56, 1997.

KOZAI, Toyoki.; KUBOTA, Chieri. **Developing a Photoautotrophic Micropropagation System for Woody Plants**. Journal of Plant Research, Tokyo, v. 114, p. 525-537, 2001.

KOZAI, Toyoki; AFREEN, Fawzia.; ZOBAYED, Sayed . **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Netherlands: Springer, 316 p., 2005.

KOZAI, Toyoki. Photoautotrophic micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis. Propagation of Ornamental Plants. v. 10, n.04, p. 188-204, 2010.

KUBOTA, C. ; TADOKORO, N. Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, New York, v.35, p.296-298, 1999.

KRAUS, Jane Elizabeth e ARDUIN, Marcos. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. EDUR. 198 p., 1997.

KHAN, P.S.S.V., KOZAI, T., NGUYEN, O.T., KUBOTA, C. e DHAWAN, V. (2002) **Growth and water relations of Paulownia fortunei under photomixotrophic and photoautotrophic conditions**. Biologia Plantarum. 46:161-166.

LEE, M.H.; CHIOU, J.F.; YEN, K.Y. **EBV DNA polymerase inhibition of tannins from Eugenia uniflora** .Cancer letters 154, 131-136, 2000.

LOPES, Precila Zambotto. **Propagação vegetativa e interação com endomicorrizas arbusculares em mirtáceas nativas do Sul do Brasil**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. 120 p. Março de 2009.

LORENZI, Harri. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Editora Planturum, v.2, 1998.

LORENZI, Harri e MATOS, Francisco José de Abreu. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

LEDERMAN, I. E.; BEZERRA, J. E.F.; CALADO, G. **A pitangueira em Pernambuco**. Recife: IPA, 1992. 20p.

MARTINS, João Paulo Rodrigues. et al. **Effects of salts and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae)**. AJCS 9(1): 85-91 (2015).

MURASHIGE, Toshio e SKOOG, Folke. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. Physiologia Plantarum. (15): 3, 473-497,1962.

NASCIMENTO, F.M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F. de; QUEIROZ, A. J. M. **Análise comparativa de polpas de pitanga integral, formulada e em pó**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais. Campina Grande, v.8, n.1, p. 25-33, 2006.

NETO, Biano Alves. de Melo et al. **Caracterização físico-químico da geléia de pitanga roxa (*Eugenia uniflora* L.)**. In: VII Congresso Norte- Nordeste de Pesquisa e Inovação. Palmas, 10, 2012, Palmas. Anais eletrônicos... Palmas: 2012. Disponível em< <http://prop.ipto.edu.br/ocs/index.php/connepi/vii/paper/viewFile/2371/2889> >. Acesso em 10 out 2015.

OH, Myung Min et al. **Physicochemical properties of mixtures of inorganic supporting materials affect growth of potato (*Solanum tuberosum* L.) planlets cultured photoautotrophically in a nutrient-circulated micropropagation system**. Hort. Environ. Biotechnol. 53(6): 497-504, 2013.

OLIVEIRA, Eli Carlos e MIGLIOMANZA, Édison. Dimensões e densidade estomática em diferentes variedades de mandioca. **Cultivando o Saber**. Cascavel, v.6, n.4, p.201-213, 2013.

PENCHEL Ricardo M, OTONI Wagner Campos e XAVIER Aloisio. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: BORÉM A (Ed.) **Biotechnologia florestal**. p75-92, 2009.

REZENDE, R.K.S et al. **Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam.** Ciênc. Agrotec., Lavras, v.32, n.3, p821-827, mai./jun., 2008.

SILVA, Adriano Bortolotti et al. **Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro.** Interciencia. 33(11): 839-843, 2008.

SILVA, Paulo Roberto Diniz et al. **A regenerative route for *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) through in vitro germination and micropropagation.** Ann. For. Res. 57(1): 39-45, 2014.DOI: 10.15287/afr.2014.179.

SKREBSKY, Etiane Caldeira; NICOLOSO, Fernando Teixeira e MALDANER, Joseila. **Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida in vitro sob diferentes doses de sacarose.** Ciência Rural. Santa Maria, v.36, n.5, p.1416-1423, set-out, 2006.

TEIXEIRA, Marianne Pinheiro et al. **Ethnobotany and antioxidant evaluation of commercialized medicinal plants from the Brazilian Pampa.** 2015. Acta Bot Bras. 30: 47-59,

XIAO, Yulan e NIU, Genhua. **Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system.** 2011. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 105 (2): 149-158.

CAPÍTULO 2.

A new approach for light microscopy studies of stomatal complex using sodium hydroxide staining



A new approach for light microscopy studies of stomatal complex using sodium hydroxide staining

Journal:	Anais da Academia Brasileira de Ciências
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Silva, Paulo; Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel Moura, Tatiana; Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel Silva, Denise; Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel Gallon, Fernanda; Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel Castro, Ferdinando ; Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel Stefenon, Valdir; Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel
Keyword:	Histochemical analysis, stomatal complex, phenolic compounds, histochemistry
Classifications:	Ciências Biológicas (Biological Sciences)

A new approach for light microscopy studies of stomatal complex using sodium hydroxide staining

Abstract: This study aimed to develop a method for staining paradermic histological preparations paradermic for analyses of the stomatal complexes in plants. Sodium hydroxide is used in order to break the lactonic ring of coumarins, generating yellowish pigments that dye the guard and subsidiary cells of the stomatal complexes. The proposed method performed better than the iron chloride method in 11 out of 20 plant species tested. The spectral values and the microscopic images suggest that this method is useful, fast and low-cost for histological studies of stomatal complexes of species rich in phenolic compounds.

Keywords: Phenolic compounds, histochemical analysis, stomatal complex

A new approach for light microscopy studies of stomatal complex using sodium hydroxide staining

Authors: Paulo Roberto Diniz da Silva^{1,2}, Tatiana Silveira Moura¹, Denise Czarnescki da Silva¹, Fernanda Illamas Gallon^{1,2}, Ferdinando Bisogno de Castro¹, Valdir Marcos Stefenon^{1,2}

Affiliation:

¹ Nucleus of Plant Tissue Culture, Interdisciplinary Center of Biotechnological Research, Universidade Federal do Pampa, BR290 km 423, Bairro Pirai, 97300-000, São Gabriel, RS, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa, BR290 km 423, Bairro Pirai, 97300-000, São Gabriel, RS, Brazil

***Corresponding author:** valdirstefenon@unipampa.edu.br

Abstract: This study aimed to develop a method for staining paradermic histological preparations for analyses of the stomatal complexes in plants. Sodium hydroxide is used in order to depolymerize polyphenols and to stain the stomatal complex, being effective in species from families that are rich in polyphenols. The proposed method performed better than the iron chloride method in 13 out of 20 plant species tested. The spectral values and the microscopic images suggest that this method is useful, fast and low-cost for histological studies of stomatal complexes in polyphenol-rich plant species.

Keywords: Histochemical analysis, stomatal complex, phenolic compounds, histochemistry

INTRODUCTION

During million of years, plants developed several compounds which are used as chemical interface with the environment. Some of such secondary metabolites are intimately associated to defense strategies of plants, being extremely important (Heath 2002, Matem and Kneusel 1988). These defense compounds are basically phenols and polyphenols that help the development of structural and biochemical mechanisms, generating resistance to diseases and predators (Nicholson and Hammerschmidt 1992). Pathogenic infestations may occur through fissures in the wax layer or through natural openings in the plant such as stomata and hydathodes (Medeiros et al. 2003). Therefore, some plant families present a high amount of phenolic compounds in leaves (e.g. Conde et al. 1997, Teixeira et al. 2016), mainly around the cells of the stomatal complex, where they act as a protective agent against bacterial and fungal infections (Laloraya et al. 1986). While being quite important for the plant defense, phenols directly influence histochemical methods, sometimes making light microscopic studies of plant tissues difficult.

Histochemical staining codifies biological structures and biomolecules with specific colors, supporting microscopic observation (Horobin 2001). This is one of the principal approaches employed in plant sciences, from anatomical to genetic modification studies. Studies on plant anatomy employ histochemical methods based on different staining compounds, depending on the plant structure to be observed. These methods are based on chromatic reactions used to recognize the chemical nature of membranes and cellular content (Costa and Cunha 2000). The most commonly employed staining compounds are the astrablue, the alcian blue, the safranin, the basic fuchsin, and the iron chloride (Johansen 1940). Colorimetric methods based on the use of iron chloride as staining compound are largely used in histochemical analysis of leaf tissues. However, for some plant species that produce high

content of phenolic compounds, this approach may generate low definition coloration of stomatal complex.

In this study, we present a method for staining stomatal complexes based on the oxidation of phenolic compounds with sodium hydroxide. The protocol was tested in 20 plant species and the iron chloride method (Johansen 1940) was used as comparative approach in the analysis of paradermic histological preparations of the stomatal complex.

MATERIAL AND METHODS

PLANT MATERIAL AND SAMPLE PREPARATION

The sodium hydroxide protocol was tested in 20 plants belonging to 10 botanical families (two plants from each family): Asteraceae [*Baccharis dracunculifolia* D.C. and *Baccharis crispa* D.C.]; Cyperaceae [*Cyperus distans* L. f. and *Cyperus rotundus* L.]; Euphorbiaceae [*Euphorbia millii* Des Moul and *Ricinus communis* L.]; Lamiaceae [*Hyptis brevipes* and *Ocimum basilicum*]; Malvaceae [*Malvastrum coromandelianum* (L.) Garke and *Triumfetta semitriloba* Jacq.]; Myrtaceae [*Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden) and *Eugenia uniflora* L.]; Poaceae [*Andropogon bicornis* L. and *Saccharum angustifolius* Nees]; Portulacaceae [*Portulaca striata* Poelln and *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd.]; Rhamnaceae [*Hovenia dulcis* Thunberg and *Scutia buxifolia* Reissek] and Rosaceae [*Fragaria ananassa* L. and *Rubus occidentalis* L.].

Ten basal leaves were collected from each species during the daylight at the summer season, totalizing 10 preparations for each species. Voucher specimens were deposited in the Herbarium Bruno Edgar Irgang (HBEI) of the Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, Brazil.

Samples of about 1.0 cm² of each leaf were individually treated into test tubes with 10 mL of 50% nitric acid solution and heated to unleash the epidermis. After cooling, tubes

were maintained for 5 seconds in ultrasonic bath. The epidermises were transferred into Petri plates with distilled water, extended and transferred to microscope slide. For each species, five samples were prepared using the sodium hydroxide method and five were prepared using the iron staining method.

STAINING PROCEDURES

Sodium hydroxide staining consisted in dropping 10 μL of 10% aqueous sodium hydroxide solution over the sample stretched on a microscope slide. For species from families Cyperaceae and Poaceae, which epidermis lacks suberous and silicified cells, post-staining was employed, dropping 10 μL of safranin O solution (1% aqueous solution) after the sodium hydroxide staining.

The iron staining protocol was performed according to Johansen (1940), by dropping 10 μL of ferric chloride (10% aqueous solution). Microscope slide of all samples were mounted in 100 μL of gelatin-glycerin at 40° C and maintained at room temperature for 24 hours to dry.

VISUALIZATION AND IMAGE CAPTURE

Samples were visualized under a light microscope IMAGER A2 (Carl Zeiss, Germany) and photographed with an AXIOCAM ERC5S color camera (Carl Zeiss, Germany). Images were captured in TIFF format, using the software AXIOVISION SE64 REL.4.9.1 (Carl Zeiss, Germany).

COLOR SPECTRUM ANALYSIS

The color spectrum of the images was compared between methods as a measure of the contrast, in order to evaluate the significance of the visual difference of the pictures. For each plant species, images of 30 stomata for each staining method were evaluated. Eleven points were selected in each stomata (two in the subsidiary cells, six in the guard cells and three in the stomatal opening) and the software IMAGE J was used to analyze the spectrum of red, green and blue in all points, with values ranging from 0 (darker tonality) to 255 (lighter

tonality). For each species, nine spectral means were evaluated [three colors (red, green and blue) for three stomatal structures (guard cells, subsidiary cells and stomatal opening)]. Means of each stomatal structure were obtained as the average of all measured points.

Data of the color spectrum were compared across methods using the *t*-test, variance analysis, variation coefficient and degree of association for methods per species using the software STATISTIC 7.0 and RSTUDIO. Means were compared through the Tukey's test ($\alpha = 5\%$).

RESULTS AND DISCUSSION

In comparison to the iron chloride method, the sodium hydroxide protocol propitiated better color contrast of the histological preparations for 13 out of the 20 studied species. Such better contrast was observed for *Baccharis crispa* (**Figure 1C**), *Ricinus communis* (**Figure 2C**), *Eucalyptus grandis* (**Figure 3A**), *Eugenia uniflora* (**Figure 3C**), *Portulaca striata* (**Figure 4A**), *Talinum triangulare* (**Figure 4C**), *Malvastrum coromandelianum* (**Figure 5A**), *Ocimum basilicum* (**Figure 6C**) and *Hovenia dulcis* (**Figure 7A**). Tonalties from light yellow to light brown prevailed in the guard and subsidiary cells of these species. The stomatal opening presented dark coloration in *R. communis*, *E. grandis*, *E. uniflora* and *O. basilicum*. In *H. dulcis*, the guard cells revealed a bluish color and the stomatal opening presented yellow tonality.

The histological preparations for *Baccharis dacunculifolia* (**Figure 1B**), *Euphorbia milli* (**Figure 2B**), *Triumfetta semitriloba* (**Figure 5D**), *Hyptis arvensis* (**Figure 6B**), *Ocimum basilicum* (**Figure 6D**), *Scutia buxifolia* (**Figure 7D**), *Fragaria ananassa* (**Figure 8B**) and *Rubus occidentalis* (**Figure 8D**) revealed better color contrast for the iron chloride method, presenting yellowish tonalties, with main coloration of the cell walls and light staining of the cellular content.

For Cyperaceae and Poaceae, the treatments with sodium hydroxide + safranin revealed better results for all evaluated species: *Andropogon bicornisi* (**Figure 9B**), *Saccharum angustifolius* (**Figure 9E**), *Cyperus distans* (**Figure 10B**) and *Cyperus rotundus* (**Figure 10E**). However, for *A. bicornisi*, the resolution of the pictures is about the same for this treatment and the iron chloride protocol (**Figures 9B** and **9C**), presenting significant difference of the color spectra between treatments in only two out of nine means (**Table I**).

Several staining methods are used in botanical microtechnique. These methods are based on the capacity of differently dye cellular structures according to their distinct chemical composition. In our analysis of paradermic tissues, the redox reaction of the sodium hydroxide with the polyphenols of the studied leaves was used as a method to histochemically dye the stomatal complex of 20 plant species from 10 families.

Stomata are cellular structures with important physiological function in the leaf, but are also an entrance doors for pathogens. Therefore, different protection mechanisms evolved in plants for combating such organisms, as the production of phenolic compounds that inhibit the growth of pathogens (Lattanzio et al. 2006). Alkaline treatments were found to be effective in releasing bound phenolics in phenolic extractions (Dai and Mumper 2010), through the depolymerization of polyphenols into their monomeric and dimeric fractions (White et al. 2010). This propriety was employed to stain the stomatal complex in our procedure, being quite effective in species from families that are rich in polyphenols. On the other hand, species from families Poaceae and Cyperaceae, with low content of tannins presented weak staining of the stomatal complex. However, the use of sodium hydroxide+safranin allowed a better visualization of the stomatal complex of Poaceae (**Figures 9B** and **9E**).

Overall treatments, statistically significant difference concerning spectral data was observed in 140 out of 180 tests (20 species, three colors, three stomatal structures; **Table I**). *Baccharis dracunculifolia*, *E. grandis*, *E. uniflora*, *H. dulcis* and *F. ananassa* presented statistically significant difference for all nine means. For *C. rotundus*, *M. coromandelica*, *T. semitriloba* and *T. triangulare*, only one of the means revealed non-significant difference, while *B. crispa*, *E. millii*, *O. basilicum*, *P. striata* and *R. occidentalis* revealed two means with non-significant difference between methods. *Saccharum angustifolius*, *S. buxifolia*, *C. distans*, *R. communis* and *H. arvensis* presented six means with significant difference between methods, while *A. bicornis* revealed only two means with significant difference (**Table I**).

The present work introduces a histochemical procedure for light microscopic studies of epidermal preparations. The sodium hydroxide method is a fast and low-cost approach for histological studies of stomatal complexes in plant species rich in polyphenols, such as Myrtaceae, as closely shown for *Eugenia uniflora* using 1000X magnification (**Figures 11A and 11B**). However, statements with regard to the applicability of a new reagent should always be made with care since the complex structural differences among plants will always prevent any one reagent or method from being of universal application (Johansen 1940). Thus, the use of this procedure has to be tested for other species, enlarging the extent of techniques available for researchers interested in plant histology. Moreover, the nontoxic chemicals used make it a useful technique for teaching purposes.

Acknowledgements: Authors acknowledge the financial support, grants and scholarships provided by CNPq/Brazil (Process 474758/2012-5 and 442995/2014-8), CAPES, FAPERGS and Universidade Federal do Pampa (PROPESQ and PROPG).

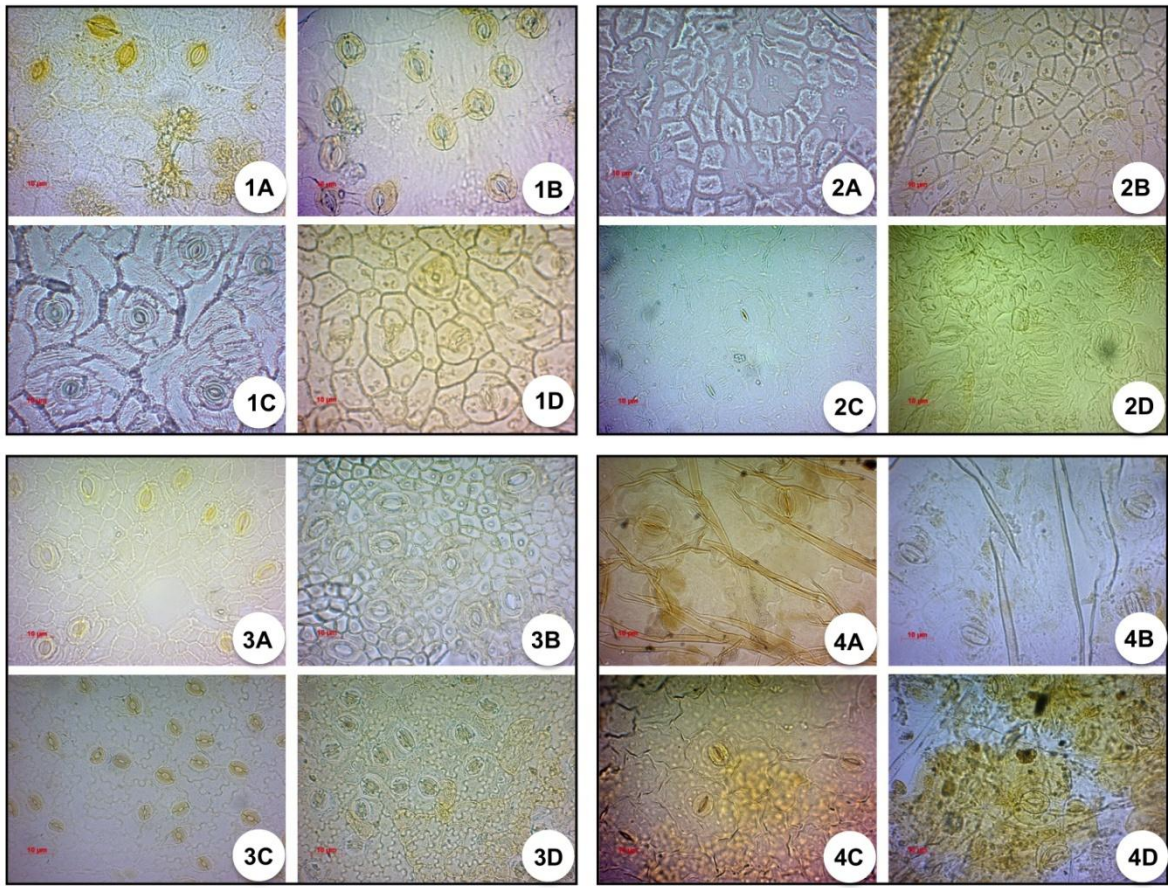
Resumo – Este estudo objetivou o desenvolvimento de um método para coloração de preparações histológicas paradérmicas para análise do complexo estomático em plantas. Hidróxido de sódio foi usado para quebrar o anel lactônico dos compostos fenólicos, gerando pigmentos amarelados que coram células guarda e células subsidiárias dos complexos estomáticos. O método proposto apresentou melhor performance que do cloreto férrico em 11 de 20 espécies de plantas testadas. Os valores espectrais e as imagens de microscopia sugerem que o método é útil, rápido e de baixo custo para estudos histológicos do complexo estomático em espécies vegetais ricas em compostos fenólicos.

Palavras-chave: compostos fenólicos, análise histoquímica, complexo estomático, histoquímico

References

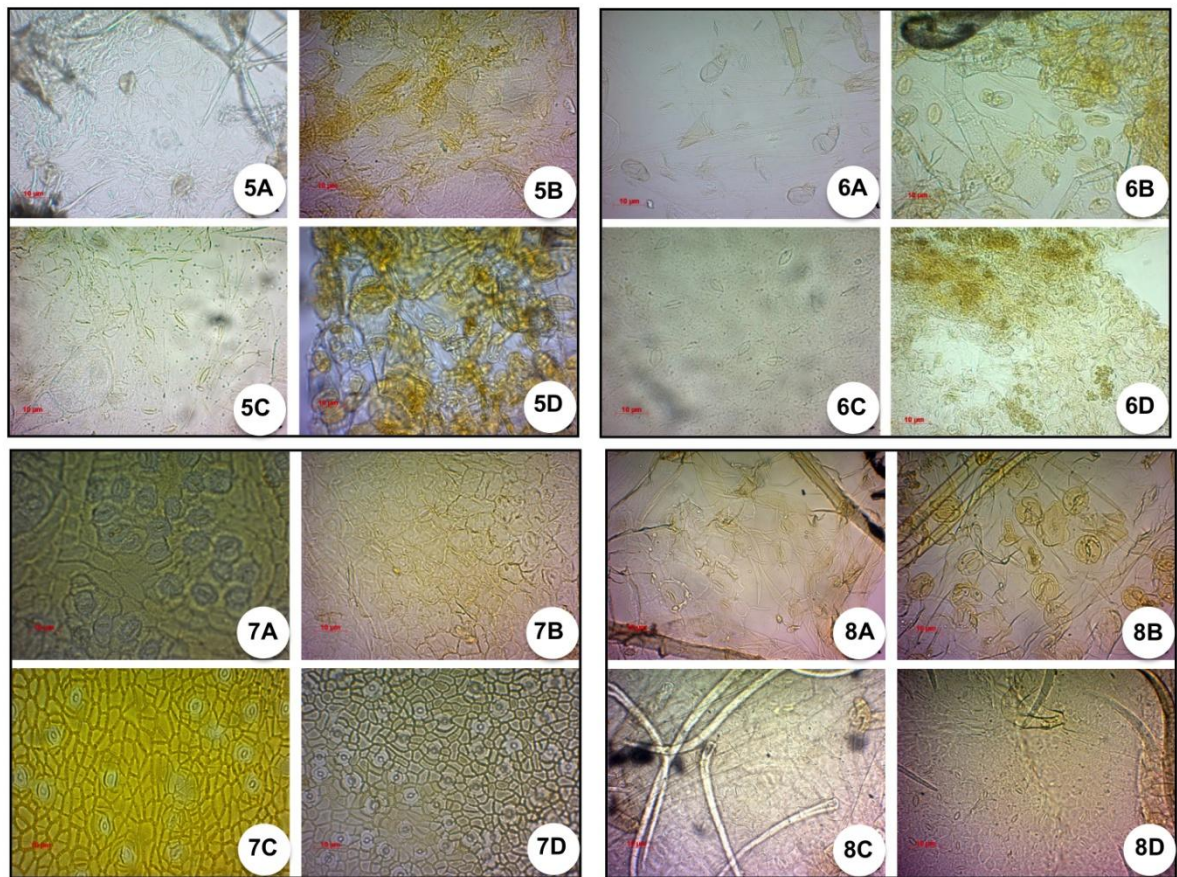
- CONDE E, CADAHÍA E AND GARCÍA-VALLEJO MC. 1997. High-pressure liquid chromatographic analysis of polyphenols in leaves of *Eucalyptus camaldulensis*, *globulus* and *rudis*: Proanthocyanidins, ellagitannins and flavonol glycosides. *Phytochemical Analysis*. 8(2): 78-83.
- COSTA AF AND CUNHA AP. 2000. *Farmacognosia* v. 3. Lisboa: Editora Calouste Gulbenkian.
- DAI J AND MUMPER RJ. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313-7352.
- HEATH MC. 2002. Secondary metabolites and plant defence. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 60: 273-274.
- HOROBIN RW. 2001. *Histochemical staining*. Editora John Wiley & Sons : 172p. doi: 10.1038/npg.els.0002644.
- JOHANSEN DA. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book Co. Inc., 523 p.

- LALORAYA MM, NOZZOLILLO C, PUROHIT S AND STEVENSON L. 1986. Reversal of Abscisic Acid induced stomatal closure by trans-cinnamic and p-coumaric acid. *Plant Physiol.* 81, 253-258.
- LATTANZIO V, LATTANZIO VMT AND CARDINALI A. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: IMPERATO F. (e.) *Phytochemistry: Advances in research. Research Signpost, Kerala.* p. 23-67.
- MATEM U AND KNEUSEL R. 1988. Phenolic compounds in plants disease resistance. *Phytoparasitica* 16(2): 153-170.
- MEDEIROS RB, FERREIRA MASV AND DIANESE JC. 2003. Mecanismos de agressão e defesa nas Interações planta-patógeno. p.289.
- NICHOLSON RL AND HAMMERSCHINDT R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol* 30: 369-389.
- TEIXEIRA MP, CRUZ L, FRANCO JL, VIEIRA RB AND STEFENON VM. 2016. Ethnobotany and antioxidant evaluation of commercialized medicinal plants from the Brazilian Pampa. *Acta Bot Bras* 30: 47-59.
- WHITE BL, HOWARD LR AND PRIOR RL. 2010. Release of Bound Procyanidins from Cranberry Pomace by Alkaline Hydrolysis. *J Agric Food Chem* 58: 7572–7579.

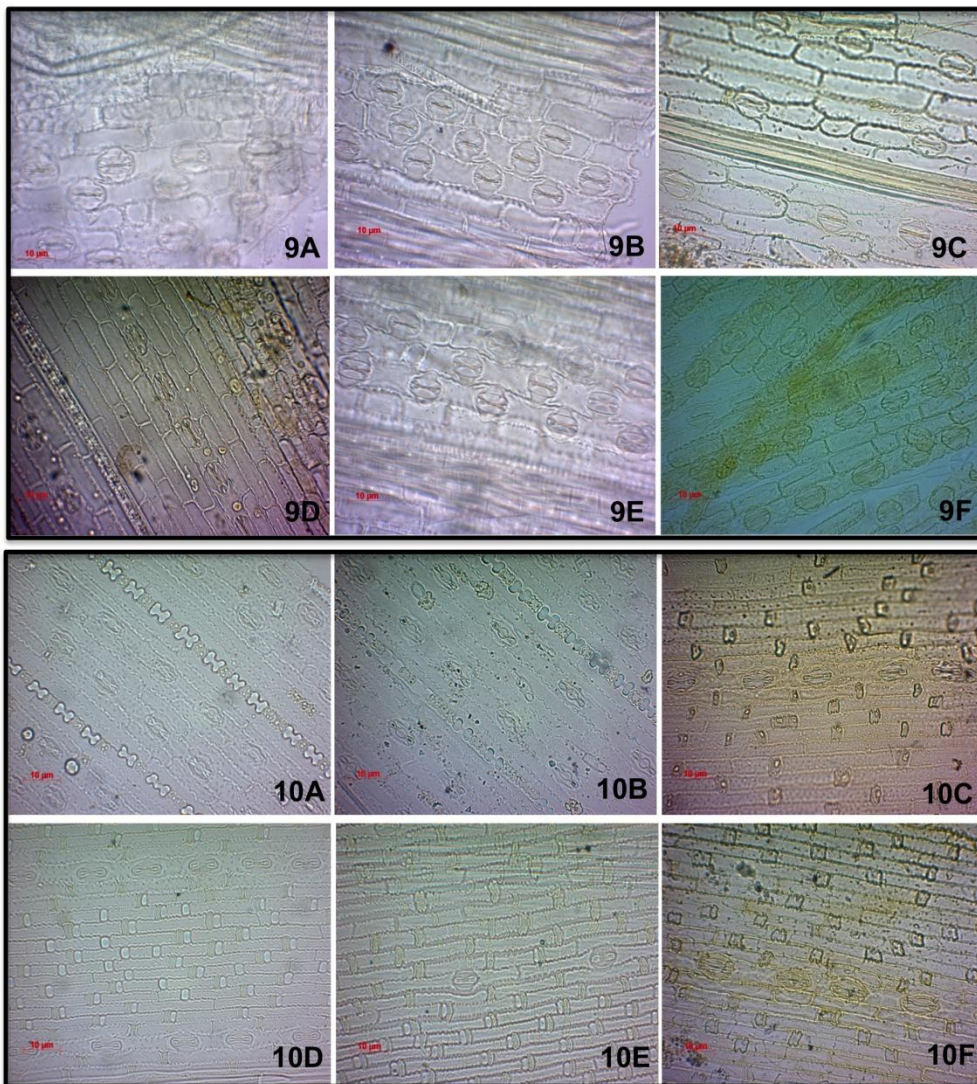


Figures 1-4 - Light micrograph pictures captured with 400x magnification. For all species, pictures A and C were stained using the sodium chloride method, while pictures B and D were stained using the iron hydroxide method. (1A-B) *Baccharis dracunculifolia*; (1C-D) *Baccharis trimera*; (2A-B) *Euphorbia millii*; (2C-D) *Ricinus communis*; (3A-B) *Eucalyptus grandis*; (3C-D) *Eugenia uniflora*; (4A-B) *Portulaca striata*; (4C-D) *Talinum triangulare*.

1057x793mm (72 x 72 DPI)



Figures 5-8 - Light micrograph pictures captured with 400x magnification. For all species, pictures A and C were stained using the sodium chloride method, while pictures B and D were stained using the iron hydroxide method. (5A-B) *Malvastrum coromandelianum*; (5C-D) *Triumfetta semitriloba*; (6A-B) *Hyptis arvensis*; (6C-D) *Ocimum basillicum*; (7A-B) *Hovenia dulcis*; (7C-D) *Scutia buxifolia*; (8A-B) *Fragaria vesca*; (8C-D) *Rubus occidentalis*.
1057x793mm (72 x 72 DPI)



Figures 9-10 - Light micrograph pictures captured with 400x magnification. For all species, pictures A and D were stained using the sodium chloride method, pictures B and E were stained using sodium chloride+safranin and pictures C and F were stained using the iron hydroxide method. (9A-C) *Andropogam bicornisi*; (9D-F) *Eranthus angustifolius*; (10A-C) *Cyperus distans*; (10D-F) *Cyperus rotundus*
1057x793mm (72 x 72 DPI)

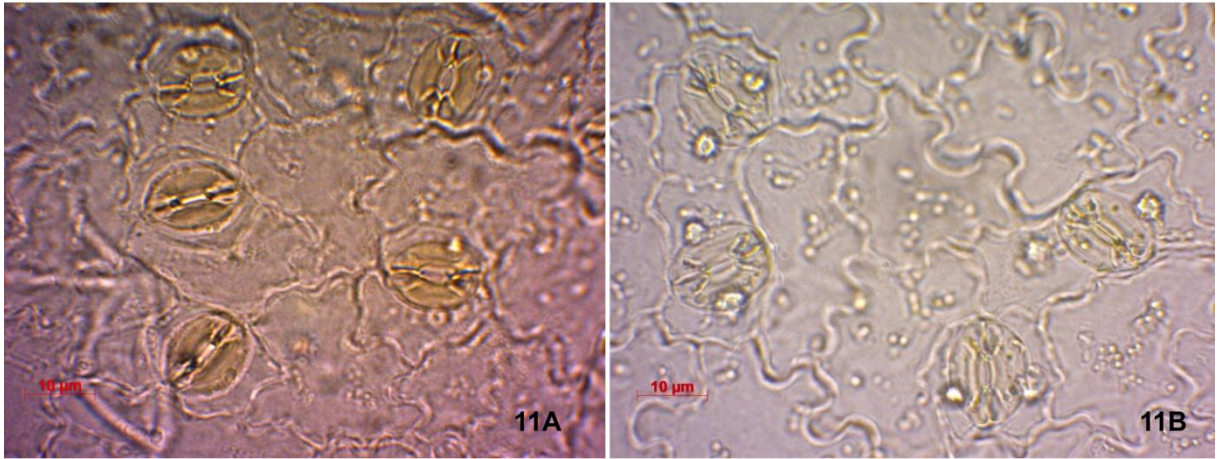


Figure 11 - Light micrograph pictures of *Eugenia uniflora* captured with 1000x magnification. (A) staining with the sodium chloride method; (B) staining with the iron hydroxide method.
1057x793mm (72 x 72 DPI)

Anais da Academia Brasileira de Ciências

Table I

Means and standard deviation for the analysis of red, green and blue spectra in subsidiary cells (six points measured), guard cells (three points measured) and stomatal opening (two points measured). Shaded cells represent means that statistically differ between methods ($p < 0.05$).

Family/ Species	Method	Subsidiary cells			Guard			Stomatal openings			
		Red	Green	Blue	Red	Green	Blue	Red	Green	Blue	
Asteraceae	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	NaOH	149.12 (34.948)	150.24 (13.817)	134.83 (15.955)	147.12 (16.012)	142.29 (13.284)	88.33 (16.952)	148.51 (31.815)	135.93 (30.367)	66.35 (31.740)
		FeCl ₃	201.10 (24.416)	197.23 (22.796)	190.10 (25.229)	192.76 (19.001)	197.29 (26.720)	190.96 (32.717)	185.80 (42.498)	192.01 (31.405)	181.09 (44.763)
	<i>Baccharis trimera</i>	NaOH	147.42 (39.740)	163.75 (46.821)	183.17 (44.354)	138.91 (45.361)	152.32 (41.577)	163.91 (40.819)	164.10 (38.916)	170.92 (32.021)	177.40 (49.439)
		FeCl ₃	210.65 (24.630)	201.82 (22.218)	179.90 (27.047)	209.56 (25.570)	201.03 (20.328)	176.91 (32.028)	199.06 (38.055)	192.70 (28.982)	168.37 (35.426)
Cyperaceae	<i>Cyperus distans</i>	NaOH	135.95 (25.311)	138.40 (18.820)	135.32 (22.325)	139.42 (26.010)	141.84 (22.858)	137.92 (26.577)	136.56 (23.099)	136.66 (20.926)	132.70 (25.801)
		FeCl ₃	113.22 (39.368)	155.80 (32.440)	149.00 (33.365)	118.18 (41.061)	158.02 (36.755)	145.56 (38.571)	109.56 (35.330)	158.01 (35.320)	143.52 (35.524)
		NaOH + Safranim	185.58 (34.149)	191.61 (36.086)	191.81 (35.002)	180.02 (43.359)	177.46 (40.241)	174.67 (46.385)	172.34 (35.330)	169.70 (41.967)	164.53 (38.211)
	<i>Cyperus rotundus</i>	NaOH	114.92 (38.595)	156.45 (32.932)	153.37 (34.515)	120.20 (41.382)	161.88 (33.295)	153.06 (31.854)	100.44 (26.489)	159.00 (36.320)	144.93 (38.504)
		FeCl ₃	137.97 (15.711)	136.87 (19.287)	129.53 (17.121)	130.76 (18.621)	128.00 (16.992)	121.44 (20.011)	124.30 (25.896)	127.85 (15.321)	120.33 (19.021)
		NaOH + Safranim	194.47 (26.761)	192.78 (27.089)	204.95 (25.791)	195.94 (35.876)	189.11 (35.748)	199.58 (35.482)	163.83 (40.336)	149.88 (33.076)	168.91 (35.065)
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia pulchra</i>	NaOH	132.93 (30.879)	137.32 (30.951)	154.05 (40.532)	138.17 (32.956)	140.27 (33.252)	156.37 (40.729)	138.27 (38.357)	146.61 (41.747)	158.39 (43.810)
		FeCl ₃	168.63 (21.596)	164.88 (18.243)	155.37 (28.918)	172.68 (16.086)	171.20 (15.983)	169.04 (22.016)	161.33 (17.899)	160.23 (20.716)	156.34 (29.067)
	<i>Ricinus communis</i>	NaOH	193.57 (21.400)	204.93 (20.199)	211.02 (20.773)	192.34 (48.234)	207.61 (40.201)	192.78 (46.466)	157.54 (77.946)	174.12 (34.420)	148.29 (79.222)
Lamiaceae	<i>Hyptis arvensis</i>	NaOH	177.50 (33.369)	181.48 (12.169)	183.83 (17.499)	181.11 (17.377)	189.54 (16.127)	191.53 (21.193)	141.87 (35.817)	150.26 (37.581)	151.04 (41.283)
		FeCl ₃	189.55 (25.775)	205.85 (23.478)	183.73 (28.053)	178.92 (30.277)	196.16 (25.404)	154.37 (21.515)	173.13 (34.005)	192.42 (29.302)	154.22 (29.848)
	<i>Ocimum basilicum</i>	NaOH	175.35 (15.721)	177.22 (19.959)	182.82 (19.237)	191.19 (24.116)	194.52 (25.302)	195.53 (24.048)	152.39 (45.424)	153.94 (47.402)	153.37 (48.855)
		FeCl ₃	198.24 (32.051)	214.34 (32.824)	188.29 (37.400)	192.47 (29.711)	211.05 (29.701)	173.16 (31.157)	191.18 (41.801)	208.47 (37.215)	175.59 (35.511)
Malvaceae	<i>Adhucium coronavulvarium</i>	NaOH	196.05 (21.717)	199.78 (24.561)	205.50 (29.166)	194.45 (22.229)	198.33 (26.448)	205.03 (28.149)	190.66 (27.566)	197.53 (29.231)	202.60 (31.576)
		FeCl ₃	184.48 (25.349)	183.03 (28.036)	175.48 (28.036)	193.16 (28.022)	188.68 (26.984)	180.68 (37.363)	172.42 (40.420)	178.04 (35.441)	164.03 (38.922)
	<i>Triplaris americana</i>	NaOH	195.52 (24.433)	202.95 (25.711)	198.80 (23.231)	197.01 (26.081)	199.38 (24.611)	189.83 (27.936)	188.66 (30.747)	192.88 (31.225)	183.40 (34.147)
Myrtaceae	<i>Eucalyptus grandis</i>	NaOH	184.48 (25.969)	181.32 (27.331)	173.43 (36.183)	193.14 (24.436)	188.47 (22.635)	176.04 (32.100)	174.67 (38.892)	174.81 (32.347)	163.50 (38.521)
		FeCl ₃	211.6 (18.39)	216.00 (16.290)	200.40 (20.950)	210.30 (16.620)	210.80 (17.220)	180.60 (21.390)	219.60 (21.900)	214.90 (22.100)	171.96 (33.950)
	<i>Eugenia uniflora</i>	NaOH	181.00 (15.378)	185.71 (13.681)	189.75 (25.189)	184.37 (16.651)	189.83 (19.302)	186.79 (24.194)	181.52 (20.198)	186.13 (23.969)	186.13 (33.085)

Anais da Academia Brasileira de Ciências

		FeCl₃	151.08 (25.430)	145.18 (24.027)	135.15 (22.245)	141.10 (23.444)	140.05 (23.297)	127.18 (20.064)	138.06 (21.432)	125.23 (20.594)	110.69 (21.746)
		NaOH	153.72 (25.595)	163.85 (21.907)	167.10 (23.344)	161.45 (25.423)	169.48 (26.469)	169.10 (32.039)	149.84 (26.877)	160.10 (27.873)	169.10 (32.070)
	<i>Andropogon bicornis</i>	FeCl₃	144.27 (40.685)	140.78 (41.186)	120.30 (43.703)	153.92 (47.492)	147.49 (40.687)	129.59 (40.231)	137.02 (54.572)	129.36 (43.447)	129.59 (40.231)
		NaOH + Safranin	181.95 (35.262)	181.23 (33.498)	188.95 (35.267)	170.69 (39.115)	161.79 (33.443)	169.18 (35.860)	179.79 (35.862)	157.04 (26.726)	169.18 (35.860)
		NaOH	163.77 (29.036)	167.85 (21.819)	172.12 (24.930)	165.85 (28.097)	168.66 (24.036)	164.72 (28.602)	158.57 (32.415)	164.52 (31.859)	161.14 (33.330)
	<i>Eriarthra aegypsiifolia</i>	FeCl₃	153.73 (21.778)	150.00 (18.955)	138.50 (24.262)	146.46 (20.081)	141.84 (26.529)	129.79 (27.336)	95.744 (46.894)	112.06 (24.320)	112.42 (23.929)
		NaOH + Safranin	144.37 (20.681)	132.30 (21.778)	142.07 (21.747)	147.22 (24.923)	130.88 (20.880)	143.74 (29.694)	103.07 (26.250)	80.644 (29.304)	89.356 (28.892)
		NaOH	172.10 (24.069)	159.23 (28.547)	110.47 (28.698)	171.29 (24.069)	152.16 (28.752)	95.167 (25.091)	151.30 (72.725)	133.04 (27.879)	55.644 (48.122)
	<i>Pennisetum striatum</i>	FeCl₃	163.82 (27.901)	170.25 (25.339)	190.12 (23.033)	167.95 (29.701)	178.74 (27.174)	190.57 (26.072)	132.23 (27.803)	151.78 (23.434)	169.39 (28.789)
		NaOH	169.28 (28.220)	151.10 (29.609)	131.82 (23.826)	186.16 (25.135)	159.92 (23.467)	124.25 (28.955)	125.03 (75.064)	108.21 (20.431)	66.267 (28.765)
	<i>Tillandsia triangularis</i>	FeCl₃	163.53 (32.982)	175.58 (25.881)	175.55 (46.552)	164.26 (25.056)	167.78 (22.759)	150.59 (26.873)	151.56 (46.180)	154.82 (43.845)	136.99 (21.544)
		NaOH	111.68 (25.835)	116.58 (15.378)	95.983 (13.078)	116.32 (16.057)	122.47 (14.263)	103.32 (15.347)	113.29 (17.918)	112.66 (16.552)	85.400 (13.352)
	<i>Hemelia dulcis</i>	FeCl₃	162.08 (23.813)	161.07 (29.564)	153.72 (28.122)	158.06 (25.260)	158.85 (21.179)	151.82 (22.728)	135.77 (48.626)	140.70 (29.433)	136.83 (41.377)
		NaOH	158.60 (21.266)	155.72 (25.358)	35.950 (29.789)	161.57 (23.490)	165.35 (23.687)	88.150 (28.946)	164.73 (42.897)	164.73 (42.897)	92.922 (22.329)
	<i>Scutia buzifolia</i>	FeCl₃	156.37 (24.049)	150.40 (20.270)	131.50 (29.764)	168.33 (21.213)	163.61 (27.387)	151.89 (24.481)	137.20 (28.110)	137.20 (29.110)	123.23 (47.624)
		NaOH	197.00 (21.665)	182.25 (29.312)	170.32 (24.032)	189.61 (40.438)	177.16 (23.368)	151.89 (42.103)	176.90 (47.958)	156.28 (23.265)	136.31 (23.791)
	<i>Prunella mexica</i>	FeCl₃	158.38 (27.575)	143.03 (29.520)	128.67 (29.023)	163.16 (20.706)	143.72 (25.679)	107.79 (26.049)	146.10 (26.322)	133.04 (25.718)	100.06 (25.866)
		NaOH	120.02 (20.216)	127.70 (23.317)	113.30 (23.801)	121.62 (24.892)	123.82 (23.958)	103.32 (22.052)	105.84 (21.683)	117.88 (21.879)	106.14 (23.772)
	<i>Rubus occidentalis</i>	FeCl₃	111.67 (26.792)	117.55 (28.652)	118.33 (24.671)	141.68 (21.750)	143.49 (26.454)	133.89 (24.909)	137.60 (21.950)	134.60 (29.008)	133.14 (24.196)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente estudo sugere que trabalhos futuros de micropropagação fotoautotrófica deverão ser testado, com ventilação forçada e qualidade da luz de LED com tonalidades vermelhas e azuis, a partir do possível diagnosticar os impactos das concentrações de sacarose sobre os sistemas fotossintéticos e os complexos estomáticos.

APÊNDICE

Tabela 01: As médias da densidade estomática dos tratamentos, amostras ambiental e laboratório para 30 e 90 dias.

Período	Tratamentos (Sacarose)					
	Densidade estomática (estom/mm ²)					
	Germ Amb	Germ lab	T0 (0g)	T1 (10g)	T2 (20g)	T3 (30g)
30 dias	72,29 a	100,23 a	-	65,31a	73,77 a	84,02
90 dias	74,47 a	103,63a	232,20	107,72b	176,83 b	-

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em coluna diferem entre si, pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Tabela 2: Diâmetros polares, diâmetros equatoriais e as excentricidades dos tratamentos para 30 e 90 dias.

Tratamentos Sacarose	D polar (µm)		D equatorial (µm)		Excentricidade (ε)	
	30 dias	90 dias	30 dias	90 dias	30 dias	90 dias
Ambiental	6,18 ^a		4,42 ^a		0,699 ^a	
T0 (0g)	-	5,66 ^b	-	5,10 ^b	-	0,434 ^a
T1(10g)	6,95 ^a	6,94 ^a	4,05 ^a	6,12 ^a	0,813 ^a	0,471 ^a
T2 (20g)	4,42 ^b	5,11 ^c	2,83 ^b	4,72 ^b	0,768 ^a	0,383 ^a
T3 (30g)	3,33 ^c	-	2,31 ^c	-	0,720 ^a	-

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes em coluna diferem entre si, pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Tabela 3: Médias e desvio padrão das tonalidades RGB dos complexos estomáticos para 30 dias .

Médias e desvio padrão de RGB para 30 dias dos estômatos											
FAMÍLIA/ ESPÉCIES	Trata NaOH	Células subsidiárias			Células-guarda			Ostíolos			
		Vermelh o	Verde	Azul	Vermelh o	Verde	Azul	Vermelh o	Verde	Azul	
Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i>	Ambiental	166.62 ±13,05	191.43 ±13,24	179.57 ± 7,50	162.89 ±12,38	183.40 ±13,47	152.24 ±13,85	154.66 ±38,67	177.89 ±34,72	139.29 ±26,98
		Sacarose 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Sacarose 10	159,35 ± 8,17	177,55 ±31,35	142,60 ±27,20	168,73 ±34,97	188,65 ±28,11	144,00 ±29,94	146,87 ±35,37	161,67 ±36,79	124,80 ±48,21
		Sacarose 20	154,33 ±24,05	163,57 ±19,71	131,87 ±23,61	150,99 ±28,67	159,25 ±25,67	123,99 ±26,31	139,13 ±43,47	144,22 ±36,85	117,50 ±35,27
		Sacarose 30	171,73 ±28,89	183,42 ±29,67	147,88 ±33,47	170,98 ±35,33	181,91 ±33,68	146,41 ±35,53	156,90 ±49,79	168,26 ±46,31	138,48 ±44,35

Tabela 4: As médias e os desvios padrão de RGB dos tratamentos de sacarose para os complexos estomáticos para 90 dias.

Médias e desvio padrão de RGB para 90 dias dos estômatos											
FAMÍLIA/ ESPÉCIES	Tratamento NaOH	Células subsidiárias			Células-guarda			Ostíolos			
		Vermelh o	Verde	Azul	Vermelh o	Verde	Azul	Vermelh o	Verde	Azul	
Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i>	Ambiental	166.62 ± 13,05	191.43 ± 13,24	179.57 ± 17,50	162.89 ± 12,38	183.40 ± 13,47	152.24 ± 13,85	154.66 ± 38,67	177.89 ± 34,72	139.29 ± 26,98
		Sacarose 0	197,29 ± 28,40	164,14 ± 18,39	118,05 ± 35,77	196,66 ± 26,46	158,75 ± 21,05	105,42 ± 33,49	185,77 ± 6,98	152,86 ± 37,40	99,56 ± 45,22
		Sacarose 10	186,31 ± 28,10	151,59 ± 22,80	101,44 ± 34,15	186,40 ± 30,34	152,68 ± 27,13	103,44 ± 32,00	178,83 ± 39,04	144,26 ± 38,53	101,60 ± 36,80
		Sacarose 20	188,15 ± 28,93	157,03 ± 25,19	120,42 ± 32,26	189,71 ± 24,55	158,66 ± 19,18	116,72 ± 30,41	178,43 ± 46,14	147,13 ± 38,53	106,19 ± 38,45
		Sacarose 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 5: Composição do meio de cultura MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962).

Componentes	MS Básico mg L ⁻¹ + suplementações	MS Modificado 1 mg L ⁻¹ + suplementações	MS Modificado 2 mg L ⁻¹ + suplementações	WPM Básico mg L ⁻¹ + suplementações
NH ₄ NO ₃	1650	1650	825	400
KNO ₃	1900	1900	950	-
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2	6,2
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170
K ₂ SO ₄	-	-	-	990
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	-	-	556
KI	0,83	0,83	0,83	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	440	440	96
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	370	370
MnSO ₄ ·H ₂ O	-	-	-	22,3
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	22,3	22,3	-
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	8,6	8,6	8,6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,25
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8	-	27,8
Tiamina HCl	0,1	0,1	0,1	1,0
Ác. nicotínico	0,5	0,5	0,5	0,5
Piridoxina HCl	0,5	0,5	0,5	0,5
Glicina	2,0	2,0	2,0	2,0
Inositol	100,0	100,0	100,0	100,0
Sacarose	30000	30000	15000	30000
PVP	250	250	250	250
Carvão Ativado	-	1000	1000	1000
Benomil	-	1000	1000	1000
Ágar	7000	7000	3500	7000