

Anatomia comparada de folhas de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) e pimenta de macaco (*Piper aduncum* L.) cultivadas *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*

Simone de Alencar Maciel ¹

Renata Beltrão Teixeira ²

Andrea Raposo ²

Paulo Cesar Poeta Fermino Junior ^{3*}

¹ Universidade Federal do Acre, Pós-graduação em Agronomia – Produção Vegetal
Campus Universitário, BR-364, Km 04, CEP: 69.920-900, Rio Branco – AC, Brasil

² Embrapa Acre, Rodovia BR-364, Km 14, CEP: 69.908-970, Rio Branco – AC, Brasil

³ Universidade Federal do Acre, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza
Campus Universitário, BR-364, Km 04, CEP: 69.920-900, Rio Branco – AC, Brasil

* Autor para correspondência
paulo.fermino@pq.cnpq.br

Submetido em 09/03/2014
Aceito para publicação em 29/07/2014

Resumo

Piper hispidinervum e *Piper aduncum* apresentam compostos metabólitos secundários como safrol e dilapiol de interesse comercial em seus óleos essenciais. O trabalho teve como objetivo comparar aspectos anatômicos, relacionados a respostas fisiológicas das folhas de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. Secções paradérmicas e transversais da lâmina foliar do cultivo *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*, feitas à mão-livre foram realizadas para a medição das estruturas anatômicas em microscópio de luz. A espessura da epiderme e hipoderme de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* sofrem alterações na transição de cultivo *in vitro* para o *ex vitro*. Os tecidos do mesófilo e a abertura do poro estomático de ambas as espécies são influenciados pelo ambiente *in vitro*. Diferentes ambientes de cultivo promovem a plasticidade das estruturas celulares da lâmina foliar e fundamentam o sucesso da micropropagação de ambas as espécies.

Palavras-chave: Amazônia Sul-Occidental; Micropropagação; Piperaceae; Variação estrutural

Abstract

Comparative leaf anatomy of long pepper (*Piper hispidinervum* C. DC.) and spiked pepper (*Piper aduncum* L.) cultured *in vitro*, *ex vitro* and *in vivo*. *Piper hispidinervum* and *Piper aduncum* contain the secondary metabolites safrole and dilapiol, and there is commercial interest in their essential oils. The study aimed to compare anatomical aspects related to physiological responses of leaves from *P. hispidinervum* and *P. aduncum* propagated *in vitro*, *in vivo* and during acclimatization. Paradermal sections and cross-sections of leaves from *in vitro*, *ex vitro* and *in vivo* culture, were obtained for the measurement of anatomical structures using a light microscope. The thickness of the epidermis and hypodermis of *P. hispidinervum* and *P. aduncum* underwent changes in the transition from *in vitro* to *ex vitro*. Mesophyll tissues and stomatal pore opening of both species were influenced by the environment *in vitro*. Different cultivation environments promote the plasticity of the cellular structures of the leaf blade and underlie the success of micropropagation of both species.

Key words: Micropropagation; Piperaceae; Southwest Amazon; Structural variation

Introdução

A Floresta Amazônica apresenta muitas espécies de plantas com importância econômica, em especial àquelas com potencial fitoquímico. Dentre as espécies, a pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC) e a pimenta de macaco (*Piper aduncum* L.) são valorizadas economicamente (LOUREIRO DA SILVA et al., 2012) e muito utilizadas pela indústria de cosméticos e bioinseticidas, por apresentarem compostos secundários do metabolismo. A extração de óleos de folhas e ramos de pimenta longa contém safrol, o qual é amplamente utilizado como fragrância e ingrediente essencial para inseticidas biodegradáveis à base de piretrum (BERGO et al., 2005). A pimenta de macaco produz dilapiol, o qual é responsável pelas atividades fungicidas, inseticidas, pelo efeito antibiótico (SOUSA et al., 2008), e pelos efeitos medicinais de populações amazônicas como auxiliar no combate a úlcera, anti-hemorragico e anti-diarreico (RODRIGUES; CARVALHO, 2001; FENNER et al., 2006).

Considerando esses aspectos, a pimenta longa e pimenta de macaco apresentam boas características para a produção comercial. Para tanto, a cultura de tecidos tem sido requerida para a produção em larga escala. A propagação *in vitro* permite a produção de um elevado número de plantas, em curto espaço de tempo e de alta qualidade genética e fitossanitária (GEORGE, 1996; DORRIS, 2010). Um protocolo para a propagação *in vitro* de *Piper hispidinervum* e *P. aduncum* já foi desenvolvido por Loureiro da Silva et al. (2012) a partir de segmentos nodais como fonte de explante, com 100% de sobrevivência de plântulas em casa de vegetação (aclimatizadas).

O cultivo *in vitro* pode causar alterações anatômicas, morfológicas e fisiológicas nas plantas, prejudicando a aclimatização das plantas micropropagadas (ALBARELLO et al., 2001; CALVETE et al., 2002). Os brotos desenvolvidos *in vitro* estão expostos a um microambiente controlado, organizado para gerar estresse mínimo, mas com ótimas condições para a multiplicação (HAZARIKA, 2006). O modo heterotrófico de nutrição e a falta de mecanismos de controle de perda de água estabelecem plantas vulneráveis ao choque no

transplântio para a casa de vegetação (*ex vitro*) ou campo (LAMHANEDI et al., 2003).

As folhas são órgãos vegetais especializados em diversos processos metabólicos como a fotossíntese, as trocas gasosas e a transpiração (KERBAUY, 2012). As folhas desenvolvidas *in vitro* apresentam o mesofilo e o sistema vascular extremamente simplificado quando comparados com as folhas desenvolvidas em casa de vegetação (HAZARIKA, 2006). Os estômatos em plantas cultivadas *in vitro* estão relacionados significativamente com a capacidade de fotossíntese e o processo de aclimatização (IACONO; MARTINELLI, 1998). Pospíšilová et al. (1999) citam que os estômatos de plantas sob o sistema de cultivo *in vitro* são malformados, mais arredondados, reduzidos em número e inábeis para a função, tornando as plantas mais suscetíveis à desidratação na fase de aclimatização. A plasticidade das estruturas anatômicas durante o processo de cultivo *in vitro* e a posterior aclimatização (*ex vitro*) possibilitam compreender o sucesso da micropropagação (FERMINO-JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2009).

O objetivo do trabalho foi descrever e comparar aspectos anatômicos, relacionados a respostas fisiológicas das folhas de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização.

Material e Métodos

Foram utilizadas para o estudo as espécies *Piper hispidinervum* C.DC e *Piper aduncum* L., conforme depósitos de exsicatas (Voucher number) nº RB 2523 e RB 2524, respectivamente, no Herbário do Parque Zoológico da Universidade Federal do Acre.

Para a realização das análises anatômicas utilizaram-se como fonte de materiais vegetais folhas sadias, do segundo e terceiro nós, de ambas as espécies, desenvolvidas em três condições de cultivo: cultivo *in vitro*, cultivo *ex vitro* (aclimatização) e cultivo *in vivo*. Para o cultivo *in vitro*, sementes de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* foram desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 30 minutos, seguidas de três lavagens em água esterilizada. O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado

com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹ de agar-agar. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,2$ antes da adição do agar e da autoclavagem, realizada por 15 minutos a 121°C e 1,3 atm de pressão. As sementes foram inoculadas em frascos de 250 mL contendo 30 mL de meio, cada frasco foi constituído por 5 sementes, vedados com filme plástico transparente. Após 60 dias de cultivo *in vitro*, realizou-se a retirada aleatória de plântulas com posterior coleta de suas folhas.

As plântulas retiradas foram seccionadas na base (próximo ao colo) para a inoculação em meio de enraizamento. O enraizamento das plântulas formadas *in vitro* foi realizado em meio de cultura de MS, suplementado com 15 g.L⁻¹ de sacarose e 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, por um período de 30 dias. Em seguida, as plântulas foram transferidas para a casa de vegetação tecnológica e acondicionadas em tubetes plásticos (6,5 cm de diâmetro x 14 cm de altura) contendo substrato comercial Plantmax[®]. Após 60 dias de aclimatização, foi realizada a retirada aleatória de plântulas com posterior coleta de suas folhas para os estudos anatômicos.

Para os estudos de folhas *in vivo* foram utilizadas plantas de ambas as espécies plantadas a partir de sementes e mantidas a campo em Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Acre, desde 1995, sendo que anualmente são realizadas adubações, podas e renovação das plantas. As coletas de folhas foram realizadas após 60 dias de plantio.

Para os estudos anatômicos, foram utilizados o terço médio das regiões intercostais de folhas fixadas em FAA 70 (JOHANSEN, 1940) e conservadas em etanol 70%. Para a morfometria das estruturas anatômicas foram preparadas lâminas temporárias através de secções paradérmicas e transversais à mão-livre, com auxílio de lâmina de barbear. Para detecção de cutícula foi utilizado Sudan III (KRAUS; ARDUIN, 1997). As imagens das lâminas foram projetadas, com auxílio de câmara clara acoplada ao Microscópio de Luz (ML), modelo Olympus CH30, sobre o papel e aferida com escala micrométrica. Para determinar a densidade estomática média por mm² da folha, as imagens foram projetadas sobre área delimitada conhecida. Para a mensuração das espessuras dos tecidos e das estruturas os contornos foram desenhados em papel e medidos com régua milimetrada

e, em seguida, aferidas com escala micrométrica. Para os registros fotográficos foram preparadas lâminas permanentes. Segmentos de folhas foram fixados em glutaraldeído 2,5% com tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,2. Posteriormente, o material foi desidratado em série etílica, e incluído em parafina. Os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo Leica RM2125 RT com espessura de 10 µm, e corados com safranina e *fast green* (JOHANSEN, 1940).

Para os estudos em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) as amostras de folhas foram fixadas, conforme descrito anteriormente, seguida de pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2% por 2 h, novamente lavado por três vezes em tampão fosfato de sódio e lavado uma vez em água destilada, ambos por 5 minutos. O material foi desidratado em série etílica lenta e gradual por duas vezes de 15 minutos, e conservado em etanol 70% sob refrigeração. Em seguida, foram processadas em secador de ponto crítico, fixadas em suportes metálicos (stubs) com fita adesiva dupla face de carbono e metalizadas com película de ouro (20 nm) e analisadas ao MEV, modelo Zeiss DSM 962.

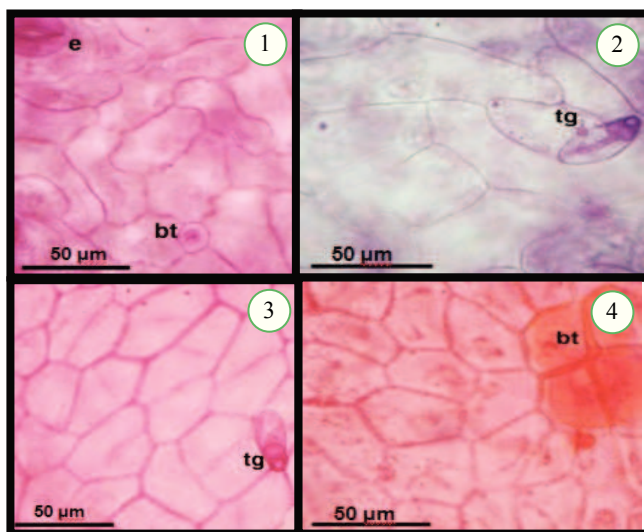
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado para cada uma das condições de cultivo em ambas as espécies. Avaliaram-se parâmetros morfométricos anatômicos nas três condições de cultivo (tratamentos). Os tratamentos foram constituídos por oito repetições (campos visuais no microscópio), e cada repetição foi constituída por trinta secções histológicas de três indivíduos.

Os dados foram submetidos aos procedimentos de detecção de *Outliers* pelo teste de Grubbs (1969). As médias foram submetidas ao teste de normalidade dos resíduos (SHAPIRO; WILK, 1965) e teste de homogeneidade (BARTLETT, 1937). Os dados das variáveis que não atenderam a um ou ambos os pressupostos foram transformados para normalização dos resíduos e/ou homogeneização das variâncias. As médias foram comparadas por ANOVA, seguida do teste de separação de médias de Tukey (1949) a 5% de probabilidade, através do programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2003).

Resultados e Discussão

A epiderme na face adaxial de folhas de *Piper hispidinervum* C. DC e *Piper aduncum* L. é uniestratificada com paredes anticlinais sinuosas (Figuras 1 e 2) no cultivo *in vitro*, e retas (Figuras 3 e 4) no cultivo *ex vitro* e *in vivo*. Na face abaxial, as paredes são levemente sinuosas em todas as condições de cultivo em ambas as espécies. Segundo Alquini et al. (2003), a sinuosidade da parede anticlinal está relacionada com o ambiente em que a folha se desenvolve. Em *P. hispidinervum* e *P. aduncum* foi observada a existência de tricomas tectores e glandulares, pluricelulares e unisseriados. Albiero et al. (2005), trabalhando com a espécie *P. gaudichaudianum*, observaram também a presença de tricoma glandular, porém do tipo unicelular e ovoide, possuindo uma porção apical secretora. Em *Piper regnelli* ocorrem tricomas glandulares capitados em ambas as faces, raros tricomas tectores pluricelulares, unisseriados e de extremidade afilada, estes últimos sob as nervuras (PESSINI et al., 2003).

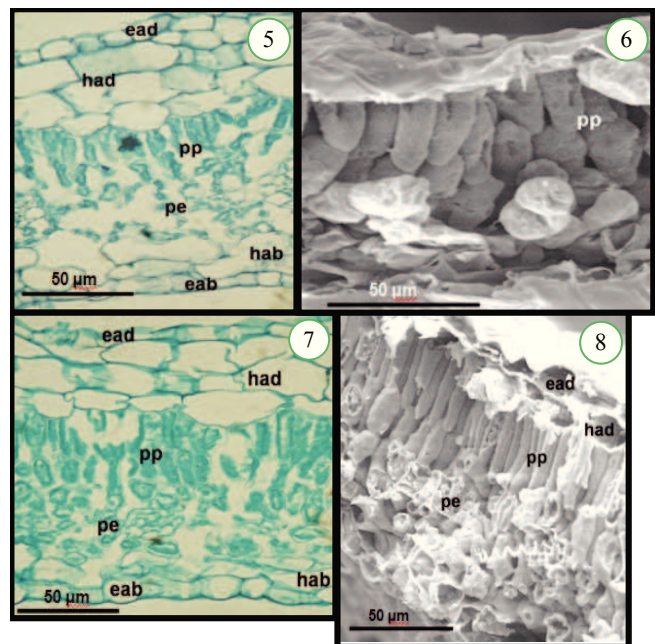
FIGURAS 1-4: Secções paradérmicas da face adaxial de folhas de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* em diferentes ambientes de cultivo. Células epidérmicas no cultivo *in vitro* de *Piper hispidinervum* (1) e de *Piper aduncum* (2). Células epidérmicas no cultivo *ex vitro* e *in vivo* de *Piper hispidinervum* (3) e de *Piper aduncum* (4). Legenda: e= estômatos; tg = tricoma glandular; bt = células basais do tricoma.



Sob a epiderme nas faces adaxial e abaxial existem 1-3 camadas celulares (Figuras 5 a 8), caracterizada

como hipoderme, em ambas as espécies, onde podem ocorrer idioblastos oleíferos, conforme Nascimento e Vilhena-Potiguara (1999). Camadas celulares múltiplas também foram definidas como hipoderme em *Piper* L. ssp. (YUNCKER, 1972), *P. aduncum* L. (VIANNA; AKISUE, 1997), e *P. hispidum* Sw. (ALBIERO et al., 2006).

FIGURAS 5-8: Secções transversais de folhas de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*. Lâmina foliar de *Piper hispidinervum* no cultivo *in vitro* em ML (5) e em MEV (6). Lamina foliar de *Piper aduncum* no cultivo *ex vitro* em ML (7) e em MEV (8). Legenda: ead= epiderme da face adaxial; eab= epiderme da face abaxial; had=hipoderme da face adaxial; hba= hipoderme da face abaxial; pp= parênquima paliádico; pe= parênquima esponjoso.



A espessura da epiderme em ambas as faces, e a hipoderme adaxial de *P. hispidinervum* foi significativamente maior na condição *ex vitro* (Tabela 1). Tais resultados diferem dos obtidos por Costa et al. (2009) estudando bananeiras, onde verificaram maior variação na hipoderme da face abaxial em relação a adaxial durante a aclimatização. Pereira (2004) trabalhando com a espécie *Uncaria guianensis*, entretanto, não observou diferença significativa na espessura da epiderme abaxial durante a aclimatização. As diferenças nas dimensões das estruturas epidérmicas encontradas em diferentes condições ambientais refletem

TABELA 1: Espessura da epiderme (EAD e EAB) e hipoderme (HAD e HAB) da face adaxial e abaxial, respectivamente (μm), de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* sob diferentes condições de cultivo.

	Condições de cultivo	Espessura das estruturas			
		EAD	EAB	HAD	HAB
<i>P. hispidinervum</i>	In vitro	6,09 c	6,09 c	12,65 b	22,28 a
	Ex vitro	13,78 a	13,59 a	53,39 a	40,58 a
	In vivo	10,53 b	9,36 b	18,24 b	10,20 b
	CV(%)	8,26	9,48	11,14	16,32
<i>P. aduncum</i>	In vitro	11,98 ab	7,64 c	20,04 a	23,27 a
	Ex vitro	13,86 a	13,11 a	25,15 a	18,09 b
	In vivo	10,43 b	9,34 b	26,04 a	18,22 b
	CV(%)	14,70	6,46	28,01	15,30

Médias seguidas de mesma letra na coluna na mesma espécie não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

as adaptações aos papéis múltiplos envolvidos para a sobrevivência (JAVELLE et al., 2011).

Em relação às células da hipoderme, de acordo com Madison (1977) o aumento da espessura dessas células pode estar relacionado com mecanismo de armazenamento de água, além de exercer papel importante nas relações térmicas. Braga et al. (2011) relatam que plantas que se desenvolveram heterotroficamente sob condições de cultivo *in vitro*, em alta umidade, passam por um período de adaptação, quando submetidas a condições autotróficas, com baixa umidade durante a aclimatização, em razão da grande diferença entre os dois ambientes. Nesse contexto, os resultados indicam que *P. hispidinervum* desenvolveu uma estratégia de armazenamento de água na hipoderme como uma adaptação para suportar as condições *ex vitro*.

Os estômatos em folhas de *P. hispidinervum* são do tipo ciclocítico e tetracítico distribuídos em ambas as

faces, porém mais frequentes na face abaxial. Em folhas de *P. aduncum*, os estômatos são tetracíticos, comuns na família Piperaceae (SOUZA et al., 2004), distribuídos em ambas as faces, porém raros na face adaxial.

A densidade estomática na face abaxial de folhas de *P. hispidinervum* não apresentou variação nos diferentes cultivos (Tabela 2). Os resultados obtidos para *P. hispidinervum* foram semelhantes aos verificados para *Anona coriacea* (SANTANA et al., 2008), onde a mesma densidade estomática foi verificada nas condições *in vitro* e *ex vitro*. Entretanto, para *P. aduncum* a maior densidade foi observada no cultivo *in vivo* e a menor no cultivo *in vitro* (Tabela 2). O elevado coeficiente de variação calculado na densidade estomática para *P. hispidinervum* em relação a *P. aduncum* indica maior plasticidade estrutural nessa espécie.

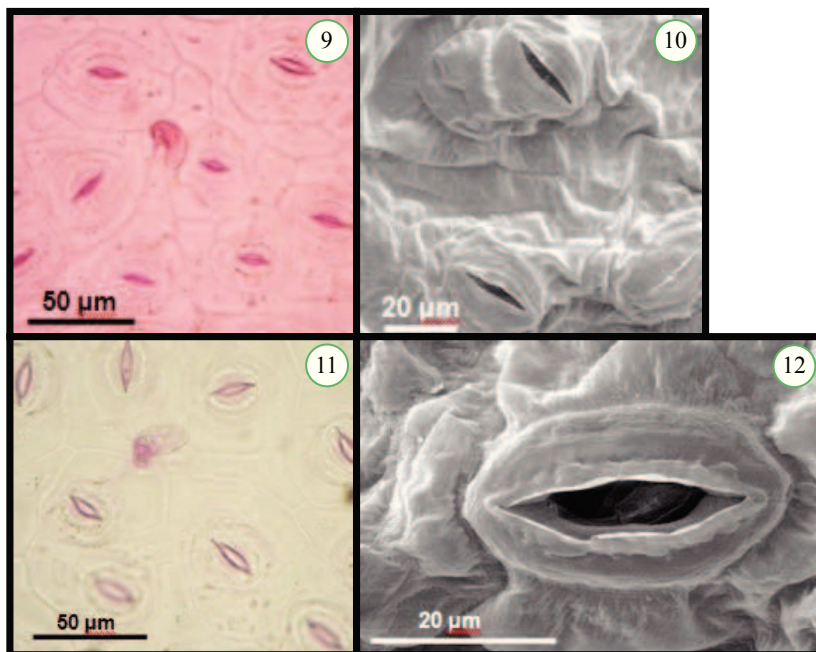
Os estômatos na face abaxial de folhas de *P. hispidinervum* (Figuras 9 e 10) e *P. aduncum* (Figuras

TABELA 2: Densidade estomática em est/mm² e dimensão estomática em comprimento (CCG) e largura (LCG) das células-guarda, comprimento e largura do poro (LP) em μm , na face abaxial das folhas de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* sob diferentes condições de cultivo.

Espécie	Condições de cultivo	Est/mm ²	CCG	LCG	CP	LP
<i>P. hispidinervum</i>	<i>In vitro</i>	475,41 a	24,82 c	6,26 a	18,56 b	7,38 a
	<i>Ex vitro</i>	441,25 a	32,66 a	5,57 b	21,74 a	4,16 b
	<i>In vivo</i>	538,75 a	27,70 b	5,42 b	18,23 b	3,79 b
	CV(%)	23,64	3,73	7,35	5,84	7,31
<i>P. aduncum</i>	<i>In vitro</i>	476,25 b	32,57 b	6,91 a	23,49 b	5,91 a
	<i>Ex vitro</i>	439,16 c	36,54 a	5,90 b	26,61 a	4,80 b
	<i>In vivo</i>	542,08 a	30,02 c	5,31 c	23,39 b	3,76 c
	CV(%)	0,48	3,91	5,87	5,15	6,89

Médias seguidas de mesma letra na coluna na mesma espécie não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

FIGURAS 9-12: Secções paradérmicas da face abaxial de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*. Estômatos de folhas de *Piper hispidinervum* no cultivo *in vitro* em ML (9) e em MEV (10). Estômatos de folhas de *Piper aduncum* no cultivo *in vitro* em ML (11) e em MEV (12).



11 e 12) apresentaram maiores dimensões da largura das células-guarda e largura do poro estomático nas folhas da condição *in vitro* (Tabela 2). Em ambas as espécies o aumento da dimensão dos estômatos no cultivo *in vitro* pode estar relacionado à falta de controle no mecanismo de abertura e fechamento estomático, pois quando as plantas se desenvolvem em condição *ex vitro*, os estômatos possuem dimensões menores, adaptando-se para o controle da perda de água. De acordo com Pospíšilová et al. (1999), os estômatos *in vitro* são inábeis para a função, tornando as plantas mais

susceptíveis à desidratação na fase de aclimatização.

A lâmina foliar de *P. hispidinervum* foi mais espessa no cultivo *ex vitro* quando comparadas com as demais condições de cultivo (Tabela 3). Em *P. aduncum*, a lâmina foliar foi mais espessa nos cultivos *ex vitro* e *in vivo*. Mudanças estruturais na lâmina foliar podem ser verificadas como respostas às condições ambientais (FERMINO-JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2009). O maior desenvolvimento dos tecidos da lâmina foliar após a aclimatização (*ex vitro*) também foram

TABELA 3: Espessura da lâmina foliar, mesofilo, parênquima paliçádico (PP) e parênquima esponjoso (PE), em µm, de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* sob diferentes condições de cultivo.

	Condições de cultivo	Lâmina Foliar	Espessura das estruturas		
			Mesofilo	PP	PE
<i>P. hispidinervum</i>	<i>In vitro</i>	93,42 c	81,24 c	20,36 c	24,79 c
	<i>Ex vitro</i>	223,24 a	196,46 a	52,06 b	50,42 a
	<i>In vivo</i>	147,29 b	127,38 b	66,70 a	32,23 b
	CV(%)	12,67	13,99	10,46	15,76
<i>P. aduncum</i>	<i>In vitro</i>	109,87 b	90,16 b	24,52 b	23,27 b
	<i>Ex vitro</i>	173,11 a	146,13 a	47,31 a	43,52 a
	<i>In vivo</i>	142,92 ab	123,12 ab	49,45 a	33,24 b
	CV(%)	4,22	4,83	16,37	9,74

Médias seguidas de mesma letra na coluna, na mesma espécie, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

observados por diversos autores, como em mamacadela (*Brosimum gaudichaudii*) (FIDELIS et al., 2000), *Annona glabra* (DECCETTI, 2004), sangra d'água (*Croton urucurana*) (LIMA, 2004), candeia (*Eremanthus erythropappus*) (ROSAL, 2004), cagaita (*Eugenia dysenterica*) (MARTINOTTO, 2004), abacaxi (BARBOSA et al., 2006).

O parênquima paliçádico em *P. hispidinervum* e *P. aduncum* foi mais espesso nos cultivos *ex vitro* e *in vivo*, e menor no cultivo *in vitro*. De acordo com Dickison (2000), o parênquima paliçádico consiste num tecido especializado na captura de luminosidade. A luminosidade apresenta efeito direto sobre a estrutura e anatomia das folhas (RODRIGUEZ-CALCERRADA et al., 2008). Nos sistemas de cultivo *in vitro*, a luminosidade é bastante inferior àquela observada na aclimatização (*ex vitro*) ou a pleno sol no ambiente natural (HAZARIKA, 2006). O aumento na espessura do parênquima paliçádico em folhas expostas a maior luminosidade está associado com o aumento da superfície celular para trocas gasosas de CO₂, acarretando aumento na atividade fotossintética (EVANS; POORTER, 2001; TOMÁS et al., 2013). O aumento de superfície das células do parênquima paliçádico em folhas expostas a maior luminosidade facilitam a exposição dos cloroplastos ao gás carbônico, aumentando a atividade fotossintética (TERASHIMA et al., 2011). Nesse sentido, folhas de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* em cultivo *ex vitro* e *in vivo* recebem maior intensidade luminosa e devem promover aumento na atividade fotossintética com o maior espessamento do parênquima paliçádico. De acordo com Gratani (2014), as modificações estruturais nas folhas para a interceptação de diferentes intensidades luminosas constituem importante estratégia para o aproveitamento e uso de energia disponível.

O parênquima esponjoso em folhas de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* do cultivo *ex vitro* apresentaram-se mais espesso do que em folhas de plantas *in vitro* e *in vivo*, promovendo maior espessamento do mesofilo. Estes dados corroboram com o trabalho de Abbade et al. (2009), que realizaram estudos com *Tabebuia roseo alba* e verificaram que as plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram espessuras

do parênquima esponjoso superiores às do cultivo *in vitro*. De acordo com Evans (1999) o parênquima paliçádico, que recebe a luz próximo da superfície, facilita a penetração da luz a uma maior profundidade na estrutura interna da folha, enquanto o parênquima esponjoso promove a dispersão para aumentar a absorção da luz, reduzindo assim o gradiente de luz absorvida por unidade de clorofila. O parênquima esponjoso apresenta estrutura organizacional que possibilita o espalhamento da radiação luminosa e facilita a difusão lateral do CO₂ a partir das câmaras subestomáticas (TERASHIMA et al., 2011). Em *P. hispidinervum* e *P. aduncum*, o aumento da espessura do parênquima esponjoso na aclimatização (transferência *ex vitro*) indica adaptação estrutural no intuito de aumentar o espalhamento da maior luminosidade incidente, bem como, aumenta a difusão lateral do gás carbônico para as maiores atividades fotossintéticas experimentadas.

O mesofilo de folhas formadas *in vitro* de menor espessura e pouco diferenciado torna as plantas altamente susceptíveis ao estresse durante a aclimatização (HAZARIKA, 2006). Entretanto, o menor desenvolvimento do mesofilo em condições *in vitro* de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* não comprometem o sucesso da aclimatização, conforme os resultados obtidos por Loureiro da Silva et al. (2012) com 100% de plantas aclimatizadas.

O ambiente de cultivo *in vitro* apresenta características distintas, tais como: elevada umidade do ar, menor luminosidade, baixa pressão de gás carbônico (HAZARIKA, 2006). Nesse sentido, as variações estruturais foliares observadas para ambas as espécies nos diferentes ambientes de cultivo refletem a plasticidade e fundamentam o sucesso da micropropagação.

Nesse sentido, conclui-se que a espessura da epiderme e hipoderme de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* sofrem alterações na transição de cultivo *in vitro* para o *ex vitro*. Os tecidos do mesofilo e a abertura do poro estomático de ambas as espécies são influenciadas pelo ambiente *in vitro*. Diferentes ambientes de cultivo induzem a plasticidade das estruturas celulares da lâmina foliar de *P. hispidinervum* e *P. aduncum*.

Referências

- ABBADE, L. C.; PAIVA, P. D. DE O.; PAIVA, R.; CASTRO, E. M. DE C.; CENTOFANTE, A. R.; OLIVEIRA, C. Anatomia foliar de ipê-branco (*Tabebuia roseo Alba* (Ridl.) Sand.) – Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Scientiarum-Biological Sciences**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 307-311, 2009.
- ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S. F. L.; VIANA, V. R. C.; NEVES, L. J. Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 4, n. 1, p. 35-46, 2001.
- ALBIERO, A. L. M.; PAOLI, A. A. S.; SOUZA, L. A.; MOURAO, K. S. M. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 3, p. 379-391, 2006.
- ALBIERO, A. L. M.; SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M.; ALMEIDA, O. J. G.; LOPES, W. A. L. Morfo-anatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 24, p. 550-554, 2005.
- ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOEGER, M. R. T.; COSTA, C. G.; BARROS, C. F. Epiderme. In: APEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed). **Anatomia Vegetal**. Viçosa: UFV, 2003. p. 87-107.
- BARBOSA, S. B. S. C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; PORTES, T. A.; SOUZA, L. A. C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 185-194, 2006.
- BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 160, p. 268-282, 1937.
- BERGO, C. L.; MENDONÇA, H.A.; SILVA, M.R. Efeito da época e frequência de corte de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC.) no rendimento de óleo essencial. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 35, n. 2, p. 111-117, 2005.
- BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; RAFAEL, G. C.; FAVERO, A. C.; VALENTE, T. C. T. Alterações morfológicas de plantas de abacaxizeiro influenciadas por diferentes substratos durante o processo de aclimatização. **Revista Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 863-868, 2011.
- CALVETE, E. O.; AZEVEDO, M.; BORDGNON, M. H.; SUZIN, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 20, n. 4, p. 649-653, 2002.
- COSTA, F. H. S.; CASTRO, E. M.; PASQUAL, M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OLIVEIRA, C. Alterações anatômicas de bananeiras micropropagadas em resposta a aclimatização *ex vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 2, p. 386-392, 2009.
- DECCETTI, S. F. C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glaba* L.** 2004. 192 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- DICKISON, W.C. **Integrative plant anatomy**. San Diego: Harcourt Academic Press, USA, 2000. 548 p.
- DORRIS, M. What is plant tissue culture? **Journal of Bromeliad Society**, Florida, v. 60, n. 4, p. 172-178, 2010.
- EVANS J. R. Leaf anatomy enables more equal access to light and CO₂ between chloroplasts. **New Phytologist**, Lancaster, v. 143, p. 93-104, 1999.
- EVANS, J. R.; POORTER, H. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. **Plant, Cell & Environment**, Logan, v. 24, p. 755-767, 2001.
- FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.
- FERREIRA, D. F. **Programa Sisvar.exe: sistema de análise de variância**. Versão 3.04. 2003.
- FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Características anatômicas de folhas de Teca (*Tectona grandis* L.) desenvolvidas sob condições de cultivo *in vitro* e *ex vitro*. **Evidência**, Joaçaba, v. 9, n. 1-2, p. 17-28, 2009.
- FIDELIS, I.; CASTRO, E. M. C.; PINTO, J. E. B. P.; GAVILANES, M. L.; SANTIAGO, E. J. A. Características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* Trec. desenvolvidas *in vitro* e *ex vitro*. **Revista Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 327-336, 2000.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: in practice**. 2. ed. Edington: Springer, 1996. 1361 p.
- GRATANI, L. Plant phenotypic plasticity in response to environmental factors. **Advances in Botany**, New York, v. 2014, p. 1-17, 2014.
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 105-120. 2006.
- IACONO, F.; MARTINELLI, L. CO₂ assimilation and transpiration balance in species of genus *Vitis* cultivated *in vivo* and *in vitro*: estimation of stomatal and cuticular transpiration *in vitro*. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Rome, v. 32, n. 2, p. 91-97, 1998.
- JAVELLE, M.; VERNOUD, V.; ROGOWSKY, P. M.; INGRAM, G. C. Epidemis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. **New Phytologist**, Lancaster, v. 189, n. 1, p. 17-39, 2011.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book Company, 1940. 523 p.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2 ed. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2012. 431 p.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Editora Universidade Rural, 1997. 194 p.
- LAMHANEDI, M.; CHAMBERLAND, H.; TREMBLAY, F. M. Epidermal transpiration, ultrastructural characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic seedlings in response to *in vitro* acclimatization. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 118, n. 4, p. 554-561, 2003.
- LIMA, E.C. **Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de sangra d'água (*Croton urucurana* BAILL.)**. 2004. 98 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- LOUREIRO DASILVA, T. L.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. A rapid *in vitro* protocol for propagation of *Piper*

- aduncum* and *Piper hispidinervum*, two species from Amazon region with multipurpose uses. **African Journal of Biotechnology**, Abraka, v. 11, n. 89, p. 15539-15546, 2012.
- MADISON, M. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. **Selbyana**, Sarasota, v. 2, n. 1, p.1-13, 1977.
- MARTINOTTO, C. **Cultivo *in vitro* e aspectos morfológicos de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* D.C.)**. 2004. 102 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NASCIMENTO, M.E.; VILHENA-POTIGUARA, R.C. Aspectos anatômicos dos órgãos vegetativos de *Piper hispidinervum* C.DC (Piperaceae) e suas estruturas secretoras. **Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi: Série Botânica**, Belém, v. 15, n. 1, p. 39-104, 1999.
- PEREIRA, R. C. A. **Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento dos biomarcadores de *Uncaria tomentosa* Willdenow Ex Roemer & Schultes De *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (Unha de Gato)**. 2004. 203 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2004.
- PESSINI, G. L.; ALBIERO, A. L. M.; MOURAO, K. S. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. Análise farmacognóstica de *Piper regnellii* (Miq.) C. D. C. var. *pallescens* (C. D. C.) Yunck: aspectos botânicos e enfoque físico-químico preliminar. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 22, n. 3, p. 209-216, 2003.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZAKOVA, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 42, n. 4, p. 481-497, 1999.
- RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande – MG. **Revista Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.
- RODRÍGUEZ-CALCERRADA, J.; REICH, P. B.; ROSENQVIST, E.; PARDOS, J. A.; CANO, F. J.; ARANDA, I. Leaf physiological versus morphological acclimation to high-light exposure at different stages of foliar development in oak. **Tree Physiology**, Duhram, v. 28, p. 761-771, 2008.
- ROSAL, L. F. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* (D.C.) Mac Leish)**. 2004. 96 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2004.
- SANTANA, J. R. F.; OLIVEIRA, L. M.; PAIVA, R.; RESENDE, R. K. S.; CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. D. Anatomia foliar de seis espécies de anonáceas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2362-2365, 2008.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, London, v. 52, n. 3-4, p. 591-611, 1965.
- SOUSA, P. J. C.; BARROS, C. A. L.; ROCHA, J. C. S.; LIRA, D. S.; MONTEIRO, G. M.; MAIA, J. G. S. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 217-221, 2008.
- SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S.; OLIVEIRA, J. H. G. Comparative morphology and anatomy of the leaf and stem of *Peperomia dahlstedtii*, *Ottonia martiana* and *Piper diospyrifolium* (Piperaceae). **Gayana Botânica**, Concepción, v. 61, n. 1, p. 6-17, 2004.
- TERASHIMA, I.; HANBA, Y. T.; THOLEN, D.; NIINEMETS, U. Leaf functional anatomy in relation to photosynthesis. **Plant Physiology**, Maryland, v. 155, n. 1, p. 108-116, 2011.
- TOMÁS, M.; FLEXAS, J.; COPOLOVICI, L.; GALMÉS, J.; HALLIK, L.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBÓ, M.; TOSENS, T.; VISLAP, V.; NIINEMETS, U. Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO₂ across species: quantitative limitations and scaling up by models. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 8, p. 2269-2281, 2013.
- VIANNA, W. O.; AKISUE, G. Caracterização morfológica de *Piper aduncum* L. **Lecta**, Bragança Paulista, v. 15, n. 1-2, p. 11-62, 1997.
- YUNCKER, T. G. **The Piperaceae of Brazil**. 2. ed. São Paulo: Hoehnea, 1972. 366 p.