

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
SACAROSE INFLUENCIAM NA
MORFOANATOMIA E FISIOLOGIA DE
Alternanthera tenella Colla.
(AMARANTHACEAE) EM CONDIÇÕES *IN VITRO*

LÍVIA BATISTA DAS NEVES

São Mateus/ES
Janeiro/2025

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

**DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
SACAROSE INFLUENCIAM NA
MORFOANATOMIA E FISIOLOGIA DE
Alternanthera tenella Colla.
(AMARANTHACEAE) NO CULTIVO *IN VITRO***

LÍVIA BATISTA DAS NEVES

Monografia de conclusão de curso apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.

Orientador: Msc. Marcel Merlo Mendes

**São Mateus/ES
Janeiro/2025**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: **Lívia Batista das Neves**

Título: **DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE INFLUENCIAM NA MORFOANATOMIA E FISIOLOGIA DE *Alternanthera tenella* Colla. (AMARANTHACEAE) NO CULTIVO *IN VITRO***

Monografia do Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado)
Defendida e aprovada em 29/01/2025

Documento assinado digitalmente



MARCEL MERLO MENDES
Data: 05/02/2025 13:44:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador(a) e presidente da Comissão Examinadora

Examinador 1

Documento assinado digitalmente



ANDREIA BARCELOS PASSOS LIMA GONTIJO
Data: 05/02/2025 11:40:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador 2

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter guiado meus caminhos.

Aos meus pais, pelo esforço, carinho, atenção e pelo apoio por ter conseguido chegar até aqui.

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em especial ao Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES), pela oportunidade de realização do curso de Ciências Biológicas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Msc. Marcel Merlo Mendes pela atenção e confiança no desenvolvimento da Tese de Conclusão de curso.

Ao meu coorientador Dr. Antelmo Ralph Falqueto pela atenção e colaboração significativa no desenvolvimento da tese.

A minha querida Prof. Dr. Andréia Barcelos Passos Lima Gontijo, pela disponibilidade do laboratório e pela amizade, companheirismo pelos conselhos, atenção e contribuições no projeto.

Aos meus sempre valorosos amigos Aparício da Cruz, Ana Caroline Pariz, Julia Miranda, Marcel Mendes, Livia Machado, Victor Alyson Côrrea, Isadora, Guilherme Smassaro, e Izabella Roque pela companhia, conselhos, risadas, e toda dedicação para eu ter chegado até aqui.

RESUMO

As plantas cultivadas em condições *in vitro* apresentam condições de crescimento restritivos nas quais as trocas de CO₂ é reduzida. A sacarose substitui o carbono que as plantas normalmente fixariam da atmosfera. O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas morfofisiológicas e anatômicas de *A. tenella* em função das concentrações de sacarose durante o cultivo *in vitro* a fim de otimizar seu estabelecimento e desenvolvimento adequado nesta condição. Plantas previamente estabelecidas em condições de cultivo *in vitro* foram transferidas para meio de cultivo com 0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹ de sacarose e solidificados com 7 g L⁻¹ ágar. Após 30 dias foram realizadas análises morfoanatômicas e fisiológicas. Plantas cultivadas com 40 g L⁻¹ de sacarose apresentaram epiderme abaxial e adaxial mais grossa, aumento em V_J e V_I e diminuição em PI_{abs}. A sacarose inferior e superior 20 g L⁻¹ induziu danos ao complexo de evolução do oxigênio (OEC), baixa eficiência no transporte de elétrons entre quinona A (Q_A) e quinona B (Q_B) e alterou o rendimento quântico da dissipação de energia (φD₀). As plantas cultivadas em 20 g L⁻¹ tiveram um aumento da atividade fotoquímica do FSII e do transporte de elétrons, tiveram mais centros de reações ativos por seção transversal e um aumento no número de elementos vasculares. As respostas morfoanatômicas e fisiológicas indicaram que a sacarose pode ter um melhor efeito na dosagem de 20 g L⁻¹ em plantas de *A. tenella* durante o cultivo *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: Fluorescência de clorofila *a* · Fisiologia vegetal · Cultura de tecidos vegetais · Anatomia vegetal

ABSTRACT

Plants cultivated under *in vitro* conditions experience restrictive growth environments in which CO₂ exchange is reduced. Sucrose replaces the carbon that plants would normally fix from the atmosphere. The aim of this study was to evaluate the morphophysiological and anatomical responses of *A. tenella* as a function of sucrose concentrations during *in vitro* cultivation to optimize its establishment and proper development under these conditions. Plants previously established in *in vitro* cultivation conditions were transferred to culture media containing 0, 5, 10, 20, and 40 g L⁻¹ of sucrose and solidified with 7 g L⁻¹ agar. After 30 days, morpho-anatomical and physiological analyses were performed. Plants cultivated with 40 g L⁻¹ of sucrose showed a thicker abaxial and adaxial epidermis, an increase in V_J and V_I, and a decrease in PI_{abs}. Sucrose concentrations below and above 20 g L⁻¹ induced damage to the oxygen-evolving complex (OEC), reduced efficiency in electron transport between quinone A (Q_A) and quinone B (Q_B), and altered the quantum yield of energy dissipation (φD₀). Plants cultivated with 20 g L⁻¹ of sucrose exhibited an increase in FSII photochemical activity and electron transport, had more active reaction centers per cross-section, and showed an increase in the number of vascular elements. The morpho-anatomical and physiological responses indicated that sucrose may have the best effect at a concentration of 20 g L⁻¹ in *A. tenella* plants during *in vitro* cultivation.

KEYWORDS

Chlorophyll *a* fluorescence - Plant physiology - Plant tissue culture - Plant anatomy

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 Condições de cultivo <i>in vitro</i>	12
2.2 Análise de crescimento	13
2.3 Análise anatômica.....	13
2.4 Análise da fluorescência da clorofila <i>a</i>	14
2.5 Análise dos pigmentos fotossintéticos	15
2.6 Análise estatística.....	15
3. RESULTADOS	15
3.1 Análise de crescimento	15
3.2 Anatomia de caule e folha	16
3.3 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	21
3.4 Conteúdo dos pigmentos fotossintéticos.....	22
4. DISCUSSÃO.....	26
5. CONCLUSÃO.....	30
6. REFERÊNCIAS.....	31

SUMÁRIO DE FIGURAS

- Figura 1** Abreviações dos parâmetros, fórmulas e descrição dos dados derivados da fluorescência transiente da clorofila *a* 4
- Figura 2** Peso fresco da parte aérea e raiz (a), peso seco da parte aérea e raiz (b) das plantas de *A. tenella*, em função das concentrações de sacarose (0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹), por 30 dias durante o cultivo *in vitro*. Médias ± EP (n = 5) seguidas da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). 6
- Figura 3** Secções transversais (a-j) e paradérmicas (k-o) das plantas *A. tenella* aos 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 L⁻¹ de sacarose, durante o cultivo *in vitro*. Secções transversais da folha e caule corados com soluções de safrablau. Secções paradérmicas da folha coradas com soluções de safranina. Ep= epiderme, co=colênquima, pi=medula, tr=tricoma, vb=feixe vascular, ve=elemento de vaso, st=estômato. Barras = 100 µm 8
- Figura 4** Espessura da epiderme do caule e número de feixes vasculares (f) e diâmetro do caule, da medula e dos vasos de xilema (g) de plantas de *A. tenella* aos 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 L⁻¹ de sacarose durante o cultivo *in vitro*. (f-g) Médias (±EP), n = 6, seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05) 9
- Figura 5** Espessura da epiderme abaxial e adaxial *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae). Folhas aos 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹ de sacarose, durante cultivo *in vitro*. Médias (± EP) seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (p<0,05) 10
- Figura 6** Número de vasos do xilema e diâmetro dos vasos de xilema de *A. tenella*. Folhas aos 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹ de sacarose, durante cultivo *in vitro*. Médias (± EP) seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (p<0,05) 11
- Figura 7** Funcionalidade estomática de plantas de *A. tenella* aos 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 L⁻¹ de sacarose durante o cultivo *in vitro*. Médias (±EP), n = 6, seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05) 12
- Figura 8** Transientes de fluorescência da clorofila *a* (a), diferenças cinéticas entre as etapas O e K, mostrando a banda L (b) e diferenças cinéticas entre as etapas O e J, mostrando a banda K (c) de plantas de *A. tenella* após 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5,

10, 20 e 40 L⁻¹ de sacarose durante o cultivo *in vitro*. Todas as diferenças cinéticas foram normalizadas em função do tratamento controle (0 g L⁻¹ de sacarose) **14**

Figura 9 Parâmetros do teste JIP das plantas de *A. tenella* cultivadas em um meio com diferentes concentrações de sacarose (0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹), aos 30 dias de crescimento. Para cada parâmetro, as médias indicadas com um asterisco (*) diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). Todos os parâmetros do teste JIP foram normalizados em relação aos dados de controle (0 g L⁻¹ de sacarose) **16**

Figura 10 Teor de clorofila *a* (a), clorofila *b* (b) e carotenoides (c) das plantas de *A. tenella* cultivadas em um meio com diferentes concentrações de sacarose (0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹), aos 30 dias de crescimento *in vitro* **17**

1. INTRODUÇÃO

A micropropagação é amplamente empregada como o método para propagar espécies vegetais em grande escala (Bezerra et al. 2019). Muitas espécies já foram estabelecidas *in vitro*, uma dessas é a *Alternanthera tenella* Colla. uma planta herbácea, comumente conhecida como “perpétua do mato” (Guerra et al. 2003) ou “apaga-fogo” (Ferreira et al. 2003). Essa espécie é frequentemente encontrada em todo o Brasil, sobretudo em áreas degradadas (Moreira; Bragança, 2011). A espécie tem ampla ocorrência em garimpo no município de Vazante, Minas Gerais, Brasil, indicando seu potencial para tolerar e acumular metais pesados do solo (Moreira e Bragança, 2011).

Os métodos convencionais de propagação *in vitro* demandam o uso de ambientes restritos no qual a troca de CO₂ é reduzida (Eckstein et al. 2011). No entanto, essa condição *in vitro* pode levar a uma redução da atividade fotossintética das plantas, identificada como um dos principais fatores limitantes da eficiência da micropropagação (Ševčíková et al. 2019).

A utilização de açúcares como fonte de carbono em culturas *in vitro* tem o propósito de substituir o carbono normalmente fixado pelas plantas da atmosfera, por meio da fotossíntese *ex vitro*, processo crucial para o crescimento e desenvolvimento (Martins et al. 2019). Garantir o desenvolvimento das plantas *in vitro* requer a disponibilidade adequada de fontes de carbono no meio de cultivo, uma vez que tanto o crescimento quanto o desenvolvimento são processos que exigem considerável energia. No entanto, a concentração de carboidratos varia de maneira específica conforme a espécie, tornando necessário estabelecer protocolos distintos (Yaseen et al. 2013).

Martins et al. (2019) observaram que, no cultivo *in vitro* da bromélia *Billbergia zebrina* (Herb.) Lindl., o fornecimento de carboidrato exógeno foi crucial para o desempenho fotossintético das plantas. A sacarose é a principal fonte externa de carboidratos utilizada no cultivo *in vitro*, no entanto, os seus efeitos sobre o desenvolvimento e crescimento das plantas são altamente variados (Yaseen et al. 2013; Lembrechts et al. 2017). Em concentrações moderadas, a sacarose exógena pode resultar na diminuição da fotossíntese durante o cultivo *in vitro* (Alfonso et al. 2017).

Alguns estudos indicaram que a presença de carboidratos exógenos pode otimizar a fotossíntese em plantas cultivadas *in vitro* (Eckstein et al. 2011; Sáez et al. 2016). A presença de sacarose está diretamente relacionada à densidade estomática, ao teor de clorofila e ao

comportamento morfogênético em tecidos vegetais específicos, como os tecidos vasculares e de suporte (Mohamed e Alsadon, 2010).

Estudos também mediram a fluorescência da clorofila *a* para determinar o desempenho do aparelho fotossintético de plantas cultivadas *in vitro* (Dobrąnszki e Drienyovszki, 2014; Matysiak e Gabryszewska, 2016; Rosa et al. 2017). Essa técnica permite uma avaliação rápida e precisa do nível de estresse nas plantas, destacando o desempenho do aparato fotossintético, especialmente no fotossistema II (FSII) (Kalaji et al. 2016). Além disso, descrevem as fases cinéticas das curvas de emissão de fluorescência fotossintética transiente ou multifásica (OJIP) e o teste JIP utilizando fluorescência não modulada (Cabrita et al. 2016).

Do mesmo modo, os pigmentos fotossintéticos estão diretamente relacionados ao funcionamento do aparato fotossintético, sendo que sua alteração pode impactar a capacidade fotossintética (Kholová et al. 2011). Ademais, a avaliação de modificações anatômicas de plantas micropropagadas emerge como uma ferramenta para examinar de que maneira as condições *in vitro* podem influenciar o êxito das fases da micropropagação (Martins et al. 2015).

Ainda não está claro como os carboidratos empregados no meio de cultivo podem influenciar a anatomia e desempenho do aparelho fotossintético, particularmente o FSII de plantas de *A. tenella* propagadas *in vitro*. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as respostas morfofisiológicas e anatômicas de *Alternanthera tenella* Colla. em função das concentrações de sacarose durante o cultivo *in vitro* a fim de otimizar o seu estabelecimento e desenvolvimento adequados nesta condição.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Condições de cultivo *in vitro*

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LabCTP) na Universidade Federal do Espírito Santo – Centro Universitário Norte do Espírito Santo (UFES- CEUNES).

Os segmentos nodais obtidos após a etapa de subcultura (cerca de 2 cm de comprimento) foram individualizados com bisturi e transferidos para frascos de vidro de 268 mL contendo 50 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar, suplementado com sacarose em cinco concentrações 0, 5, 10, 20, 40 g L⁻¹. O tratamento sem adição de sacarose (0 g L⁻¹) foi considerado controle. Cinco brotos com dois segmentos nodais foram colocados em cada frasco. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C por 20 minutos.

Em seguida, os explantes foram inoculados em câmara de fluxo laminar e o material foi mantido em sala de crescimento por 30 dias a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, sob lâmpadas (Kian LED 36W tensão 100-240V) emitindo $90\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ de PAR.

2.2 Análise de crescimento

As características de crescimento foram inferidas pela massa fresca e seca de 25 plantas de cada tratamento aos 30 dias de cultivo. As amostras foram divididas em cinco parcelas (cinco repetições) por tratamento. A massa fresca e seca (g planta⁻¹) foi quantificada para parte aérea e raízes separadamente.

2.3 Análise anatômica

As análises anatômicas de *A. tenella* foram determinadas em seis plantas de cada tratamento. As amostras foram coletadas aleatoriamente e fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético e etanol 50%, 0,5:/0,5:/9, v/v, respectivamente) por 72 horas, seguido por armazenamento em etanol a 70% (Johansen, 1940).

A caracterização anatômica foi realizada através de cortes transversais de caules (segundo entrenó a partir da base) e folhas (parte média da lâmina foliar da primeira folha completamente expandida a partir do ápice). A densidade estomática foi medida na face abaxial da segunda folha totalmente expandida. As secções transversais foram clarificadas com hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) e depois corado com solução de safrablau. Os cortes paradérmicos foram clarificados com hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) e corado com safranina 1%, onde foram montados em lâminas com glicerina 50% (Kraus e Arduin 1997).

As seções foram visualizadas e as imagens capturadas com um microscópio de luz acoplado a um Câmera digital Leica ICC50 HD (Wetzlar, Alemanha). Fotomicrografias das seções paradérmicas foram tiradas de seis folhas diferentes da região mediana foliar, com três cortes. Enquanto, para os cortes transversais, dois cortes por lâmina foram fotografados e analisados em seis amostras diferentes.

Para o caule foram medidos o diâmetro total e o diâmetro da medula (μm^2), o número de feixes vasculares, o diâmetro do xilema e a espessura da epiderme. Para as folhas foram determinadas a espessura da epiderme adaxial e abaxial (μm), bem o número de elementos de vaso como o diâmetro do xilema. Em relação aos cortes paradérmicos, foram realizadas a quantificação das células epidérmicas e o número de estômatos, além do diâmetro polar e

equatorial. Sendo calculado: FUN = funcionalidade estomática (considerada como a relação diâmetro polar/diâmetro equatorial dos estômatos) segundo Castro et al. (2009).

O software UTHSCSA ImageTool® foi utilizado para mensurar as características reveladas pelas fotomicrografias.

2.4 Análise da fluorescência da clorofila *a*

Os transientes de fluorescência da clorofila *a* foram medidos em quinze plantas de cada tratamento ao final do experimento (30 dias de cultivo *in vitro*). As medições foram realizadas entre 7 e 9 horas, usando um fluorômetro portátil Handy PEA (Hansatech, King's Lynn, Norfolk, Reino Unido) em folhas (terceira folha completamente expandida a partir do ápice) previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos usando um clipe foliar (Hansatÿ ech®). A partir da fluorescência transiente OJIP foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP com auxílio do software BioLyzer (Laboratório de Bioenergética, Universidade de Genebra, Suíça). Os transientes e os parâmetros do teste JIP (Figura 1) foram analisados de acordo com Strasser et al. (2004) e Wang et al. (2016).

Para revisão, ver Strasser et al. (2004) e Wang et al. (2016).

Parâmetros de fluorescência	Descrição
Parâmetros de fluorescência calculados	
$V_J = (F_{2ms} - F_0) / (F_M - F_0)$	Fuorescência variável relativa a 2 ms (etapa J).
$V_I = (F_{30ms} - F_0) / (F_M - F_0)$	Fuorescência variável relativa a 30 ms (etapa I).
$RC/CSM = CSM/ABS = \phi P_0 \times (V_J/M_0) \times ABS/CSM$	Densidade do centro de reação ativo por corte transversal.
Rendimentos e probabilidades quânticas	
$\phi P_0 = TR_0/ABS = [1 - (F_0/F_M)] = F_V/F_M$	Rendimento quântico máximo da fotoquímica primária em (t=0).
$\phi E_0 = ET_0/ABS = [1 - (F_0/F_M)] \times \psi E_0 = \phi P_0 \times \psi E_0$	Rendimento quântico do transporte de elétrons (a t=0).
$\phi D_0 = 1 - \phi P_0 = (F_0/F_M)$	Rendimento quântico de dissipação de energia (a t=0).
Índice de desempenho	
$PI(ABS) = RC/ABS \times [\phi P_0 / (1 - \phi P_0)] \times [\psi E_0 / (1 - \psi E_0)]$	O índice de desempenho com base na absorção.

Figura 1: Abreviações dos parâmetros, fórmulas e descrição dos dados derivados da fluorescência transiente da clorofila *a*

2.5 Análise dos pigmentos fotossintéticos

Os procedimentos de preparação e extração do pigmento seguiram Martins et al. (2019). As leituras foram realizadas em $\lambda=470, 645$ e 663 nanômetros (nm) para carotenoides (Car),

clorofila *b* (Chl *b*) e clorofila *a* (Chl *a*), respectivamente. A absorvância foi medida usando um GENESYS™ 10S UV-Vis espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, West Palm Beach, FL, EUA). O conteúdo de pigmentos fotossintéticos, expresso em $\mu\text{g g}^{-1}$ FW (peso fresco) de tecido foliar, foi baseado em Arnon (1949).

Para quantificar os pigmentos fotossintéticos, 0,03 g de material vegetal foi retirado na terceira folha completamente expandida a partir do ápice de 15 amostras/tratamento. O material vegetal foi colocado em tubos de ensaio contendo 5 ml de acetona 80% e mantidos no escuro a 4 °C por 72 horas, antes da análise espectrofotométrica.

2.6 Análise estatística

Os dados gerados a partir de cada parâmetro foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos do *post-hoc* do Teste Tukey a 5% de probabilidade. Os testes estatísticos foram realizados no programa estatístico R-Studio e os gráficos e tabelas foram realizados no programa *Microsoft Excel* (2019).

3. RESULTADOS

3.1 Análise de crescimento

Após os 30 dias de cultivo foi observado que a concentração de 40 g L⁻¹ de sacarose acelerou a senescência das plantas de *A. tenella*, enquanto a redução para 0, 5 e 10 g L⁻¹ diminuiu o crescimento *in vitro*. Plantas cultivadas com 20 g L⁻¹ de sacarose foram observadas um aumento na biomassa.

O peso fresco e seco das raízes e da parte aérea apresentaram maiores valores quando as plantas foram cultivadas com 20 e 40 g L⁻¹ de sacarose. Quantidades inferiores a estas propiciaram redução no crescimento (Figura 2).

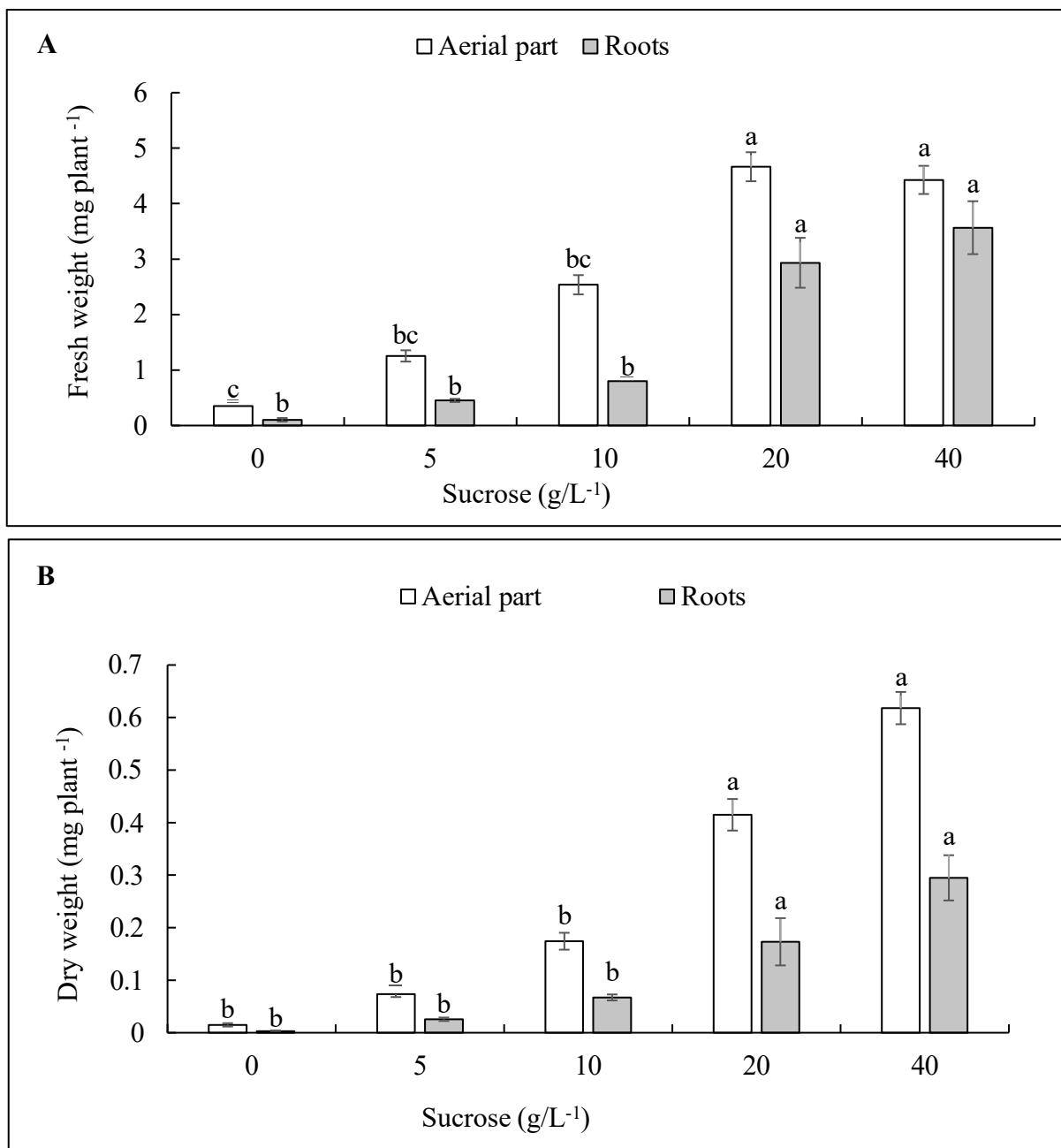


Figura 2 Peso fresco da parte aérea e raiz (a) e peso seco da parte aérea e raiz (b) das plantas de *A. tenella* em função das concentrações de sacarose (0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹), após 30 dias durante o cultivo *in vitro*. Médias ± EP (n = 5) seguidas da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p<0,05)

3.2 Anatomia de caule e folha

Nas condições *in vitro*, as seções transversais do caule das plantas de *A. tenella*, em crescimento primário apresentaram formato circular na transecção. As secções do caule apresentaram uma camada epidérmica seriada com tricomas multicelulares. No cilindro vascular

os feixes vasculares estavam colados lateralmente, geralmente dispostos em feixes maiores alternando com feixes menores (Figura 3a-e).

Nas plantas de *A. tenella* a epiderme é simples, sendo a da face adaxial mais espessa que a da abaxial. Suas folhas são anfiestomáticas, estando os estômatos, nas duas faces, dispostos no mesmo nível das demais células da epiderme. Tanto na face adaxial como na abaxial os estômatos são diacíticos. Tricomas glandulares multicelulares não-ramificados são observados em ambas as faces das folhas (Figura 3f-o)

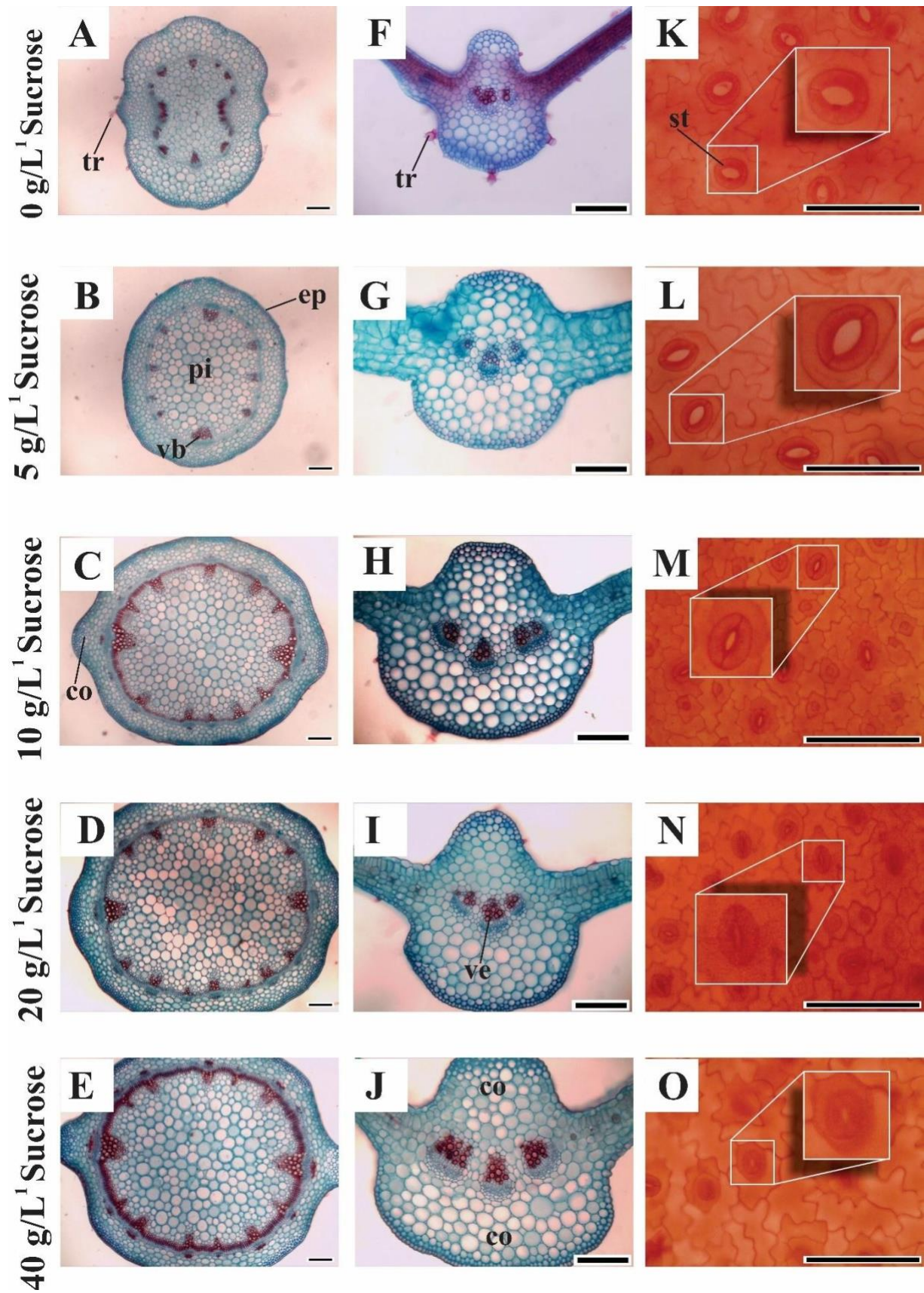


Figura 3 Seções transversais (a-j) e paradérmicas (k-o) das plantas *A. tenella* aos 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 L⁻¹ de sacarose, durante o cultivo *in vitro*. Seções transversais da folha e caule corados com soluções de safrablau. Seções paradérmicas da folha coradas com soluções

de safranina. Ep= epiderme, co=colênquima, pi=medula, tr=tricoma, vb=feixe vascular, ve=elemento de vaso, st=estômato. Barras = 100 μm

Quando as plantas foram cultivadas com 0, 5 e 10 g L^{-1} de sacarose, o diâmetro do caule e da medula diminuíram. Enquanto, nas dosagens de 20 e 40 g L^{-1} de sacarose, tiveram um maior número de feixes vasculares e um investimento em células da medula (Figura 4a). Além disso, a espessura da epiderme aumentou no tratamento de 40 g L^{-1} , enquanto nos tratamentos 0, 5 e 10 g L^{-1} , teve uma diminuição, porém na dosagem de 20 g L^{-1} , teve diferença entre os demais tratamentos. O diâmetro dos vasos de xilema foi superior nas dosagens de 20 e 40 g L^{-1} (Figura 4b).

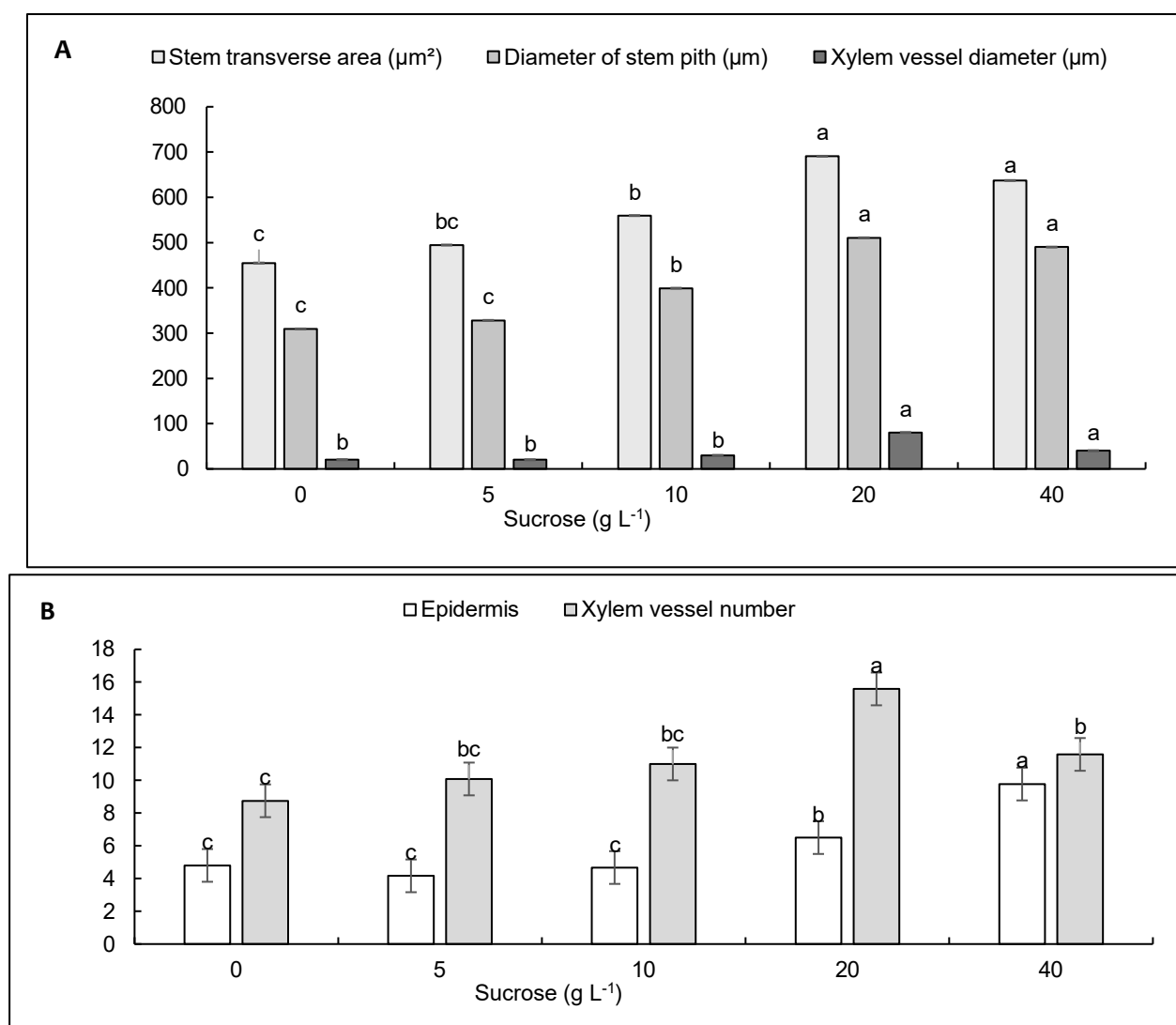


Figura 4 Espessura da epiderme do caule e número de feixes vasculares (f) e diâmetro do caule, da medula e dos vasos de xilema (g) de plantas de *A. tenella* aos 30 dias de crescimento em meio contendo

0, 5, 10, 20 e 40 L⁻¹ de sacarose durante o cultivo *in vitro*. (f-g) Médias (\pm EP), n = 6, seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

As características anatômicas das folhas de *A. tenella* mostram diferenças significativas entre os tratamentos. Uma maior espessura foi observada tanto para a epiderme adaxial (epiderme superior), quanto epiderme abaxial (epiderme inferior), em plantas cultivadas em 40 g L⁻¹ de sacarose. Enquanto, as plantas cultivadas em 0, 5 e 10 g L⁻¹, diferiram das de 20 g L⁻¹, para a epiderme adaxial (Figura 5).

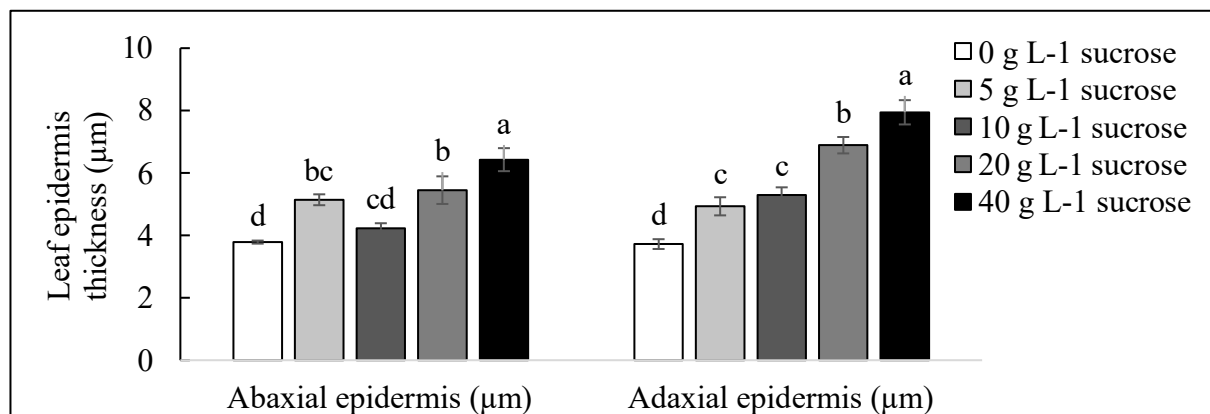


Figura 5 Espessura da epiderme abaxial e adaxial *A. tenella*. Folhas aos 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹ de sacarose, durante cultivo *in vitro*. Médias (\pm EP) seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

O número de feixes vasculares e o diâmetro do xilema foi significativamente maior quando as plantas foram cultivadas em 20 g L⁻¹ (Figura 6). Uma maior funcionalidade dos estômatos foi observada no tratamento de 20 g L⁻¹ (Figura 7).

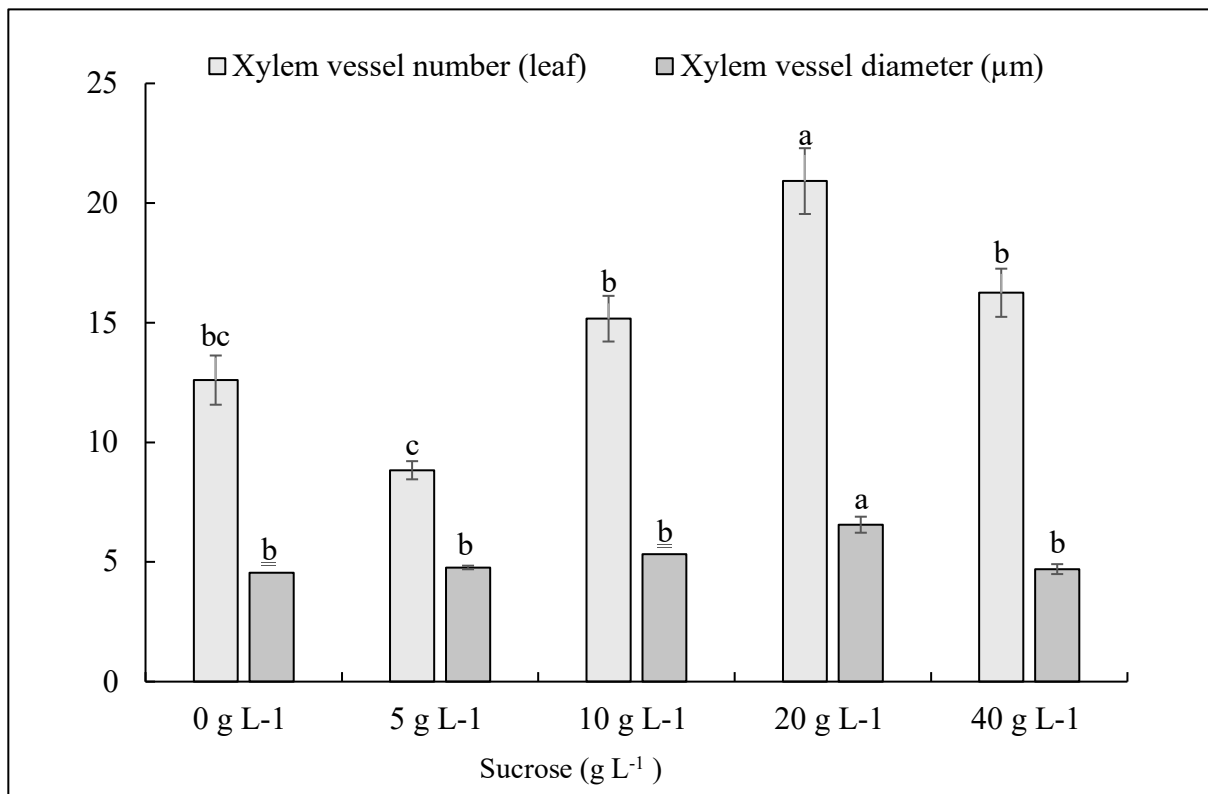


Figura 6 Número de vasos do xilema e diâmetro dos vasos de xilema de *A. tenella*. Folhas aos 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹ de sacarose, durante cultivo *in vitro*. Médias (\pm EP) seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

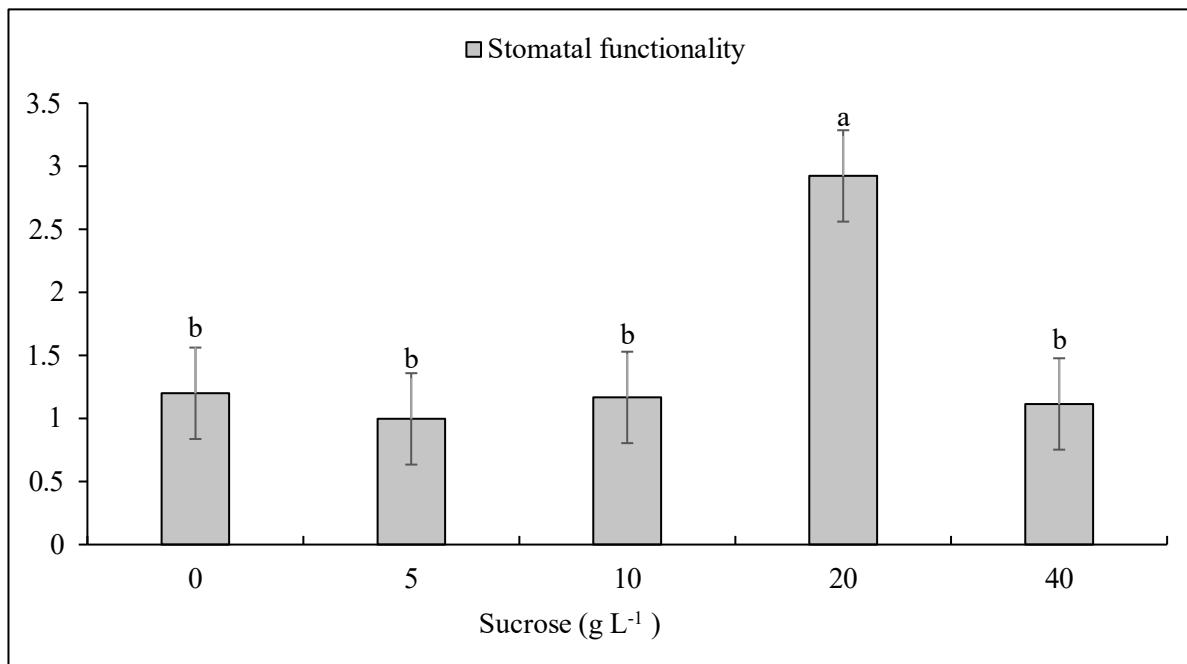
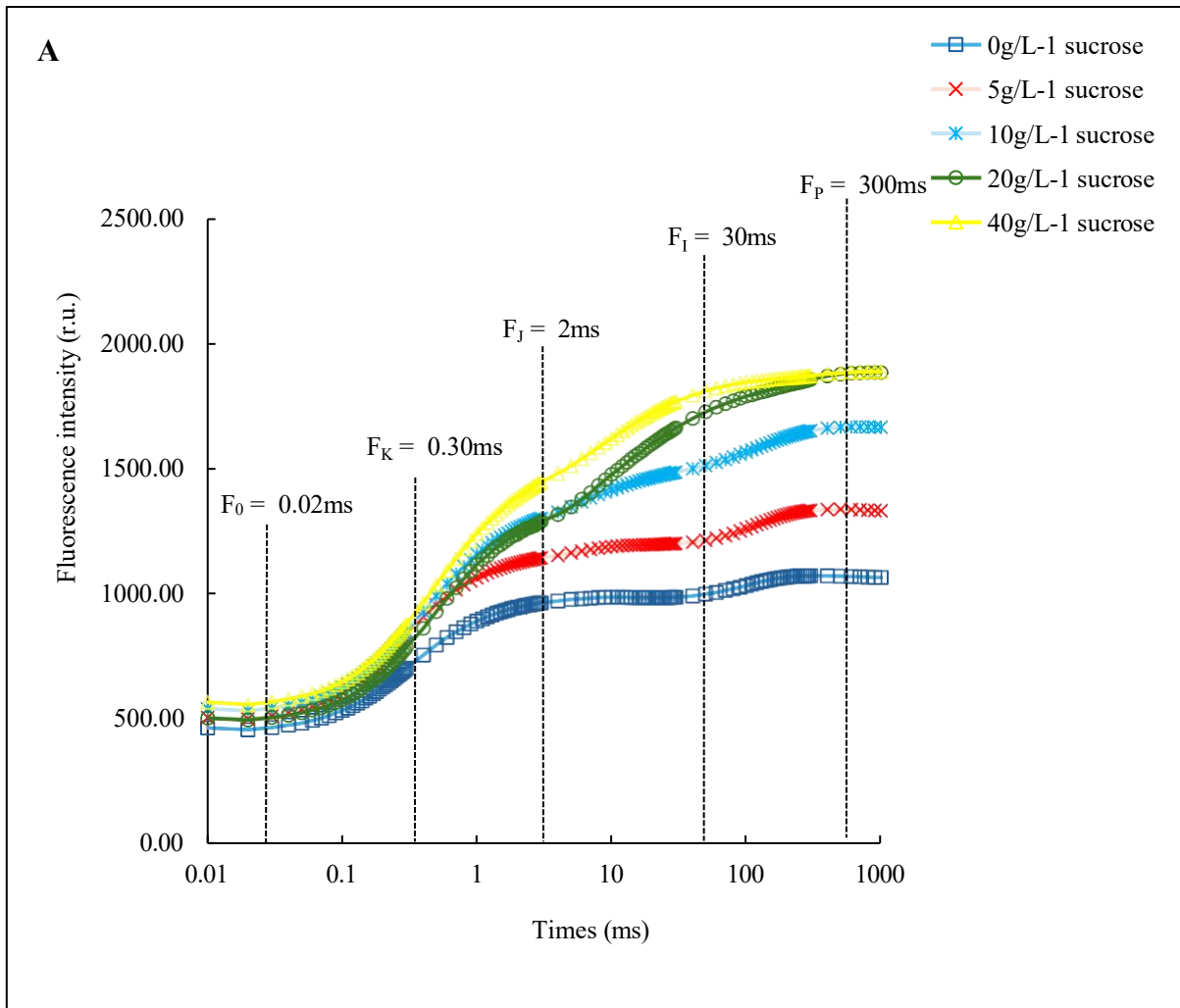


Figura 7 Funcionalidade estomática de plantas de *A. tenella* aos 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 L⁻¹ de sacarose durante o cultivo *in vitro*. Médias (±EP), n = 6, seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

3.3 Fluorescência da clorofila *a*

Após os 30 dias de cultivo *in vitro* todas as plantas de *A. tenella* permaneceram fotossinteticamente ativas e apresentaram curvas com aumento polifásico típico do OJIP. Porém, as condições *in vitro* tiveram um impacto no seu aparato fotossintético. Não houve alterações nos valores de F_0 em todos os tratamentos. Por outro lado, quando as plantas foram cultivadas com 0 e 5 g L⁻¹ de sacarose apresentaram uma redução considerável de 0,3 ms (F_K) até a fase $F_P = 300$ ms, mostrando uma redução significativa dos valores de F_M nessas condições. Quando as plantas foram cultivadas com 10 g L⁻¹ de sacarose apresentaram uma diminuição em $F_J = 2$ ms até a última fase ($F_P = 300$ ms) (Figura 8a).

Bandas K e L positivas foram observadas apenas quando as plantas foram cultivadas com. Os valores mais baixos (valores mais negativos) de todas as bandas foram observados quando as plantas foram cultivadas com 10, 20 e 40 g L⁻¹ de sacarose, em relação ao controle (0 g L⁻¹ de sacarose) (Figura 8b-c).



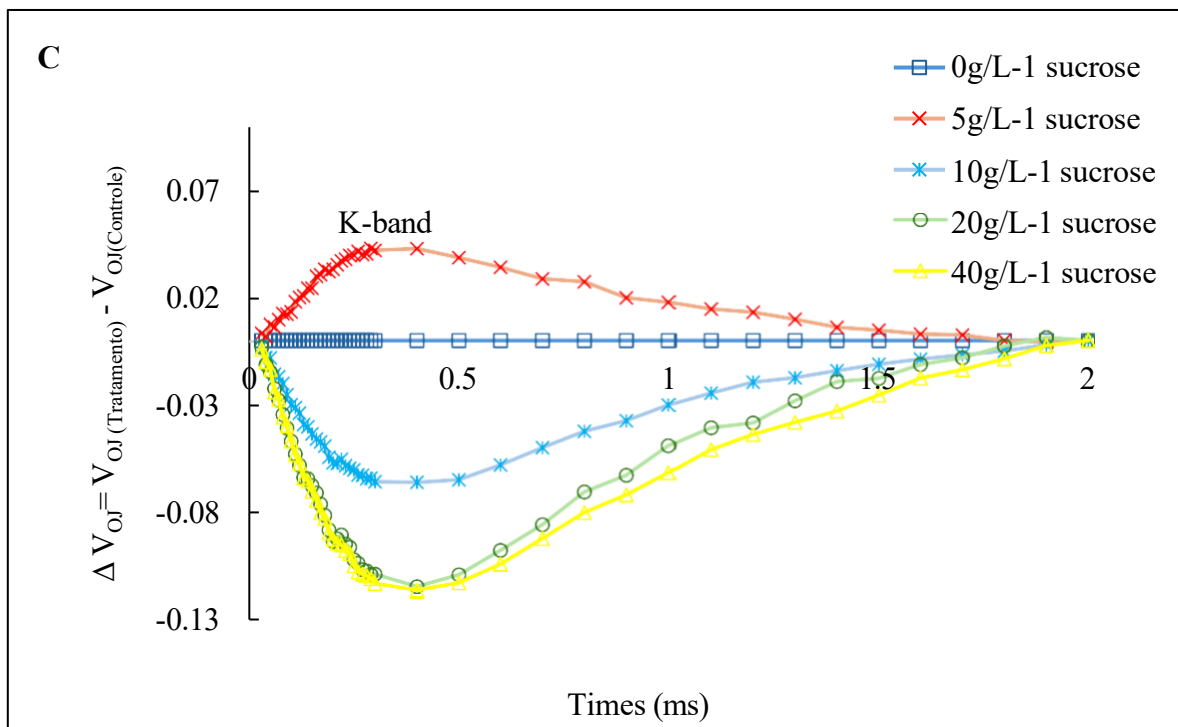
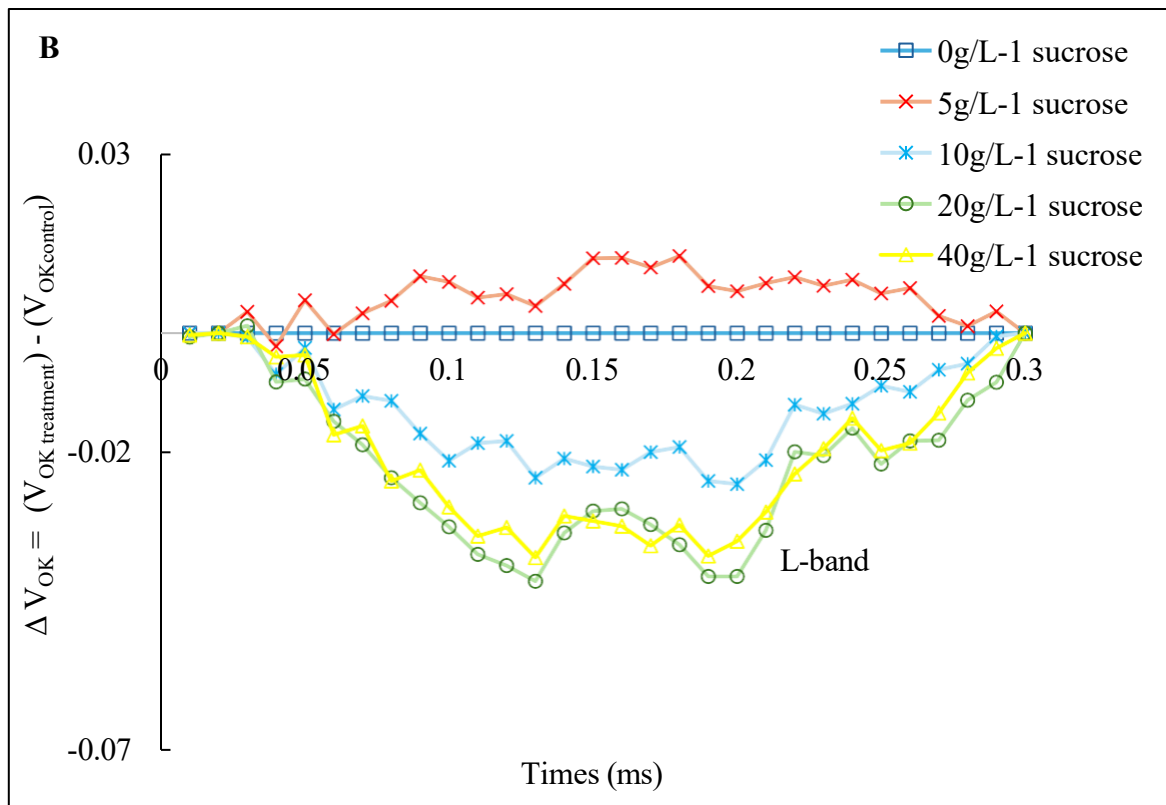


Figura 8 Transientes de fluorescência da clorofila *a* (a), diferenças cinéticas entre as etapas O e K, mostrando a banda L (b) e diferenças cinéticas entre as etapas O e J, mostrando a banda K (c) de plantas de *A. tenella* após 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 L⁻¹ de sacarose durante o cultivo *in vitro*. Todas as diferenças cinéticas foram normalizadas em função do tratamento controle (0 g L⁻¹ de sacarose)

A análise da fluorescência da clorofila *a* revelou diferenças fisiológicas nas plantas cultivadas com diferentes concentrações de sacarose. Observou-se os tratamentos 0, 5, 10 e 40 g L⁻¹, um aumento no valor da fluorescência variável relativa na etapa J (V_J). Todavia, uma diminuição no parâmetro V_J foi observada em plantas cultivadas em meio com 20 g L⁻¹ de sacarose.

Por outro lado, o valor da fluorescência variável relativa na etapa I (V_I) aumentou apenas nas plantas cultivadas em meio com 40 g L⁻¹ de sacarose. Além disso, valores menores de centro de reação do FSII ativos por seção transversal (RC/CS_m) foram encontrados para os tratamentos de 0, 5 e 10 g L⁻¹, enquanto as plantas cultivadas em 20 e 40 g L⁻¹ de sacarose, tiveram um aumento nesse parâmetro. Verificou-se redução do índice de desempenho do FSII (PI_{abs}) em plantas cultivadas em meio de 0, 5, 10 e 40 g L⁻¹ de sacarose. Enquanto plantas cultivadas com 20 g L⁻¹ de sacarose tiveram os maiores valores observados para o PI_{abs}.

Os parâmetros de rendimento quântico também diferiram significativamente entre os tratamentos. Para o tratamento de 20 g L⁻¹, os valores do rendimento quântico da fotoquímica primária (ϕP_0) e do transporte de elétrons (ϕE_0) aumentaram, enquanto o rendimento quântico de dissipação de energia (ϕD_0) diminuiu. Inversamente, as plantas contendo 0, 5, 10 e 40 g L⁻¹ de sacarose tiveram valores menores de ϕP_0 e ϕE_0 , à medida que ϕD_0 aumentou (Figura 9).

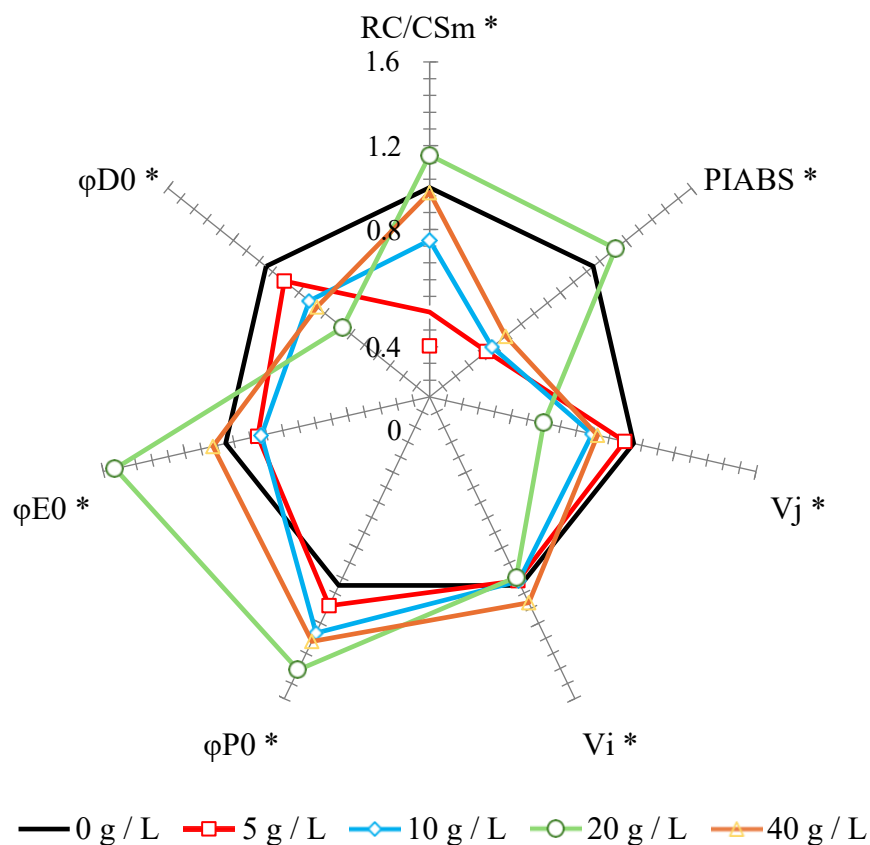


Figura 9 Parâmetros do teste JIP das plantas de *A. tenella* cultivadas em um meio com diferentes concentrações de sacarose (0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹), aos 30 dias de crescimento. Para cada parâmetro, as médias indicadas com um asterisco (*) diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). Todos os parâmetros do teste JIP foram normalizados em relação aos dados de controle (0 g L⁻¹ de sacarose)

3.4 Conteúdo dos pigmentos fotossintéticos

O teor dos pigmentos fotossintéticos também foi alterado pelas diferentes concentrações de sacarose. A sacarose mostrou um claro efeito benéfico em relação ao teor de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) e carotenoides (Car) em plantas cultivadas em 20 e 40 g L⁻¹ de sacarose. Entretanto, os teores dos pigmentos fotossintéticos diminuíram em concentrações de sacarose inferiores a 20 g L⁻¹ (Figura 10).

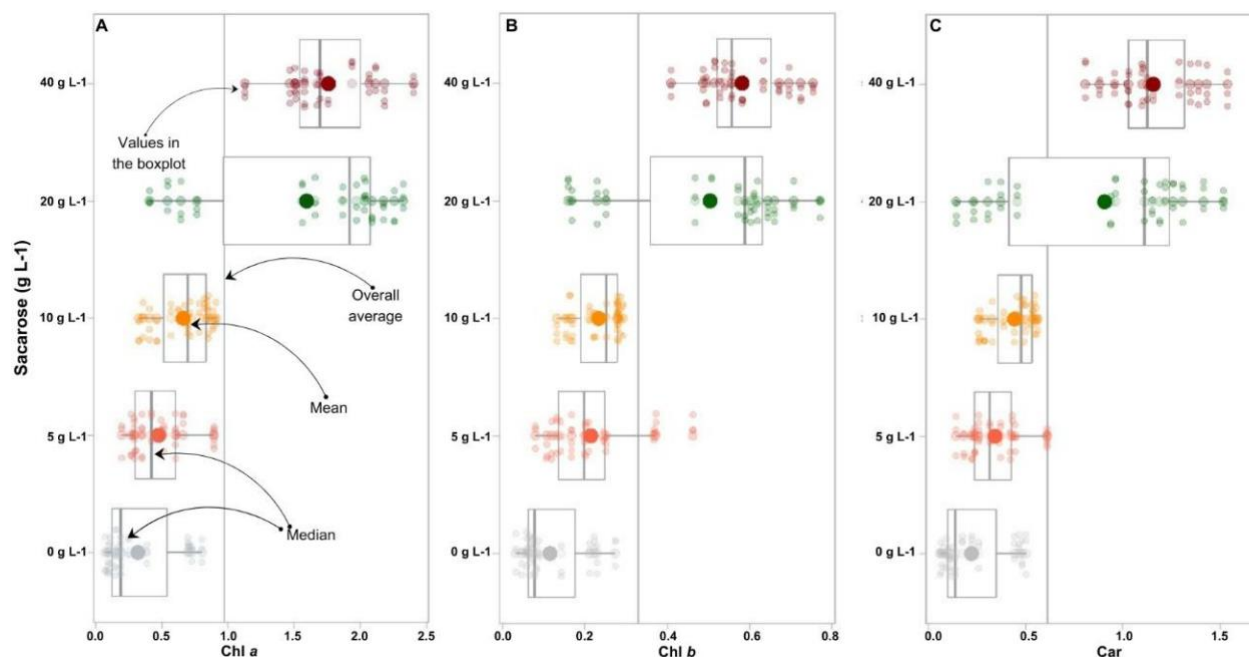


Figura 10 Teor de clorofila *a* (a), clorofila *b* (b) e carotenoides (c) das plantas de *A. tenella* cultivadas em um meio com diferentes concentrações de sacarose (0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹), aos 30 dias de crescimento *in vitro*

4. DISCUSSÃO

As condições *in vitro* atuaram como um importante modulador das respostas morfológicas das plantas de *A. tenella*. A diminuição no crescimento, atribuível à baixa concentração de sacarose no cultivo *in vitro* pode ter sido causada por alterações no metabolismo relacionadas à fotossíntese. Plantas de *A. tenella* cultivadas *in vitro* com redução de sacarose exibiram taxas de crescimento reduzidas, pois a maioria delas não foram capazes de realizar a fotossíntese de forma eficiente nessas condições, resultando na incapacidade de gerar energia para outros processos metabólicos (Arnold, 2008).

Nesse experimento, plantas quando cultivadas com concentração de sacarose inferior a 20 g L⁻¹ apresentaram uma redução tanto na biomassa fresca, quanto na biomassa seca. Isso pode ser atribuído à maior disponibilidade de carboidratos, que fornecem energia e biomassa para as redes moleculares responsáveis pela divisão e alongamento celular (Lastdrager et al. 2014). Além disso, os carboidratos podem influenciar no metabolismo e no transporte de auxinas nas plantas (Rolland, 2006; Lastdrager et al. 2014). As auxinas são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, promovendo a expansão celular.

Segundo Wang e Ruan (2013) a presença de sacarose é benéfica para o crescimento das raízes, pois estimula a expansão e a proliferação celular. Um sistema radicular bem desenvolvido é essencial para o crescimento saudável das plantas durante o cultivo *in vitro* (Martins et al. 2018). A clivagem da sacarose no meio resulta na produção de glicose e frutose, o que pode acelerar a divisão celular e conseqüentemente aumentar o peso e o volume das plantas (Wintermans et al. 2016; Martins et al. 2018).

Diferenças significativas foram reveladas na anatomia foliar de *A. tenella cultivada in vitro*. O diâmetro transversal do caule e o da medula foram reduzidos nas plantas cultivadas com 0, 5 e 10 g L⁻¹ de sacarose. A redução da área foliar pode estar associada à diminuição do tamanho e da quantidade de células, especialmente na medula. A redução da área medular devido à presença de células menores pode afetar a arquitetura das plantas. Tanto o diâmetro quanto o número de elementos do xilema podem influenciar negativamente o fluxo de elementos minerais para os tecidos da planta (Martins et al. 2016, 2019).

A redução do número de elementos vasculares, tanto nos feixes vasculares das folhas quanto no caule pode regular a translocação de sacarose para os tecidos, atenuando os efeitos tóxicos do excesso e escassez deste açúcar na parte aérea das plantas de *A. tenella* (Martins et al. 2016, 2019). Notou-se que as plantas de *A. tenella* apresentaram paredes celulares da epiderme do caule mais espessas quando cultivadas em meio suplementado com 40 g L⁻¹ de sacarose. Essas respostas podem estar associadas ao potencial hídrico do meio de cultivo, uma vez que a sacarose exógena altera o potencial osmótico do meio (Martins et al. 2016).

Em muitos casos, as plantas que crescem *in vitro* apresentam estômatos disfuncionais (Dias et al. 2014). O tamanho dos estômatos está relacionado à sua funcionalidade, pois as células-guarda menores respondem (abrem/fecham) mais rapidamente que as maiores e, conseqüentemente, mantêm a condutância estomática (Rouphael et al. 2017).

Plantas de *A. tenella* cultivadas em 0, 5, 10 e 40 g L⁻¹ de sacarose mantiveram os estômatos abertos, expressando menor funcionalmente. Um melhor funcionamento estomático, como foi observado em plantas cultivadas em 20 g L⁻¹ de sacarose, evita a dessecação excessiva das plantas micropropagadas (Deccetti et al. 2008). Estômatos menores tendem a ser mais eficientes em suas funções, porém, essa característica também pode influenciar o fluxo de massa ao modular a transpiração (Baroni et al. 2020; Martins et al. 2019).

A redução no número de elementos vasculares pode indicar uma resposta à presença de sacarose, resultando em uma diminuição no fluxo de massa. O número e o diâmetro dos elementos vasculares nas folhas podem regular a condutividade hidráulica, o conteúdo relativo de água (RWC) e o turgor celular nas folhas (Sellin et al. 2019; Martins et al. 2023). Uma redução

na translocação de nutrientes do meio pode comprometer a acumulação de massa e a quantidade de água necessária para a reação fotossintética, reduzindo assim a eficiência do aparato fotossintético.

Um desenvolvimento adequado da espessura da epiderme é essencial para evitar a perda excessiva de água, especialmente em condições de baixa disponibilidade hídrica, como sob estresse osmótico (Hameed et al. 2015). Uma epiderme mais espessa pode aumentar a resistência ao estresse hídrico, melhorando as relações hídricas e protegendo os tecidos foliares (Oliveira et al. 2018). Isso sustenta o aumento observado na espessura da epiderme (na face abaxial e adaxial) com o aumento das concentrações de sacarose.

O diâmetro dos vasos do xilema mostrou-se maior nas plântulas cultivadas em meio contendo 20 g L⁻¹ de sacarose. Sob essas condições, o sistema vascular das folhas apresentou um desenvolvimento favorável do xilema. Vasos xilemáticos mais amplos estão associados a uma maior condutividade hidráulica (Rodríguez-Gamir et al. 2010). Um xilema eficiente é caracterizado por vasos condutores largos e longos (Bresta et al. 2011).

Uma banda-K positiva indica perturbações fisiológicas no FSII, o que está intimamente relacionada a uma inativação do OEC (Xiang et al. 2013; Kalaji et al. 2016), bem como um desequilíbrio energético entre os lados doador e aceitador de elétrons do FSII, causando um desequilíbrio entre o fluxo de elétrons de OEC para P680 no lado doador de FSII, e os aceptadores do fluxo de elétrons de FSII para Quinona A (Q_A) (Yusuf et al. 2010; Santos et al. 2020)

A presença de bandas positivas em plantas cultivadas com 5 g L⁻¹ de sacarose, também mostraram a ocorrência de estresse induzido pela diminuição de sacarose. As amplitudes positivas das bandas apresentadas pelas diferenças cinéticas na fase OJ (banda K) e fase OK (banda L) mostram distúrbios fisiológicos nas plantas. A formação da banda-L positiva indica distúrbios nas membranas dos tilacóides e conectividade mais fraca entre os centros de reação (CRs) e o fotossistema II adjacentes ao nível dos complexos antenas (Pereira et al. 2016; Strasser et al. 2004).

Os danos observados na anatomia e morfologia das plantas também refletiram-se em perturbações fisiológicas. As variações em V_J das plantas cultivadas com 0, 5, 10 e 40 g L⁻¹ de sacarose e em V_I especificamente para o tratamento com 40 g L⁻¹ de sacarose, indicam que as plântulas sofreram distúrbios fisiológicos. Os valores elevados de fluorescência nesses estágios podem indicar uma conectividade reduzida (desagrupamento) das unidades do FSII, danos ao complexo de evolução do oxigênio (OEC), baixa eficiência no transporte de elétrons entre quinona A (Q_A) e quinona B (Q_B), e inibição parcial da redução do *pool* de PQ (Jiang et al. 2008; Clairvil et al. 2021).

Por outro lado, as plantas cultivadas com 20 g L⁻¹ de sacarose apresentaram menores valores de V_J e V_I . Esses resultados sugerem um OEC mais funcional, maior capacidade de transferência de elétrons no FSII (entre Q_A e Q_B) e maior eficiência no movimento de elétrons do lado doador do FSII para o lado aceitador do FSI (Martins et al. 2024). A redução em RC/CS_m de fato levou a um aumento em ϕD_0 , o que se traduz em dissipação de energia na forma de calor. Essa dissipação de energia é considerada um mecanismo de proteção contra danos fotossintéticos (Ma et al. 2017).

Parâmetro de desempenho fotossintético, como o PI_{abs} , oferece uma explicação sobre como os fatores de estresse afetam o desempenho e a integridade do aparato fotossintético (Kalaji et al. 2016). A diminuição do PI_{abs} em plantas cultivadas com concentrações de sacarose de 0, 5, 10 e 40 g L⁻¹ reflete as limitações dessas plantas em conservar energia para promover um bom desempenho do FSII (Stibert et al. 2018). Portanto, alterações nesses parâmetros são indicadores da atividade fotossintética ou mesmo do estresse que as plantas podem estar sofrendo e que pode afetar diretamente ou indiretamente o aparato fotossintético.

A redução dos valores de ϕP_0 e ϕE_0 devido ao estresse causado pela deficiência (0, 5 e 10 g L⁻¹) e pelo excesso de sacarose (40 g L⁻¹) nas plantas de *A. tenella* indicou danos fotoquímicos e fotoinibição no FSII, resultando em um de ϕD_0 . Conforme observado por Martins et al. (2015), aumentos em ϕD_0 refletem uma redução na dinâmica de transporte e utilização da energia de excitação dessas plantas. Diminuições nos valores de ϕE_0 também sugerem um transporte de elétrons menos eficiente, especialmente de Q_A para Q_B (Emamverdian et al. 2015).

As mudanças no conteúdo de pigmentos fotossintéticos podem explicar as alterações observadas na fluorescência da clorofila *a*. Diversos estudos relataram uma diminuição na concentração de pigmentos fotossintéticos em função da concentração de sacarose (Martins et al. 2015a, 2016b). De acordo com esses autores, concentrações menores de sacarose no meio de crescimento podem estimular a produção de clorofila em plantas cultivados *in vitro*. Isso pode estar associado a uma maior atividade fotossintética nas plantas cultivadas com baixas concentrações de sacarose.

No presente estudo, as plantas cultivadas com concentrações de sacarose de 20 e 40 g L⁻¹ apresentaram maiores teores de pigmentos fotossintéticos. Os menores teores de pigmentos fotossintéticos observados em plantas cultivadas sem e com baixa disponibilidade de sacarose indicam que esta espécie requer algumas fontes de energia exógena inicial (como a sacarose) para acumular-se no aparelho fotossintético e iniciar o crescimento.

Essa dependência exógena de sacarose foi evidenciada pelas características de menor crescimento, o aumento dos teores de Chl *a* e *b* e Car nas plantas cultivadas sob 20 e 40 g L⁻¹ de

sacarose pode ter resultado em uma maior atividade fotossintética (Martins et al. 2015; Martins et al. 2023), o que pode ter contribuído para o crescimento observado nessas condições. Por outro lado, a maior produção de Chl *b* pode estar relacionada a alterações na síntese de clorofila ou até mesmo na degradação do FSII proporcionada pela alta concentração de sacarose.

A presença de altas concentrações de sacarose nos tecidos foliares pode resultar na diminuição da demanda de coletores e na regulação negativa da atividade do transportador. Quando os níveis de açúcar aumentam nas células do mesofilo, a fotossíntese é negativamente regulada (Lemoine et al. 2013).

A avaliação do teor de clorofila em plantas propagadas *in vitro* oferece informações essenciais sobre o estado fotossintético durante a micropropagação (Yadav et al. 2010), uma vez que o conteúdo desses pigmentos está intimamente ligado ao metabolismo primário (Dutta Gupta e Pattanayak, 2017).

5. CONCLUSÃO

As condições de cultivo *in vitro* influenciaram a morfoanatomia e desempenho fotossintético de *A. tenella*. A utilização de concentrações de carboidratos inferiores a 20 g L⁻¹ resultou em modificações morfológicas e anatômicas, sugerindo que as plantas estão sob estresse. Por outro lado, a aplicação de sacarose pode ter um efeito mais favorável na concentração de 20 g L⁻¹, uma vez que não ocasiona alterações significativas no desempenho do aparato fotossintético e na anatomia das plantas, observou-se, essa ser a melhor dose para o cultivo *in vitro* de *A. tenella*. No que diz respeito à dosagem de 40 g L⁻¹ de sacarose, embora seja tolerável, as plantas começam a manifestar sinais de estresse fisiológico e morfológico.

6. REFERÊNCIAS

Alfonso D, Cicutelli A, Guarino F, Rodríguez D, Castiglione S (2018) *In vitro* propagation of *Leucocroton havanensis* Borhidi (Euphorbiaceae): A rare serpentine-endemic species of Cuba. Plant Biosystems-An International Journal Dealing With all Aspects of Plant Biology, 152(4), 649-656.

Arnold SV, Clapham D (2008) Embriogênese do abeto. In: Suárez, MF, Bozhkov, PV (eds) Embriogênese Vegetal. Métodos em Biologia Molecular™, vol 427. Humana Press.

https://doi.org/10.1007/978-1-59745-273-1_3

Arnon DI (1949) Enzimas de cobre em cloroplastos isolados. Polifenoloxidase em *Beta vulgaris*. Fisiologia vegetal, 24(1), 1.

Baroni GDR, Pereira MP, Corrêa FF, Castro EMD e Pereira FJ (2020) Cadmium tolerance during seed germination and seedling growth of *Schinus molle* (Anacardiaceae). Floresta e Ambiente, 27, e20170502.

Bezerra GA, Gabriel AVMD, Mariano ED, Cardoso JC (2019) *In vitro* culture and greenhouse acclimatization of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) with microorganisms isolated from its roots. Ornam Hortic 25(4):407–416. <https://doi.org/10.1590/2447-536X.v25i4.2046>

Bresta P, Nikolopoulos D, Economou G, Vahamidis P, Lyra D, Karamanos A, Karabourniotis G (2011) Modification of water entry (xylem vessels) and water exit (stomata) orchestrates long term drought acclimation of wheat leaves. Plant and soil, 347, 179–193.

Buschmann C (1999) Photochemical and non-photochemical quenching coefficients of the chlorophyll fluorescence: comparison of variation and limits. Photosynthetica, 37, 217–224. <https://doi.org/10.1023/A:1007003921135>.

Cabrita MT, Gameiro C, Utkin AB, Duarte B, Caçador I, Cartaxana P (2016) Photosynthetic pigment laser-induced fluorescence indicators for the detection of changes associated with trace element stress in the diatom model species *Phaeodactylum tricornerutum*. Environmental monitoring and assessment, 188(5), 285. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5293-4>

Castro ED, Pereira FJ, Paiva R (2009) Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos Lavras: UFLA, 9(4)

Clairvil E, Martins JP, Braga PC, Moreira SW, Conde LT, Cipriano R, Falqueto, AR, Gontijo AB (2021) Zinc and cadmium as modulating factors of the morphophysiological responses of

Alternanthera tenella Colla (Amaranthaceae) under *in vitro* conditions.

https://doi.org/1032615/p_s2021059

Chen Y, Wang H, Hu W, Wang S, Snider JL, Zhou Z (2017) A temperatura elevada co-ocorrendo e estresses de encharcamento interrompem a síntese de celulose, alterando a expressão e a atividade de enzimas associadas ao balanço de carboidratos durante o desenvolvimento de fibras no algodão. *Botânica Ambiental e Experimental*, 135, 106⁻¹17.

Deccetti SFC, Soares AM, Paiva R, de Castro EM (2008) Effect of the culture environment on stomatal features, epidermal cells and water loss of micropropagated *Annona glabra* L. plants *Scientia Horticulturae*, 117(4), 341-344.

DIAS G, de MG et al. (2014) Photosynthesis and leaf anatomy of 'Anthurium' cv. Rubi plantlets cultured '*in vitro*' under different silicon (Si) concentrations. *Australian Journal of Crop Science*, [S. l.], v. 8, n. 8, 1160-1167, Aug.

Dobránszki J, Mendler-Drienyovszki N (2014) Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of *in vitro* apple leaves. *Journal of plant physiology*, 171(16), 1472-1478. <https://doi.org/101016/j.jplph201406015>

Dutta Gupta, Snehasish and Pattanayak A (2017). Intelligent image analysis (IIA) using artificial neural network (ANN) for non-invasive estimation of chlorophyll content in micropropagated plants of potato.

Eckstein A, Zięba P, Gabryś H (2011) Sugar and Light Effects on the Condition of the Photosynthetic Apparatus of *Arabidopsis thaliana* Cultured *in vitro*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31, 90 – 101.

Emamverdian A, Ding Y, Mokhberdoran F, Xie Y (2015) Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *The scientific world journal*, 2015
<https://doi.org/101155/2015/756120>.

Ferreira EA, Procópio SO, Silva EAM, Silva AA, Rufino RJN (2003) Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil: IV- *Amaranthus*

deflexus, *Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphorbia heterophylla*. *Planta daninha*, 21, 263-271.

Guerra RNM, Pereira HA, Silveira LMS, Olea RSG (2003) Immunomodulatory properties of *Alternanthera tenella* Colla aqueous extracts in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, 1215-1219.

Hameed A, Gulzar S, Aziz I, Hussain T, Gul B, Ajmal Khan M (2015) Efeitos da salinidade e do ácido ascórbico no crescimento, estado da água e sistema antioxidante em uma halófito perene. *AoB PLANTS*, Volume 7, plv004. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv004>

Jiang HX, Chen LS, Zheng JG, Han S, Tang N, Smith BR (2008) Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in citrus leaves assessed by the chlorophyll *a* fluorescence transiente. *Tree physiology*, 28(12), 1863–1871. <https://doi.org/10.1093/treephys/28121863>

Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. *Plant microtechnique*, (First Ed).

Kalaji HM, Jajoo A, Oukarroum A, Brestic M, Zivcak M, Samborska IA, Ladle RJ (2016) Chlorophyll *a* fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta physiologiae plantarum*, 38, 1-11.

Kholová J, Hash CT, Kočová M, Vadez V (2011) Does a terminal drought tolerance QTL contribute to differences in ROS scavenging enzymes and photosynthetic pigments in pearl millet exposed to drought. *Environmental and Experimental Botany*, 71, 99-106.

Kraus JE, Arduin M (1997) *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Seropédica: EDUR.

Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S (2014) Sugar signals and the control of plant growth and development. *Journal of experimental botany*, 65(3), 799–807. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert474>

Lembrechts R, Ceusters N, Proft MD, Ceusters J (2017). Sugar and starch dynamics in the medium-root-leaf system indicate possibilities to optimize plant tissue culture. *Scientia Horticulturae*, 224, 226-231.

Lemoine R, Camera SL, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Durand M (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in plant science*, 4, 272.

Martins JPR, Pasqual M, Martins AD, Ribeira SF (2015) Effects of salts and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). *Australian Journal of Crop Science*, 9(1), 85-91.

Martins JPR, Schimildt ER, Alexandre RS, Falqueto AR, Otoni WC (2015) Chlorophyll *a* fluorescence and growth of *Neoregelia concentrica* (Bromeliaceae) during acclimatization in response to light levels. *In vitro Cellular e Developmental Biology-Plant*, 51, 471-481.

Martins JPR, Rodrigues LCA, Santos ER, Batista BG, Gontijo ABPL, Falqueto AR (2018) Anatomy and photosystem II activity of *in vitro* grown *Aechmea blanchetiana* as affected by 1-naphthaleneacetic acid. *Biologia Plantarum*, v 62, p 211-221. https://doi.org/10.1007/s_10535-018-0781-8

Martins JPR, Rodrigues LCD, Silva TD et al. (2019) Sources and concentrations of silicon modulate the physiological and anatomical responses of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) during *in vitro* culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 137, 397–410 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01579-6>

Martins JPR, Rodrigues LCDA, Conde LT, Gontijo ABPL, Falqueto AR (2020) Anatomical and physiological changes of *in vitro*-propagated *Vriesea imperialis* (Bromeliaceae) in the function of sucrose and ventilated containers. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 154(1), 87-99. <https://doi.org/10.1080/1126350420191635223>

Martins JP, Wawrzyniak MK, Ley-López JM, Kalemba EM, Mendes MM Chmielarz P (2022) 6-Benzylaminopurine and kinetin modulations during *in vitro* propagation of *Quercus robur*

(L): an assessment of anatomical, biochemical, and physiological profiling of shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 151, 149 – 164. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0972-y>

Matysiak, Bożena and Gabryszewska, Eleonora (2016) The effect of *in vitro* culture conditions on the pattern of maximum photochemical efficiency of photosystem II during acclimatisation of *Helleborus niger* plantlets to *ex vitro* conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 125. 10.1007/s11240-016-0972-y.

Murashige, T and Skoog, . (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Mohamed MAH, Alsadon AA 2010 Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. *Scientia Horticulturae* 123: 295-300.

Moreira HDC, Bragança HBN (2011) Manual de identificação de plantas infestantes. Campinas: FMC Agricultural Products.

Oliveira I, Meyer A, Afonso S, Gonçalves B (2018) Compared leaf anatomy and water relations of commercial and traditional *Prunus dulcis* (Mill) cultivars under rain-fed conditions. *Scientia Horticulturae*, 229, 226-232. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.11.015>

Öquist G, Hurry V, Huner NP (1993) Low-Temperature Effects on Photosynthesis and Correlation with Freezing Tolerance in Spring and Winter Cultivars of Wheat and Rye. *Plant Physiology*.

Oxborough, K, Baker NR (1997) Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and nonphotochemical components – calculation of qP and Fv-/Fm-; without measuring Fo-. *Photosynthesis Research*, 54, 135–142.

Pereira MP, Rodrigues LC, Corrêa FF (2016) Cadmium tolerance in *Schinus molle* trees is modulated by enhanced leaf anatomy and photosynthesis. *Trees* **30**, 807–814. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1322-0>

Rolland F, Baena-González E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual review of plant biology*, 57, 675-709.

Rodríguez-Gamir J, Intrigliolo DS, Primo-Millo E, Forner-Giner MA (2010) Relationships between xylem anatomy, root hydraulic conductivity, leaf/root ratio and transpiration *in citrus* trees on different rootstocks. *Physiologia plantarum*, 139(2), 159-169.

<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2010.01351.x>

Rosa WS (2017) Desempenho do aparato fotossintético em função das citocininas empregadas durante a fase de multiplicação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, São Mateus

Rouphael Y, Micco, Veronica, Arena C, Raimondi G, Colla G, De Pascale S (2017) Effect of *Ecklonia maxima* seaweed extract on yield, mineral composition, gas exchange, and leaf anatomy of zucchini squash grown under saline conditions. *Journal of Applied Phycology*. 29. 10.1007/s10811-016-0937-x.

Sáez PL, Bravo LA, Sanchez-Olate M, Bravo PB, Ríos D (2016) Effect of Photon Flux Density and Exogenous Sucrose on the Photosynthetic Performance during *in vitro* Culture of *Castanea sativa*. *American Journal of Plant Sciences*, 07, 2087-2105.

Santos ER, Martins JPR, Rodrigues LC de A, Gontijo ABPL, Falqueto AR. (2020) Morphophysiological responses of *Billbergia zebrina* Lindl. (Bromeliaceae) in function of types and concentrations of carbohydrates during conventional *in vitro* culture. *Ornam Hortic* [Internet]. Jan;26(1):18–34. Available from: <https://doi.org/10.1590/2447-536X.v26i1.2092>

Ševčíková H, Lhotáková Z, Hamet J, Lipavská H (2018) Mixotrophic *in vitro* cultivations: the way to go astray in plant physiology. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v 167, n 3, p 365–377.

Sellin A, Rosenvald K, Õunapuu-Pikas E, Tullus A, Ostonen I and Lõhmus K (2015) Elevated air humidity affects hydraulic traits and tree size but not biomass allocation in young silver birches (*Betula pendula*). *Front. Plant Sci.* 6:860. [doi: 10.3389/fpls.2015.00860](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00860)

Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A (2004) Analysis of the Chlorophyll *a* Fluorescence Transient In: Papageorgiou, GC, Govindjee (eds) *Chlorophyll a Fluorescence Advances in. Photosynthesis and Respiration*, vol 19 Springer, Dordrecht.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12

Wang YW, Xu C, Lv CF, Wu M, Cai XJ, Liu ZT, Lv CG (2016) Chlorophyll *a* fluorescence analysis of high-yield rice (*Oryza sativa* L.) LYPJ during leaf senescence. *Photosynthetica*, 54(3), 422-429. [doi: 10.1007/s11099-016-0185-y](https://doi.org/10.1007/s11099-016-0185-y)

Ma J, Lv C, Xu M, Hao P, Wang Y, Shen W, Lv C (2017) Analysis of chlorophyll *a* fluorescence and proteomic differences of rice leaves in response to photooxidation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2342-0>

Yadav SK (2010) Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30, 515–527. <https://doi.org/10.1051/agro/2009050>

Yaseen M, Ahmad T, Sablok G, Standardi A, Hafiz IA (2013) Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular biology reports*, 40(4), 2837–2849. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2299-z>

Yusuf MA, Kumar D, Rajwanshi R, Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Govindjee, Sarin NB (2010). Overexpression of gamma-tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurements. *Biochimica et biophysica acta*, 1797(8), 1428–1438. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.002>

TABELAS

LEGENDA PARA FIGURAS

Figura. 1 Peso fresco da parte aérea e raiz (A), peso seco da parte aérea e raiz (B) e área foliar (C), das plantas de *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae), em função das concentrações de sacarose (0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹), por 30 dias durante o cultivo *in vitro*. Médias ± EP (n = 5) seguidas da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p<0,05) Erro! Indicador não definido.

Figura. 2 Seções transversais (A-E) e características anatômicas (F-G) do caule das plantas *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) aos 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 L⁻¹ de sacarose, das Figuras (A, B, C, D, E) respectivamente durante o cultivo *in vitro*. Epiderme da parede celular do caule e número de feixes vasculares (F) e diâmetro do caule, da medula e dos vasos de xilema (G) de plantas de *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) aos 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 L⁻¹ de sacarose durante o cultivo *in vitro*. (F-G) Médias (±EP), n = 6, seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05). Seções transversais do caule coradas com soluções de safrablau. co=colênquima, ep=epiderme, pi=medula, vb=feixe vascular, tr=tricoma. Barras = 50 µm 9

Figura. 3 Seções paradérmicas e transversais (A-J) de folhas das plantas *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) aos 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 L⁻¹ de sacarose, das Figuras (A, F), (B, G), (C, H), (D, I), (E, J) respectivamente durante o cultivo *in vitro*. Seções transversais da folha coradas com soluções de safrablau. Seções paradérmicas da folha coradas com soluções de safranina. co=colênquima, tr=tricoma, vb=feixe vascular, ve=elemento de vaso, st=estômato. Barras paradérmicas = 100 µm. Barras transversais = 50 µm Erro! Indicador não definido.

Figura. 4 Espessura da epiderme abaxial e adaxial *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae). Caules aos 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹ de sacarose, durante cultivo *in vitro*. Médias (± EP) seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (p<0,05) Erro! Indicador não definido.

Figura. 5 Número de vasos do xilema e diâmetro dos vasos de xilema de *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae). Folhas aos 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹ de sacarose, durante cultivo *in vitro*. Médias (± EP) seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (p<0,05) Erro! Indicador não definido.

Figura. 6 Índice e funcionalidade estomática de plantas de *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) aos 30 dias de crescimento em meio contendo 0, 5, 10, 20 e 40 L⁻¹

de sacarose durante o cultivo *in vitro*. (K) Médias (\pm EP), n = 6, seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) Erro! Indicador não definido.

Figura. 7 Parâmetros do teste JIP das plantas de *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) cultivadas em um meio com diferentes concentrações de sacarose (0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹), aos 30 dias de crescimento. Para cada parâmetro, as médias indicadas com um asterisco (*) diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Todos os parâmetros do teste JIP foram normalizados em relação aos dados de controle (0 g L⁻¹ de sacarose) Erro! Indicador não definido.

Figura. 8: Clorofila a (A), clorofila b (B) e carotenoides (C) das plantas de *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) cultivadas em um meio com diferentes concentrações de sacarose (0, 5, 10, 20 e 40 g L⁻¹), aos 30 dias de crescimento *in vitro*. 17

FIGURAS

LEGENDA PARA TABELA

Tabela 1: Abreviações dos parâmetros, fórmulas e descrição dos dados derivados da fluorescência transiente da clorofila *a*. 4