

Anatomia foliar de cultivares de bananeira, influenciada por mudanças no ambiente de cultivo na fase de enraizamento/alongamento *in vitro*.¹

Rodrigues, Filipe Almendagna²; Costa, Frederico Henrique da Silva²; Castro, Evaristo Mauro de²; Pasqual, Moacir²; Pereira, Jonny Everson Scherwinski³; Miyata, Luzia Yuriko².

² Universidade Federal de Lavras – UFLA, Caixa Postal 37, CEP 37200-000, Lavras, MG. E-mail para contato: filipealmendagna@yahoo.com.br; ³ Pesquisador da Embrapa Acre, Caixa Postal 321, CEP 69908-970 Rio Branco-AC.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, mudanças significativas ocorreram no sistema de produção de mudas de bananeira devido ao aumento de doenças e do nível de tecnificação empregado nas lavouras, assim como também pela ineficiência dos métodos convencionais de propagação que, além de apresentarem baixa taxa de multiplicação, podem se constituir num mecanismo de disseminação de doenças e pragas. Diante desta realidade, tornou-se imprescindível à utilização de mudas com elevado padrão genético e fitossanitário, o que tem sido possível por meio da micropropagação, que além de permitir a obtenção massal de mudas de excelente qualidade, possibilita ainda a rápida propagação e validação de cultivares lançadas pelos programas de melhoramento genético (Rocha, 2005).

Contudo, modificações nos métodos de cultivo *in vitro* de musáceas têm sido foco de pesquisas, destacando-se entre as mais importantes, a substituição das lâmpadas fluorescentes pela luz natural, associada ou não à redução nos níveis exógenos de sacarose (Kodym & Zapata-Arias, 2001; Rocha, 2005). Isso porque os gastos com iluminação artificial nas salas de cultivo somam, aproximadamente, 65% do total de energia elétrica utilizada nos laboratórios de cultura de tecidos de plantas (Standaert de Metsenaere, 1991). Porém, as informações e o entendimento sobre os efeitos da luz natural e da alteração nos níveis de sacarose sobre as plantas cultivadas *in vitro* e sua subsequente aclimatização, ainda são incipientes. Dessa forma, estudos que contribuam para uma melhor compreensão dos efeitos desta fonte de luz na micropropagação de genótipos de bananeira são necessários para sua aceitação e aplicação, na obtenção massal de plantas.

Objetivou-se estudar a anatomia foliar de plantas de bananeira submetidas a alterações no ambiente de cultivo na fase de enraizamento *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Como material vegetal foram utilizadas brotações axilares, originadas de explantes em fase de multiplicação e mantidas sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiância de 42 W.m^{-2} e fotoperíodo de 16 horas. Obtidas as brotações, estas foram transferidas para meio constituído pelos sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 1 mg.L^{-1} de ANA (ácido naftalenoacético) e 6 g.L^{-1} de ágar (Merse[®]), com pH 5,8, onde foram aplicados os tratamentos para enraizamento/alongamento. Os tratamentos consistiram de duas concentrações de sacarose (15 e 30 g.L^{-1}), duas cultivares de bananeira [Caipira (AAA) e Pacovan (AAB)] e dois ambientes de cultivo (sala de crescimento – artificial e casa de vegetação – natural), em esquema fatorial $2 \times 2 \times 2$. O cultivo foram realizados em frascos de 250 mL contendo 40 mL de meio e selados com filme transparente.

O ambiente artificial foi constituído de uma sala de crescimento, possuindo iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares (Osram 20 W, luz do dia especial), com irradiância média de 42 W.m^{-2} , fotoperíodo de 16 horas e $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O ambiente natural consistiu de uma casa de vegetação, coberta por filme de polietileno transparente (150 microns) e sombreamento de 70%, apresentando os seguintes parâmetros ambientais: (temperaturas máximas, mínimas e médias de $26^\circ\text{C}/32^\circ\text{C}$;

¹ Trabalho realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

16°C/16°C e 20°C/23°C) e (irradiâncias máximas, mínimas e médias de 93,95 W.m⁻²/199,69 W.m⁻²; 11,13 W.m⁻²/10,66 W.m⁻² e 49,38 W.m⁻²/99,43 W.m⁻²), referentes a dias nublado e claro típicos do período de experimentação. Dados de radiação solar diurna, incidente na altura dos frascos, foram obtidos por sensores de radiação (LI-200SA, Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Li-cor.Neb), a intervalos de meia hora, enquanto os dados de temperatura foram obtidos com termo-higrógrafo.

Para as avaliações anatômicas foram empregadas seções transversais e paradérmicas (adaxial e abaxial), obtidas do terço médio da segunda folha expandida (direção ápice-base), coletadas de diferentes plantas de cada tratamento e previamente fixadas em FAA 70 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico) (Johansen 1940) por 72 horas e conservadas em álcool etílico 70% (v/v). As seções transversais e paradérmicas foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio a 50% (v/v), lavadas em água destilada e coradas com azul de astra-safranina e safranina 1%, respectivamente. Para as avaliações nas seções transversais foi utilizado microscópio KEN-A-VISION 2100, equipado com uma ocular micrométrica e objetiva de 40X, sendo efetuadas duas medições em 5 folhas, na região após o terceiro feixe lateral, totalizando 10 repetições/tratamento. Nas seções paradérmicas empregou-se microscópio Olympus CBB (objetiva de 40X), com o auxílio de câmara clara, sendo as avaliações feitas em quatro campos da região mediana de seis folhas/tratamento, totalizando de 24 campos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e quatro explantes por parcela. Os dados obtidos foram inicialmente submetidos às análises de variâncias individuais (para cada ambiente de cultivo), realizando-se em seguida, o teste de homogeneidade de variância e a análise conjunta. Para isso, utilizou-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000), sendo as médias comparadas pelo Teste F ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito significativo da interação entre os três fatores estudados (ambiente x sacarose x cultivar) foi observado para a espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso, espessura do limbo foliar e densidade estomática da epiderme da face abaxial (Tabela 1). Por outro lado, as demais características tiveram influência da interação dupla entre os fatores e, em alguns casos, dos fatores isolados (Tabela 2).

Para a cultivar Caipira, incremento significativo na espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso foi verificado em plantas mantidas sob ambiente natural, em ambas as concentrações de sacarose. Quanto ao limbo foliar, nenhuma diferença significativa foi observada entre os ambientes. Já em relação à densidade estomática *abaxial*, diferença significativa entre os ambientes foi observada apenas com 30 g.L⁻¹ de sacarose, embora o ambiente natural tenha promovido maior densidade média (Tabela 1).

Na 'Pacovan', resultados significativamente superiores para a espessura do parênquima paliçádico e densidade estomática abaxial foram observados em ambiente natural, em ambas as concentrações de sacarose. Já para a espessura do parênquima esponjoso e do limbo foliar, o ambiente natural foi significativamente superior apenas em meio contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose (Tabela 1).

Efeito positivo do aumento da irradiância sobre o espessamento do mesófilo e a contribuição significativa do parênquima paliçádico neste espessamento foram observados por Hanba et al. (2002), em espécies de *Acer*. Já estudo realizado por Deccetti (2004) mostrou que plantas de *Annona glabra* enraizadas *in vitro* sob 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ tiveram aumentos significativos de espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso. Ainda de acordo com este autor, a diferenciação pronunciada dos parênquimas pode ser determinante na otimização do processo de fotossíntese e potencialmente benéfico na sobrevivência *ex vitro*. Quanto aos estômatos, incremento na densidade estomática da face *abaxial* em explantes de plantas *in vitro* de bananeira sob ambiente natural, com 15 ou 30 g.L⁻¹ de sacarose foi anteriormente relatado por Rocha (2005).

Tabela 1. Modificações na anatomia foliar de plantas *in vitro* de bananeira, influenciadas pelo ambiente de cultivo (Natural e Artificial), sacarose (15 e 30 g.L⁻¹) e cultivares (Pacovan e Caipira), após 45 dias de enraizamento. UFLA, Lavras – MG, 2007.

Ambiente	Caipira		Média	Pacovan		Média
	15	30		15	30	
Espessura do parênquima paliçádico (µm)						
Natural	67,95 aA	66,60 aA	72,23 a	71,55 aB	82,80 aA	72,23 a
Artificial	48,15 bA	54,10 bA	49,08 b	51,75 bA	42,30 bB	49,08 b
Média	59,85 A	61,45 A		59,85 A	61,45 A	
CV (%)	11,77					
Espessura do parênquima esponjoso (µm)						
Natural	85,50 aA	79,20 aA	76,05 a	62,55 aB	76,95 aA	76,05 a
Artificial	67,95 bA	66,00 bA	59,59 b	61,65 aA	42,95 bB	59,59 b
Média	69,41 A	66,23 A		69,41 A	66,23 A	
CV (%)	15,09					
Espessura do limbo foliar (µm)						
Natural	277,20 aA	268,20 aA	272,36 a	256,95 aB	287,10 aA	272,36 a
Artificial	279,90 aA	264,00 aA	251,85 b	255,15 aA	208,35 bB	251,85 b
Média	267,30 A	256,91 B		267,30 A	256,91 B	
CV (%)	6,70					
Densidade estomática abaxial						
Natural	158,05 aA	167,23 aA	155,60 a	149,48 aA	147,63 aA	155,60 a
Artificial	150,69 aA	131,09 bB	132,47 b	121,92 bA	126,19 bA	132,47 b
Média	145,03 A	143,04 A		145,03 A	143,04 A	
CV (%)	13,61					

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, dentro de cada variável, diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

Para a hipoderme *adaxial*, o ambiente artificial proporcionou espessamento significativamente superior somente com 15 g.L⁻¹ de sacarose e para ambas as cultivares. Já para a hipoderme *abaxial*, apenas a 'Caipira' foi influenciada pelo ambiente de cultivo ($P < 0,05$), com maior espessamento em plantas submetidas ao ambiente artificial. Por outro lado, nenhum efeito significativo foi evidenciado para a sacarose (Tabela 2). Respostas semelhantes foram relatadas por Rocha (2005) para a cv. 'Prata-Anã', que observou maior espessura das hipodermes *abaxial* e *adaxial* em plantas mantidas em sala de crescimento.

Tabela 2. Modificações na anatomia foliar de plantas *in vitro* de bananeira, influenciadas pelo ambiente de cultivo (Natural e Artificial), sacarose (15 e 30 g.L⁻¹) e cultivares (Pacovan e Caipira), após 45 dias de enraizamento. UFLA, Lavras – MG, 2007.

Sacarose (g.L ⁻¹)	Hipoderme adaxial (µm)			Hipoderme abaxial (µm)			Densidade estomática adaxial		
	Ambiente		Média	Ambiente		Média	Ambiente		Média
	Natural	Artificial		Natural	Artificial		Natural	Artificial	
15	48,15 aB	75,60 aA	61,88 a	45,23*	44,78*	45,00 a	43,51*	37,40*	40,45 a
30	52,88 aA	56,63 bA	54,75 b	45,00*	47,48*	46,24 a	46,58*	37,69*	42,13 a
Média	50,51 B	66,11 A		45,11 A	46,13 A		45,04 A	37,54 B	

Cultivar	Ambiente		Média	Ambiente		Média	Ambiente		Média
	Natural	Artificial		Natural	Artificial		Natural	Artificial	
Caipira	46,80 bB	69,68 aA	58,24 a	46,58 aB	50,18 aA	48,38 a	35,55*	31,26*	33,41 b
Pacovan	54,23 aB	62,55 bA	58,39 a	43,65 aA	42,08 bA	42,86 b	54,53*	43,83*	49,18 a
Média	50,51 B	66,11 A		45,11 A	46,13 A		45,04 A	37,54 B	

Cultivar	Sacarose (g.L ⁻¹)		Média	Sacarose (g.L ⁻¹)		Média	Sacarose (g.L ⁻¹)		Média
	15	30		15	30		15	30	
Caipira	61,88*	54,60*	58,24 a	47,70*	49,05*	48,38 a	32,19*	34,63*	33,41 b
Pacovan	61,88*	54,90*	58,39 a	42,30*	43,43*	42,86 b	48,72*	49,64*	49,18 a
Média	61,88 A	54,75 B		45,00 A	46,24 A		40,45 A	42,13 A	
CV (%)	15,78			12,23			26,24		

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, dentro de cada variável, diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade. (* indica a ausência de interação dupla significativa).

Em relação à densidade estomática *adaxial*, número significativamente superior de estômatos por mm² foram obtidos em plantas submetidas ao ambiente natural e na cultivar Pacovan, diferentemente da sacarose que não influenciou nas respostas ($P < 0,05$) (Tabela 2). De acordo Castro (2002) e Kundu & Tigerstedt (1998), o incremento na densidade estomática pode permitir que a planta eleve a condutância de gases, evitando que a fotossíntese seja limitada sob diferentes condições de ambiente.

CONCLUSÕES

O enraizamento/alongamento *in vitro* de brotações de bananeira em ambiente de luz natural promove maior espessamento dos parênquimas clorofilianos e incremento na densidade estomática. Alterações benéficas na anatomia foliar decorrentes da redução na concentração de sacarose no meio MS são menos evidentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTRO, E. M. **Alterações anatômicas, fisiológicas e fitoquímicas em *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento.** 2002. 221 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DECETTI, S. F. C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L.** 2004. 93 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar. 2000. p.255-258.

HANBA, Y. T.; KOGAMI, H.; TERASHIMA, L. The effects of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 1021-1030, Aug. 2002.

JOHANSEN, B. A. **Plant microtechnique.** New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523 p.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine') **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** Dordrecht, v. 55, n. 2, p. 141-14, 1999.

KUNDU, S. K.; TIGERSTEDT, P. M. A. Variation in net photosynthesis, stomatal characteristics, leaf area and whole plant phytomass production among ten provenances of neem (*Azadirachta indica*). **Tree Physiology**, Victoria, v. 19, n. 1, p. 47-52, Jan. 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

ROCHA, H. S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira "Prata Anã": alterações morfoanatômicas.** 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Lavras, MG.

STANDAERT-DE-METSANAERE, R. E. A. Economic considerations. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation technology and application.** Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 131-140.

PALAVRAS-CHAVE

Musa spp; alterações anatômicas; luz natural; sacarose.