

## Efeitos da luz natural e sacarose na perda de água e anatomia foliar de plantas de bananeira, na fase de enraizamento/alongamento *in vitro*.<sup>1</sup>

Santos, Adriene Matos dos<sup>2</sup>; Costa, Frederico Henrique da Silva<sup>2</sup>; Pasqual, Moacir<sup>2</sup>; Castro, Evaristo Mauro de<sup>2</sup>; Pereira, Jonny Everson Scherwinski<sup>3</sup>; Miyata, Luzia Yuriko<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Lavras – UFLA, Departamento de Agricultura, Caixa Postal 37, CEP 37200-000, Lavras, MG. E-mail para contato: [fredericohenrique@yahoo.com.br](mailto:fredericohenrique@yahoo.com.br); <sup>3</sup> Pesquisador da Embrapa Acre, Caixa Postal 321, CEP 69908-970 Rio Branco-AC.

### INTRODUÇÃO

Apesar da importância das técnicas *in vitro* na produção de mudas com certificação genética e fitossanitária, ainda existem dificuldades em se obter elevadas taxas de sobrevivência em algumas espécies, além do que pouco se entende sobre os fatores associados à capacidade das plantas em superar a abrupta transferência *ex vitro*. Entre os principais fatores comumente reportados por ocasionar elevados índices de mortalidade estão a excessiva transpiração dos órgãos aéreos (Gangopadhyay et al., 2002), principalmente as folhas (Capellades et al., 1990). Em adição, a falta de diferenciação do mesófilo e o deficiente desenvolvimento dos tecidos fotossintetizantes são aspectos que também interferem após a retirada das plantas dos recipientes de cultivo (Romano & Martins-Loução, 2003; Sandoval et al., 1994).

Como consequência, estratégias vêm sendo estudadas e adotadas, entre as quais estão as reduções nos níveis exógenos de carboidratos e da umidade relativa no interior dos frascos (Mohammed & Vidaver, 1990) e o uso da luz natural (Kodym & Zapata-Arias, 1999; Rocha, 2005; Talavera et al., 2005). Destes, a luz é considerada um dos mais importantes, por influenciar decisivamente no desenvolvimento vegetal (Larcher, 2000), podendo induzir alterações, em sua maioria benéficas, na anatomia foliar, que contribuirão para a melhor adaptação das plantas ao ambiente externo. Assim, objetivou-se avaliar a perda de água e as modificações anatômicas de plantas micropropagadas de bananeira em diferentes condições de cultivo durante a fase de enraizamento/alongamento *in vitro*.

### MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal consistiu de brotações axilares de bananeira 'Caipira' (AAA), originadas da fase de multiplicação e mantidas a 16 horas de irradiância ( $42 \text{ W.m}^{-2}$ ) e  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Obtidas as brotações, estas foram transferidas para meio constituído pelos sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962),  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA (ácido naftalenoacético) e  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar, com pH 5,8, onde foram aplicados os tratamentos para enraizamento/alongamento. Os tratamentos consistiram de duas concentrações de sacarose ( $15$  e  $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) e dois ambientes de cultivo (sala de crescimento – artificial e casa de vegetação – natural), em esquema fatorial  $2 \times 2$ . Os cultivos 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 por lâmpadas fluorescentes tubulares (Osram 20 W, luz do dia especial), com irradiância média de  $42 \text{ W.m}^{-2}$ , 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  $26^\circ\text{C}/32^\circ\text{C}$ ;  $16^\circ\text{C}/16^\circ\text{C}$  e  $20^\circ\text{C}/23^\circ\text{C}$ ) e (irradiâncias máximas, mínimas e médias de  $93,95 \text{ W.m}^{-2}/199,69 \text{ W.m}^{-2}$ ;  $11,13 \text{ W.m}^{-2}/10,66 \text{ W.m}^{-2}$  e  $49,38 \text{ W.m}^{-2}/99,43 \text{ W.m}^{-2}$ ), 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

---

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

um sistema de registro (LI 1400; Li-cor.Neb), a intervalos de meia hora, enquanto os dados de temperatura foram obtidos com termo-higrógrafo.

A avaliação do conteúdo relativo de água (RCW) foi realizada pela exposição das plantas as condições de laboratório (cerca de 63% de U.R). Em intervalos de 10 minutos, durante 240 minutos, seis plantas de cada tratamento foram pesadas, em balança de alta precisão. Posteriormente, a massa seca das plantas foi determinada (50°C) e o RCW para cada tempo foi estimado por:  $RCW (\%) = [(FW_t - DW) / (FW_s - DW)] \times 100$ , sendo  $FW_t$  a massa fresca ao tempo t,  $FW_s$  a massa fresca inicial (tempo 0) e DW a massa seca (Romano & Martins-Loução, 2003). Para as avaliações anatômicas utilizou-se de seções transversais e paradérmicas (*adaxial* e *abaxial*), obtidas do terço médio da segunda folha expandida (direção ápice-base), que foram 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 empregado 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 utilizado no experimento de anatomia foi o inteiramente casualizado (DIC), com 10 e 12 repetições para as medições dos tecidos e contagem dos estômatos, cada uma representada pela média de duas observações. Já o ensaio do conteúdo relativo de água foi instalado em parcelas subdivididas no tempo, em DIC, com seis repetições por tratamento. 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

### Características anatômicas

Quanto a sacarose, diferenças significativas foram observadas apenas para a espessura do limbo foliar, com melhores resultados em meio contendo  $15 \text{ g.L}^{-1}$ . Já entre os ambientes de cultivo, foi verificado espessamento significativo de ambos os parênquimas, paliçádico e esponjoso, em plantas mantidas sob ambiente de luz natural, diferentemente da hipoderme *abaxial*, que teve maior espessura no ambiente artificial ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1). Resposta semelhante em relação à espessura do parênquima paliçádico com o aumento da irradiância foi anteriormente reportado por Hanba et al. (2002), em espécies de *Acer*.

**Tabela 1.** Características anatômicas de folhas de bananeira 'Caipira', influenciadas pelo ambiente de cultivo (Natural e Artificial) e sacarose ( $15$  e  $30 \text{ g.L}^{-1}$ ), após 45 dias de enraizamento *in vitro*. UFLA, Lavras – MG, 2007.

	Parênquima paliçádico ( $\mu\text{m}$ )	Parênquima esponjoso ( $\mu\text{m}$ )	Hipoderme <i>abaxial</i> ( $\mu\text{m}$ )	Densidade estomática <i>adaxial</i>	Limbo foliar ( $\mu\text{m}$ )
<b>Sac. (<math>\text{g.L}^{-1}</math>)</b>					
15	58,1 a	76,7 a	47,7 a	32,2 a	278,6 a
30	60,4 a	72,6 a	49,1 a	34,6 a	266,5 b
<b>Ambiente</b>					
Nat	67,3 a	82,4 a	46,6 b	35,6 a	272,7 a
Art	51,1 b	67,0 b	50,2 a	31,3 a	272,4 a
<b>CV (%)</b>	13,11	15,50	11,24	27,40	6,45

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

Para a hipoderme *adaxial*, maior espessura ( $P < 0,05$ ) foi verificada em plantas submetidas ao ambiente artificial, em ambas as concentrações de sacarose (Tabela 2). Corroborando os resultados reportados por Rocha (2005), segundo o qual maior espessura

das hipodermes *abaxial* e *adaxial* em plantas micropropagadas de bananeira 'Prata-Anã' foi obtida sob condições de luz artificial. Em relação à densidade estomática *abaxial*, aumento significativo foi observado somente em ambiente natural associado a 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, embora a média deste ambiente também tenha sido maior com 15 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 2). Aumento no número de estômatos por mm<sup>2</sup> em plantas expostas altas irradiâncias foram reportados para bananeira 'Prata-Anã' e plantas de *Annona glabra* (Decchetti, 2004; Rocha, 2005).

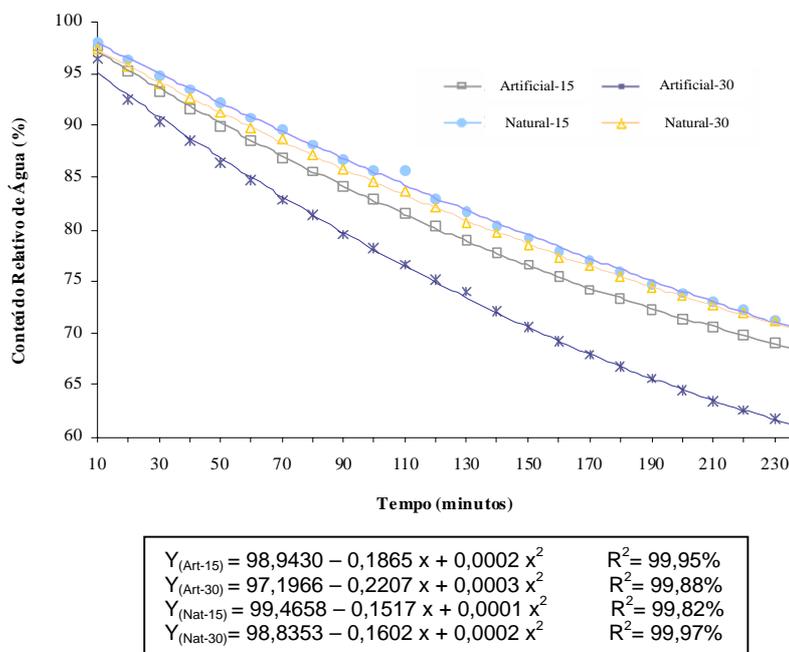
**Tabela 2.** Características anatômicas de folhas de bananeira 'Caipira', influenciadas pelo ambiente de cultivo (Natural e Artificial) e sacarose (15 e 30 g.L<sup>-1</sup>), após 45 dias de enraizamento *in vitro*. UFLA, Lavras – MG, 2007.

Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	Hipoderme adaxial (µm)		Média	Densidade estomática <i>abaxial</i>		Média
	Natural	Artificial		Natural	Artificial	
	15	44,1 Ba		79,7 Aa	61,9 a	
30	49,5 Ba	59,7 Ab	54,6 b	167,2 Aa	131,1 Bb	149,2 a
<b>Média</b>	46,8 B	69,7 A		162,6 A	140,9 B	
<b>CV (%)</b>		11,97			12,43	

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

### Conteúdo relativo de água (RCW)

Influência significativa dos três fatores estudados (ambiente x sacarose x tempo) foi observada. Verificou-se que plantas cultivadas em ambiente artificial perderam mais água (menor RCW) com o tempo de exposição do que aquelas cultivadas sob luz natural, sendo esta perda mais acentuada com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 1). Comportamento semelhante foi reportado por Decchetti (2004), em tecidos foliares de *Annona glabra* L., em que menor perda de água foi observada em plantas cultivadas *in vitro* sob elevada irradiância (300 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) em detrimento de níveis menores de irradiância. Já Sandoval et al. (1994) verificaram que plantas de bananeira 'Grande Naine' (AAA), cultivadas heterotroficamente *in vitro* sob 80 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, apresentavam cutícula fina, pequena deposição de cera e hipoderme extensa, com muito estômatos apresentando ostíolos parcialmente ou completamente fechados, indicando pouca ou nenhuma funcionalidade.



**Figura 1.** Conteúdo relativo de água em plantas micropropagadas de banana cv. Caipira (AAA), em resposta ao ambiente de cultivo (natural e artificial) e concentração de sacarose (15 e 30 g.L<sup>-1</sup>). UFLA, Lavras, MG, 2007.

## CONCLUSÃO

A utilização da luz natural, na fase de enraizamento *in vitro*, promove melhorias nas características anatômicas avaliadas e reduz a perda de água das plantas após sua retirada dos recipientes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAPELLADES, M.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosamultiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141-145, Jan. 1990.
- 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. **SISVAR 4. 3:** sistema de análise estatística. Lavras: UFLA;DEX, 2000. Software.
- GANGOPADHYAY, G.; DAS, S.; MITRA, S.K.; PODDAR, R.; MODAK, B.K.; MUKHERJEE, K.K. Enhanced rate of multiplication and rooting through the use of coir in aseptic liquid culture media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.68, p.301-310, 2002.
- 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.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531 p.
- MOHAMMED, G.H.; VIDAVER, W.E. The influence of acclimatization treatment and plantlet morphology on early greenhouse-performance of tissue-cultured Douglas fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.21, p.111-117, 1990.
- 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.
- ROMANO, A.; MARTINS-LOUÇÃO, M. A. Water Loss and Morphological Modifications in Leaves during Acclimatization of Cork Oak Micropropagated Plantlets. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 616, p. 439-442, 2003.
- SANDOVAL, J. A.; MÜLLER, L. E.; WEBERLING, F. Foliar morphology and anatomy of *Musa* cv. Grande Naine (AAA) plants grown *in vitro* and during hardening as compared to field-grown plants. **Fruits**, Paris, v. 49, n. 1, p. 37-46, Jan./Feb. 1994.
- TALAVERA, C.; CONTRERAS, F.; ESPADAS, F.; FUENTES, G.; SANTAMARÍA, J.M. Cultivating *in vitro* coconut palms (*Cocos nucifera*) under glasshouse conditions with natural light, improves *in vitro* photosynthesis nursery survival and growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 83, p. 287-292, 2005.

## PALAVRAS-CHAVE

*Musa* spp.; rustificação *in vitro*; características fisiológicas; alterações estruturais.