

Alterações anatômicas em plantas de bananeira 'Japira' (AAAB) cultivadas *in vitro* e durante a aclimatização.¹

Costa, Frederico Henrique da Silva²; Pasqual, Moacir²; Pereira, Jonny Everson Schervinski³; Castro, Evaristo Mauro de²; Oliveira, Cynthia de².

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

INTRODUÇÃO

O cultivo de ápices caulinares e meristemas utilizando técnicas de cultura de tecidos constitui a base da propagação clonal massal de bananas e plátanos. Todavia, estudos têm demonstrado que plantas cultivadas *in vitro*, normalmente, apresentam certas características morfoanatômicas e fisiológicas intrínsecas ao ambiente de cultivo, tais como reduzida deposição de cera epicuticular e diferenciação do mesofilo, além de feixes vasculares rudimentares e conexão vascular entre as raízes e parte aérea deficiente ou inexistente (Acuña, 1995; Romano & Martins-Loução, 2003; Sandoval et al., 1994). Todas estas alterações têm sido consideradas como resultado de complexas e peculiares condições do ambiente *in vitro*, que incluem reduzida intensidade luminosa, presença de uma fonte exógena de carbono prontamente disponível, baixa disponibilidade de CO₂, alta umidade relativa e reduzidas trocas gasosas (Preece & Sutter, 1991).

Entretanto, embora essas modificações perdurem até os primeiros dias da transferência para as condições *ex vitro*, as novas folhas desenvolvidas terão características de transição, sendo, portanto, mais adaptadas e eficientes nos processos concernentes ao desenvolvimento vegetal. Além disso, após serem transferidas para as condições de campo, normalmente, todas as alterações induzidas *in vitro* desaparecem (Sandoval et al., 1994). Nesse contexto, estudos acerca das modificações que ocorrem nas plantas micropropagadas, após sua exposição às condições *ex vitro*, têm contribuído significativamente para o desenvolvimento de técnicas mais eficientes de aclimatização (Gonçalvez et al., 2000).

Assim, objetivou-se estudar as alterações na anatomia foliar em plantas micropropagadas de bananeira cultivadas *in vitro* e durante a aclimatização.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal consistiu de plantas micropropagadas de bananeira da cultivar Japira (AAAB), um híbrido resistente às principais doenças que acometem a cultura da banana. Para a obtenção das plantas, brotações axilares oriundas da fase de multiplicação foram enraizadas/alongadas em meio básico de MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionado de 1 mg.L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) e 6 g.L⁻¹ de agar, a pH 5,8. O cultivo foi feito em frascos de 250 mL contendo 40 mL de meio e selados com filme transparente, os quais foram mantidos à 25 ± 2°C e 16 horas de irradiância (42 W.m⁻²), fornecida por meio lâmpadas fluorescentes tubulares do tipo luz do dia especial (Osram 20W), por 35 dias.

A aclimatização foi realizada em tubetes de 0,3 L, sob condições de casa de vegetação, coberta com filme de polietileno transparente (150 microns), sombreamento de 70% (Sombrence[®]) e sistema de irrigação por nebulização intermitente. Como substrato base foi utilizada a mistura de terra de subsolo (abaixo de 40 cm):Plantmax[®] HT:casca de arroz carbonizada (1:1:1 v/v), acrescido de 50.g L⁻¹ de húmus e 20 g.L⁻¹ de super simples.

Os tratamentos foram constituídos por plantas sob diferentes períodos de aclimatização (0, 21, 42, 63, 84 e 120 dias após a transferência *ex vitro*). As avaliações consistiram de características anatômicas, obtidas por meio de observações de microscopia

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).

de luz de seções transversais (folha e raiz) e paradérmicas foliares, obtidas em micrótomo de mesa manual e à mão livre, com auxílio de lâmina de aço inox (Gillette®).

Para isso, foram utilizadas cinco plantas por tratamento, as quais foram previamente fixadas em FAA 70 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico) (Johansen, 1940), por 72 horas e, posteriormente, conservadas em álcool etílico 70%, até a realização dos cortes. Para as seções transversais, utilizou-se o azul de astra-safranina, sendo as medições dos tecidos realizadas em microscópio Ken-a-vision 2100, equipado com ocular micrométrica e objetiva de 40X, com três medições em cada folha, na região após o terceiro feixe lateral, totalizando 15 repetições para cada tratamento, exceto para a espessura da nervura (saliência). Já os cortes paradérmicos foram realizados no terço médio foliar, em ambas as faces das folhas, sendo a coloração feita com safranina 1% e as observações estomáticas realizadas em microscópio Olympus CBB (objetiva de 40X), com auxílio de câmara clara, segundo metodologia descrita por Labouriau *et al.* (1961), em quatro campos da região mediana de 5 folhas provenientes de 5 plantas distintas, num total de 20 campos/repetições por tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa estatístico Sisvar 4.3 (Ferreira, 2000), sendo as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação às epidermes, menor espessura para a epiderme da *face adaxial* foi observada em plantas provenientes do cultivo *in vitro* (0 dias). Após este período, houve espessamento significativo até os 42 dias de aclimatização, período em que se constatou maior espessamento (23,2 μm). Por outro lado, a espessura da epiderme da *face abaxial* mostrou-se menos influenciada pelo período de aclimatização, uma vez que diferenças significativas apenas foram notadas entre plantas *in vitro* e as demais (21, 42, 63, 84 e 120 dias) (Tabela 1). Esses resultados discordam dos obtidos por Pereira (2004), em plantas micropropagadas de *Uncaria guianensis*, em que nenhuma diferença foi verificada para a espessura da epiderme da *face abaxial* com o tempo de aclimatização. Já em relação à espécie *Uncaria tomentosa*, a espessura da epiderme *abaxial* foi significativamente influenciada.

Tabela 1. Espessura da epiderme das faces adaxial (EP/AD) e abaxial (EP/AB), parênquima paliçádico (P.PAL) e esponjoso (P.ESP), hipoderme da face adaxial (HIP/AD) e abaxial (HIP/AB) e da nervura na região central (SALI) de plantas micropropagadas de bananeira cv. Japira (AAAB) sob a influência do período de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Período (dias)	EP/AD	EP/AB	P.PAL	P.ESP	HIP/AD	HIP/AB	SALI
	----- (μm) -----						
0	15,9 d	11,3 b	39,0 e	65,3 d	50,4 c	50,9 d	428,2 f
21	19,4 c	15,0 a	66,0 d	75,5 c	83,0 a	68,5 b	539,5 e
42	23,2 a	15,3 a	70,2 d	75,2 c	87,8 a	60,6 c	600,9 d
63	22,2 b	16,6 a	75,7 c	94,2 b	79,2 b	74,1 a	684,3 c
84	21,6 b	16,2 a	96,5 a	108,0 a	75,7 b	75,2 a	890,1 a
120	21,9 b	16,0 a	87,3 b	103,7 a	76,5 b	64,5 b	834,6 b
CV (%)	7,61	13,69	12,69	10,99	13,09	11,81	9,23

Médias seguidas por letras distintas dentro de cada variável avaliada, diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

Foi observado, ainda que, em geral, a epiderme da *face adaxial* sempre apresentou maior espessura em relação à epiderme da *face abaxial* (Tabela 1), conforme reportado em plantas micropropagadas de *Uncaria guianensis* e *U. tomentosa* (Pereira, 2004).

Quanto aos parênquimas paliçádico e esponjoso, verificou-se tendência de incremento da espessura com o tempo de aclimatização, tendo a menor e a maior espessuras sido observadas em plantas *in vitro* (39,0 e 65,3 μm) e aclimatizadas por 84 dias (96,5 e 108,0 μm). Comportamento semelhante ao verificado para o espessamento dos parênquimas foi notado para a espessura da saliência (nervura central) (Tabela 1). A

ocorrência de células paliçádicas mais alongadas constitui um padrão clássico de resposta e de adaptação das plantas à alta intensidade de luz (Lee et al., 2000) e evidencia a plasticidade adaptativa da planta ao novo ambiente.

Espessamento dos parênquimas paliçádico e esponjoso com o período de aclimatização foi reportado por Pereira (2004), em espécies micropropagadas pertencentes ao gênero *Uncaria*. Estes resultados concordam com os de Romano & Martins-Loução (2003), segundo os quais, maior diferenciação do mesófilo em folhas de *Quercus suber* L. foi verificada naquelas desenvolvidas após a transferência das plantas para o substrato, as quais apresentaram estrutura foliar característica de plantas de sol, com pequenos espaços intercelulares, alta densidade de células paliçádicas, com 2 ou 3 camadas.

Para a hipoderme, verificou-se que, em relação à face adaxial, houve incremento da espessura deste tecido até os 42 dias de aclimatização, período em que foi registrado o maior espessamento ($P < 0,05$). Períodos superiores a este mostraram tendência de redução no espessamento e nenhuma diferença significativa foi observada. Já em relação à hipoderme abaxial, espessamento significativo ocorreu em plantas aclimatizadas por 63 e 84 dias, tendo as folhas *in vitro* apresentado a menor espessura ($P < 0,05$). Acrescenta-se, ainda, que, de modo geral, as análises anatômicas revelaram que supostas folhas de transição (21 dias) e aquelas oriundas de plantas aos 42 dias tiveram pouca ou nenhuma diferença, quando comparadas às plantas *in vitro*, como observado para os parênquimas clorofilianos e hipoderme adaxial (Tabela 1). Modificações na espessura e organização da anatomia foliar foram também reportadas por Sandoval et al. (1994) em plantas micropropagadas de bananeira sob diferentes etapas (*in vitro*, aclimatizadas e em campo).

Em relação aos estômatos, maior densidade estomática da face adaxial da epiderme (D. EST/AD) foi observada aos 0, 21 e 42 dias, os quais não diferiram entre si, porém, foram superiores aos 63, 84 e 120 dias ($P < 0,05$). Para a epiderme da face abaxial, maior número de estômatos por mm^{-2} (D. EST/AB) também foi observado nas plantas *in vitro* ($P < 0,05$). Por outro lado, os demais períodos foram significativamente semelhantes entre si (Tabela 2). Respostas semelhantes quanto à densidade de estômatos em plantas micropropagadas foram verificadas por Lee et al. (1988) e Pereira (2004).

Tabela 2. Densidade estomática (número de estômatos por mm^2) da epiderme das faces adaxial (D. EST/AD) e abaxial (D. EST/AB) de plantas micropropagadas de bananeira cv. Japira (AAAB) sob a influência do período de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Período (dias)	D. EST/AD	D. EST/AB
0	27,6 a	106,6 a
21	22,1 a	82,1 b
42	22,7 a	88,8 b
63	15,9 b	74,1 b
84	14,7 b	84,5 b
120	14,7 b	90,7 b
CV (%)	40,98	15,84

Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada variável avaliada, diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

CONCLUSÕES

Alterações significativas na anatomia foliar de plantas micropropagadas de bananeira 'Japira' são induzidas durante o processo de aclimatização, com maiores modificações em relação aos parênquimas clorofilianos, a hipoderme e densidade de estômatos. A aclimatização de plantas micropropagadas de bananeira cv. Japira, sob as condições deste trabalho, é obtida a partir de 63 dias em casa de vegetação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, P. I. Micropropagación de banana a partir de ápices vegetativos. *Corbana*, v. 17, p. 9-12, 1995.

- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA;DEX, 2000. Software.
- GONÇALVEZ, J. C.; DIOGO, G.; COELHO, M. T. Changes in leaf morphology and anatomy of *in vitro*-cultured chestnut plantlets during acclimatization. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 520, p. 183-193, 2000.
- JOHANSEN, B. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523 p.
- KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.
- LABOURIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADOLABOURIAU, M. L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 237-257, jun. 1961.
- LEE, N.; WESZTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro*-and *in vivo* developed sweetgum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 1, p. 167-171, Jan. 1988.
- LEE, D. W. et al. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast asian *Hopea* (Dipeterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 87, n. 4, p. 447-455, Apr. 2000.
- 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.
- PEREIRA, R. de C. A. **Anatomia foliar comparada de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. e *Uncaria tomentosa* (Willdenow Ex Roemerr & Schultes) como subsídio ao estudo de micropropagação *in vitro***. 2004. 133 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation technology and applications**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 71-93.
- 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.

PALAVRAS-CHAVE

Musa spp., cultivo *in vitro*, anatomia, endurecimento *ex vitro*.