

## Características estomáticas em folhas formadas *in vitro*, folhas persistentes e aclimatizadas de bananeira 'Preciosa' (AAAB).<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>; Santos, Dalíllia Nazaré<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

No processo de micropropagação de plantas, a etapa de aclimatização é, na maioria das vezes, considera limitante e pode ocasionar elevado índice de perdas. Isso porque a transferência abrupta das plantas de um local com condições controladas (*in vitro*) para casa de vegetação ou telados pode provocar acentuada transpiração, principalmente dos órgãos aéreos, o que tem sido atribuído as alterações anatômicas e fisiológicas induzidas pelas condições peculiares dos recipientes de cultivo. Além disso, as folhas e raízes formadas *in vitro* são consideradas pouco funcionais, não garantindo uma satisfatória taxa fotossintética e absorção de água e nutrientes. Portanto, torna-se imprescindível submeter às plantas micropropagadas a gradual aclimatização, anteriormente o trasplante para o campo, pois os novos órgãos formados terão essas alterações corrigidas.

De acordo com Sandoval et al. (1994), embora as modificações induzidas *in vitro* perdurem até os primeiros dias após a transferência das plantas para as condições *ex vitro*, as novas folhas desenvolvidas apresentarão características de transição, sendo, portanto, mais adaptadas e eficientes nos processos concernentes ao crescimento e desenvolvimento vegetal. Adicionalmente, após serem submetidas às condições de campo, normalmente todas as alterações decorrentes do ambiente *in vitro* desaparecem plenamente, completando desta forma o seu desenvolvimento.

Nesse contexto, os estômatos têm grande influência na adaptação das plantas após sua remoção dos recipientes de cultivo, já que estarão presentes em maior ou menor densidade, além de serem mais ou menos funcionais, dependendo da espécie e condições do ambiente de cultivo (Khan et al., 2002). Ainda segundo estes autores, a forma elíptica é característica de estômatos funcionais e a forma arredondada está associada a estômatos que não apresentam funcionalidade normal.

Objetivou-se avaliar as alterações nas características estomáticas em diferentes tipos de folhas de plantas micropropagadas de bananeira cultivar Preciosa (AAAB).

### MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal foi constituído de plantas micropropagadas de bananeira 'Preciosa' (AAAB) (altura média de 5,26 cm), originadas do enraizamento/alongamento *in vitro* de brotações axilares em basal de MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético) e 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar, com pH 5.8. O cultivo foi realizado em frascos de 250 mL contendo 40 mL de meio, cinco brotações e selados com filme transparente, permanecendo por 24 dias à temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 42 W.m<sup>-2</sup>, por lâmpadas fluorescentes tubulares (Osram 20 W, luz do dia especial).

Os tratamentos consistiram de seis tipos de folhas: T1) folhas de plantas *in vitro* ao final da fase de enraizamento; T2) folhas persistentes de plantas com um mês de aclimatização; T3) novas folhas formadas *ex vitro* de plantas com um mês de aclimatização (folhas de transição); T4) folhas de transição submetidas a mais 30 dias de aclimatização; T5) novas folhas de plantas com 60 dias de aclimatização e T6) folhas de plantas com 120

---

<sup>1</sup> 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).

dias de aclimatização. Para pleno controle das folhas dos tratamentos (T2) e (T4) efetuou-se marcação com fitilho de cores distintas.

Para a aclimatização, as plantas foram inicialmente removidas dos frascos, submetidas à lavagem de suas raízes e transferidas para tubetes de 0,3 L preenchidos pela 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<sup>-1</sup> de húmus e 20 g.L<sup>-1</sup> de super simples. Em seguida, foram mantidas sob condições de casa de vegetação, coberta por filme de polietileno transparente (150 microns), sombreamento de 70% e sistema de nebulização intermitente. Já as plantas do último tratamento (T6) foram transferidas para casa de vegetação desprovida de sombreamento, após 60 dias, sendo irrigadas manualmente conforme as necessidades.

As avaliações anatômicas foram conduzidas em seções paradérmicas, das faces *adaxial* e *abaxial* da epiderme, feitas à mão livre na região 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). A clarificação dos cortes foi realizada em solução de hipoclorito de sódio (50% v/v), sendo em seguida lavados em água destilada, coradas com safranina (1%) e montadas em água glicerínada. As observações foram conduzidas em microscópio Olympus CBB, seguindo a técnica descrita por Laboriau et al. (1961). As variáveis analisadas foram: densidade estomática (nº de estômatos por mm<sup>2</sup>), diâmetro polar (DP) e equatorial (DE), relação DP/DE, número de células epidérmicas e índice estomático. Nas avaliações de densidade e índice estomático foram utilizadas 5 folhas, efetuando-se 4 observações por repetição, num total de 20 observações/tratamento. Para a medição do diâmetro polar e equatorial, utilizou-se microscópio KEN-A-VISION 2100, equipado com uma ocular micrométrica e objetiva de 40X, em 6 folhas com 4 medições por repetição, num total de 24 medições/tratamento.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC). A análise de variância dos dados foi efetuada por meio do programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000) e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Maiores densidades estomáticas de ambas as faces da epiderme foram observadas em folhas de plantas ao final do enraizamento *in vitro* (T1) e folhas persistentes (T2), que embora não tenham diferido entre si, foram superiores as folhas formadas *ex vitro* (T3, T4, T5 e T6) ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, nenhuma diferença significativa entre folhas formadas *in vitro* e *ex vitro* foi verificada para o índice estomático, em ambas as faces da epiderme. Já quanto ao número de células epidérmicas, resultados significativamente superiores foram constatados em folhas de plantas ao final do enraizamento *in vitro* (T1) e folhas persistentes (T2) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Densidade estomática (nº estômatos.mm<sup>-2</sup>), índice estomático e número de células epidérmicas das faces *abaxial* e *adaxial* em diferentes tipos de folhas de plantas de bananeira micropropagadas. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Tratamentos	Abaxial			Adaxial		
	Densidade estomática	Índice estomático	Nº de células	Densidade estomática	Índice estomático	Nº de células
T1	102,12 a	8,18 a	1147,74 a	28,68 a	3,42 a	796,98 a
T2	97,68 a	7,59 a	1197,32 a	32,56 a	3,96 a	789,58 a
T3	82,88 b	8,64 a	876,16 b	17,02 b	3,04 a	535,76 c
T4	87,32 b	8,17 a	983,46 b	19,98 b	3,14 a	602,36 c
T5	72,52 b	9,17 a	710,40 c	14,06 b	3,02 a	452,14 d
T6	86,58 b	9,15 a	861,36 b	19,98 b	2,81 a	691,16 b
C.V. (%)	13,79	11,42	10,35	33,17	27,77	8,33

Médias seguidas por letras distintas dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade. (C.V.=coeficiente de variação).

Resposta semelhante para a densidade estomática de folhas formadas em ambiente *in vitro* tem sido reportada em outros estudos e relacionada, principalmente, a elevada umidade relativa do ar no interior dos frascos (Decchetti, 2004; Khan et al., 2003; Sciutti & Morini, 1995). Já em relação às folhas desenvolvidas *ex vitro*, Capellades et al. (1990) afirmam que o período de aclimatização *ex vitro* permite a redução na densidade de estômatos, altera o formato e a topografia destes, além de favorecer o desenvolvimento do mesofilo. Nesse contexto, acrescenta-se ainda que, segundo afirmações de Braga (2006), as células epidérmicas, bem como as dos demais tecidos foliares, apresentam alta taxa de crescimento e divisão celular durante a fase de aclimatização, acarretando inclusive no decréscimo do número de estômatos por mm<sup>2</sup>.

Quanto ao tamanho dos estômatos, maior diâmetro polar da face *abaxial* foi observado em folhas de plantas com 60 dias, enquanto menor diâmetro equatorial ocorreu nas folhas formadas na fase de enraizamento *in vitro* (T1) e aquelas oriundas de plantas com 120 dias de aclimatização. Já para a relação diâmetro polar/equatorial, resultados significativamente superiores foram observados em folhas provenientes do enraizamento *in vitro* (T1) e plantas aclimatizadas por 60 e 120 dias (Tabela 2).

Para a face *adaxial*, as folhas de plantas aclimatizadas por 60 e 120 dias apresentaram diâmetro polar significativamente superior, enquanto que menores dimensões para o diâmetro equatorial ocorreram em folhas advindas do enraizamento *in vitro* (T1), folhas persistentes (T2), folhas de transição submetidas a mais 30 dias de aclimatização (T4) e novas folhas de plantas aclimatizadas por 60 dias (T5), as quais não diferiram entre si ( $P < 0,05$ ). Para a relação DP/DE, folhas de plantas aclimatizadas por 60 dias (T5) apresentaram relação DP/DE significativamente maior, seguido de folhas de plantas ao final do enraizamento *in vitro* (T1) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Diâmetro equatorial (DE) e polar (DP) e relação DP/DE das faces abaxial e adaxial em diferentes tipos de folhas de plantas de bananeira micropropagadas. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Tratamentos	Abaxial			Adaxial		
	DP (µm)	DE (µm)	DP/DE	DP (µm)	DE (µm)	DP/DE
T1	34,67 b	20,63 b	1,69 a	34,73 b	18,86 b	1,84 b
T2	32,94 b	21,68 a	1,54 b	34,63 b	20,25 b	1,71 c
T3	33,64 b	23,46 a	1,43 b	35,12 b	21,54 a	1,63 c
T4	32,94 b	22,37 a	1,47 b	34,52 b	20,61 b	1,68 c
T5	39,64 a	22,52 a	1,77 a	39,71 a	19,84 b	2,01 a
T6	34,84 b	20,08 b	1,74 a	39,13 a	22,63 a	1,73 c
<b>C.V. (%)</b>	4,85	7,99	7,75	6,46	5,83	7,41

Médias seguidas por letras distintas dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade. (C.V.=coeficiente de variação).

Modificações na anatomia e morfologia de estômatos em plantas micropropagadas têm sido reportadas. Nesse sentido, Sandoval et al. (1994) estudando a anatomia e morfologia foliar de plantas de bananeira 'Grande Naine' cultivadas *in vitro*, aclimatizadas e sob condições de campo, observaram que estômatos formados *in vitro* tiveram diâmetro polar e equatorial de 38 µm e 15 µm, enquanto que folhas de plantas adultas tiveram 27 µm e 17 µm. Já Golçalves et al. (2000) verificaram que plantas de castanheira (*Castanea sativa* x *C. crenata*) cultivadas *in vitro* apresentaram estômatos esféricos, elevados, com células guardas irregulares e consistentemente abertos. Por outro lado, as novas folhas formadas na aclimatização tiveram estômatos com uma morfologia mais normal, deprimidos, quase fechados e apresentando forma gradualmente elíptica com células guardas e subsidiárias bem diferenciadas. De acordo com Capellades et al. (1990) o desenvolvimento e frequência estomática podem ser afetados pelas condições ambientais assim como disponibilidade de água, níveis de irradiância, temperatura e umidade relativa do ar.

Já a relação DP/DE, juntamente com o formato das células guarda, são tidos por alguns autores (Khan et al., 2002; Rocha, 2005) como sendo importantes para indicar sobre a funcionalidade dos estômatos, uma vez que a forma elíptica (> DP/DE) é característica de

estômatos funcionais, ao passo que a forma arredondada está associada a estômatos poucos funcionais.

## CONCLUSÕES

Variações anatômicas significativas são mais evidentes em novas folhas formadas após a transferência *ex vitro*, principalmente quanto à densidade de estômatos e número de células epidérmicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAGA, F.T. **Ambiente de cultivo na propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Rage): características anatômicas e fisiológicas.** 2006. 119p. :il. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal), Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- DECETTI, S.F.C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L.** 2004. 93p. :il. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal), Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4. 3:** sistema de análise estatística. Lavras: UFLA;DEX, 2000. Software.
- GONÇALVES, 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.
- KHAN, P.S.S.V. et al. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dodrecht, v.71, p.141-146, 2002.
- KHAN, S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, O. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia plantarum**, Copenhagen, v. 46, n. 2, p. 161-166, 2003.
- 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.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497,1962.
- ROCHA, H.S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira “Prata Anã”: alterações morfoanatômicas.** 2005. 98p. :il. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- 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.
- SCIUTTI, R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.10, n.2, p.221-228, 1995.

## PALAVRAS-CHAVE

*Musa* spp.; anatomia foliar; micropropagação; estômatos.