

## Relação entre o conteúdo relativo de água, densidade estomática e formação de cera epicuticular em folhas de plantas micropropagadas de bananeira.<sup>1</sup>

Costa, Frederico Henrique da Silva<sup>2</sup>; Pasqual, Moacir<sup>2</sup>; Santos, Adriene Matos dos<sup>2</sup>; Castro, Evaristo Mauro de<sup>2</sup>; Pereira, Jonny Everson Scherwinski<sup>3</sup>; Pio, Leila Aparecida<sup>2</sup>; Costa, Larissa Correa do Bomfim<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, a realização de uma fase de aclimatização *ex vitro* logo após a remoção das plantas dos recipientes de cultivo tem sido considerada imprescindível para o pleno sucesso desta técnica. Isso porque durante este período de adaptação, as anormalidades morfológicas e/ou fisiológicas induzidas durante o crescimento *in vitro* são parcialmente ou completamente corrigidas.

Entre as alterações geralmente observadas, a falta ou reduzida produção de cera epicuticular em associação com a baixa regulação estomática são os principais fatores reportados como responsáveis pela alta mortalidade das plantas micropropagadas, já que possuem importante papel regulatório sobre a excessiva transpiração das plantas (Cappelades et al., 1990; Romano & Martins-Loução, 2003). Diante desse contexto e devido aos poucos estudos a esse respeito, objetivou-se avaliar as respostas de diferentes tipos de folhas quanto à perda de água e sua relação com os estômatos e formação de cera epicuticular em plantas de bananeira micropropagadas.

### MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal foi constituído de plantas micropropagadas de bananeira 'Preciosa' (AAAB) (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. As culturas foram mantidas em frascos de 250 mL, selados com filme transparente e expostos à 25±2 °C e 16 horas de irradiância (42 W.m<sup>-2</sup>), fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares (Osram 20 W, luz do dia especial), por 24 dias.

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 dias de aclimatização. Para pleno controle das folhas dos tratamentos (T2) e (T4) efetuou-se marcação com fitilho de cores distintas. Quanto 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:Plantmax<sup>®</sup> 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 e, posteriormente 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.

A avaliação do conteúdo relativo de água (RCW) foi realizada pela exposição das plantas as condições de laboratório (cerca de 63% de umidade relativa). Em intervalos de 10 minutos, durante 240 minutos, doze plantas de cada tratamento foram pesadas, em balança de alta precisão. Posteriormente, a massa seca das plantas foi determinada por secagem

---

<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).

em estufa (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). Já a avaliação da densidade estomática das faces *abaxial* e *adaxial* foi conduzida em microscópio Olympus CBB (objetiva de 40X), com auxílio de câmara clara, em quatro campos de seções paradérmicas da região do terço médio de cinco folhas/tratamento, num total de 20 observações/tratamento, sendo cada repetição representada pela média de quatro observações. As seções paradérmicas foram obtidas à mão livre de folhas completamente expandidas (segunda folha direção ápice-base), previamente fixadas em FAA 70 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico) (Johansen 1940) por 72 horas e conservadas em álcool etílico 70% (v/v). Quanto à preparação, as seções foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio (50% v/v), seguida de lavagem em água destilada, coloração com safranina 1% e montagem em água glicerínada.

Para as observações de microscopia eletrônica de varredura, segmentos foliares excisados do terço médio de folhas recém coletadas foram inicialmente montados em suportes de alumínio *stubs* com fita de carbono e, em seguida transferidos para dessecador. Posteriormente, as amostras foram cobertas com ouro no evaporador Balzers SCD 050 para observação em microscópio LEO EVO 40 sob 20Kv e distância de trabalho de 16 mm. Para o experimento de anatomia utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 5 repetições, enquanto o ensaio do RCW foi instalado em parcelas subdivididas no tempo, em DIC, com seis repetições (média de duas folhas). A análise dos dados foi feita com o software Sisvar (Ferreira, 2000) por meio de regressão e 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) ( $P < 0,05$ ). Resultados que estão em concordância com trabalhos realizados anteriormente, nos quais elevada densidade estomática é relatada para folhas formadas em ambiente *in vitro* comparada as folhas desenvolvidas na aclimatização ou em campo, o que é atribuído, principalmente, a elevada umidade relativa do ar no interior dos frascos e baixa irradiância (Capellades et al., 1990; Sandoval et al., 1994; Sciutti & Morini, 1995).

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

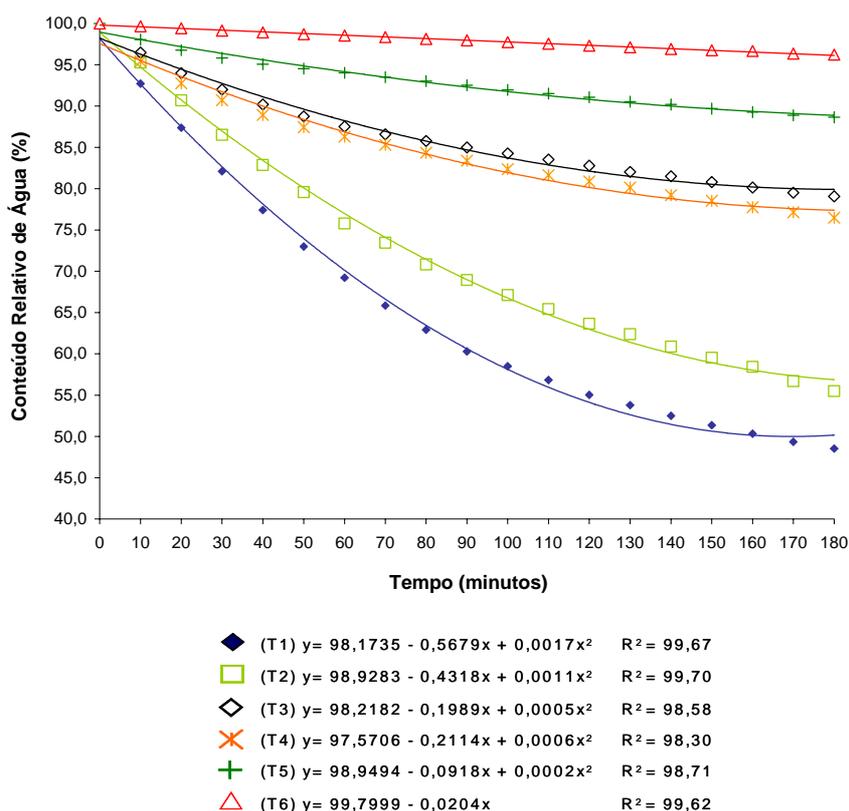
Tratamentos	Epiderme abaxial	Epiderme adaxial
T1	102,12 a	28,68 a
T2	97,68 a	32,56 a
T3	82,88 b	17,02 b
T4	87,32 b	19,98 b
T5	72,52 b	14,06 b
T6	86,58 b	19,98 b
C.V. (%)	13,79	33,17

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).

Os resultados para o conteúdo relativo de água demonstraram uma considerável influência dos diferentes tipos de folhas. De fato, acetuanda perda de água com o tempo de exposição às condições de laboratório foi observada em folhas oriundas da fase final de enraizamento *in vitro* (T1) e folhas persistentes (T2) ( $P < 0,05$ ) quando comparadas aos tratamentos 3 e 4 e, estes em relação as folhas provenientes de plantas com 60 (T5) e 120 dias (T6) de aclimatização (Figura 1) ( $P < 0,05$ ), o que é confirmado quando se observam os valores médios do RCW, que foram de 65,64% e 72,29% (T1 e T2), 86,31% e 84,67% (T3 e T4), 92,90% (T5) e 97,97% (T6) (dados não mostrados). É provável que, uma maior funcionalidade e menor densidade dos estômatos das folhas desenvolvidas *ex vitro* associada à formação de cera epicuticular, observada principalmente na face *abaxial* (Figura

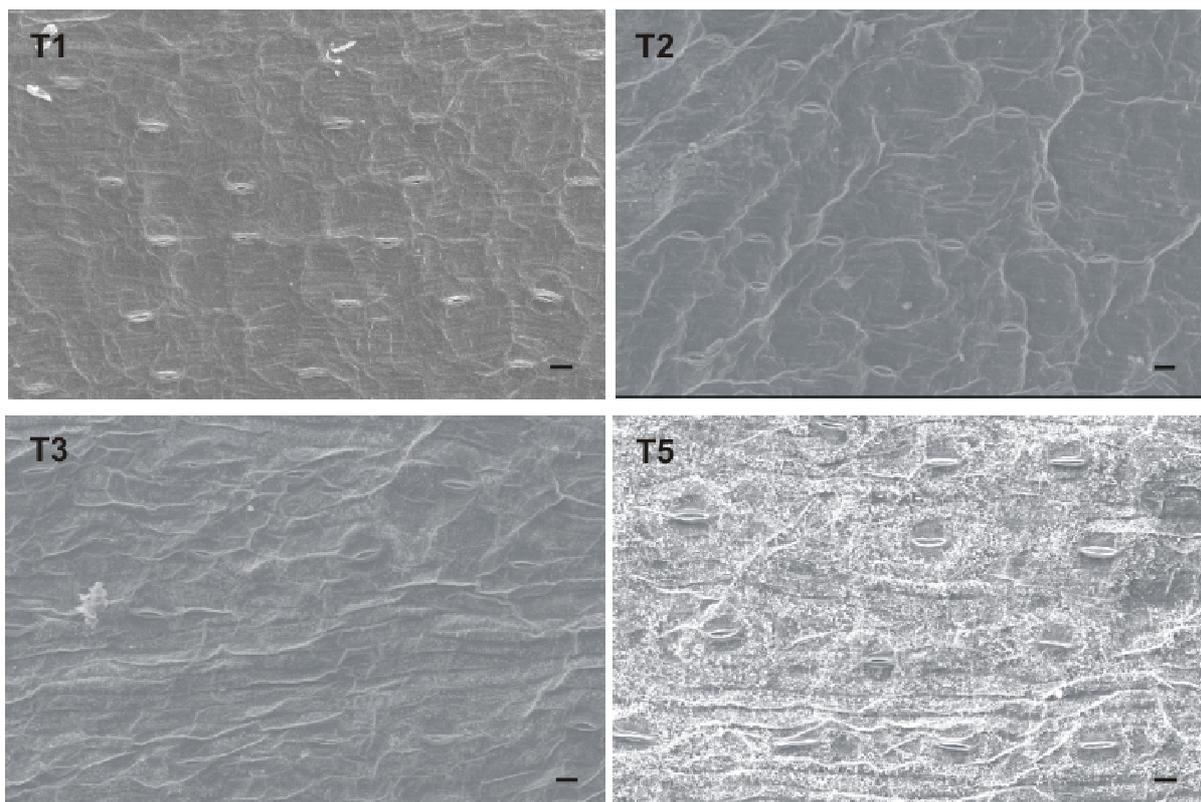
2), expliquem as reduzidas dessecações registradas (maior RCW) nos tratamentos T3 e T4 e, mais ainda no T5 e T6, durante os momentos iniciais após a retirada das plantas dos recipientes de cultivo, fato que é notável nas curvas referentes a cada tratamento (Figura 1). As observações por microscopia eletrônica (Figura 2) demonstraram ausência de cera epicuticular em folhas *in vitro* e persistentes (T1 e T2), enquanto que folhas formadas *ex vitro* (T3) mostraram formação de cera, fato mais evidente com a aclimatização (T5), concordando em parte com Sandoval et al. (1994), que evidenciaram apenas pouca quantidade de cera epicuticular em folhas de bananeira 'Grande Naine' *in vitro*, diferentemente das novas folhas formadas *ex vitro*, sobre as quais a camada de cera se tornou gradualmente espessa e melhor distribuída. Observações realizadas por Sciutti & Morini (1995) reportam a formação de cera epicuticular e falta de regulação estomática como causas da excessiva perda de água em plantas *in vitro*, neste caso com ameixeira.

Reduzido RCW em tecidos foliares de plantas *in vitro* foi observada por Romano & Martins-Loução (2003) durante a aclimatização de carvalho, com perda de água em torno de 53% nos primeiros 30 minutos, enquanto que as novas folhas após um mês de aclimatização perderam somente 14%, comparada a 29% de folhas velhas de plantas com um mês de aclimatização (folhas persistentes). Em adição, foi ainda observado que, ao final do período de desidratação, folhas oriundas do cultivo *in vitro* apresentaram estômatos abertos e colapso das células-guarda, fato não verificado em folhas de plantas aclimatizadas, pois estas se encontravam com os estômatos fechados, indicando funcionalidade dos mesmos.



**Figura 1.** Conteúdo relativo de água (CRW) em diferentes folhas de bananeira micropropagadas. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Os resultados aqui obtidos fornecem pelo menos algumas características capazes de explicar o comportamento observado pela súbita exposição *ex vitro* das plantas cultivadas *in vitro* em ambiente heterotrófico, tais como a rápida dessecação e senescência foliar, reduzido crescimento nos primeiros dias após a transferência e conseqüentemente obtenção de perdas.



**Figura 2.** Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura mostrando a formação de cera epicuticular na face abaxial de diferentes folhas de bananeira micropropagadas. Escala da barra: 20  $\mu\text{m}$  (600X). UFLA, Lavras, MG, 2007.

## CONCLUSÃO

A redução na densidade estomática e o incremento na formação de cera epicuticular em novas folhas formadas *ex vitro* possuem efeito regulatório sobre a excessiva perda de água das plantas micropropagadas de bananeira.

## 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.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4. 3**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA;DEX, 2000. Software.
- JOHANSEN, B. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523 p.
- 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.
- ROMANO, A.; MARTINS-LOUÇÃO, M.A. Water loss and morphological modifications in leaves during acclimatization of Cork Oak micropropagated plantlets. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 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.
- 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.; cultivo heterotrófico; perda de água; anatomia; cerosidade.