

MODIFICAÇÕES NA ANATOMIA FOLIAR DE BANANEIRAS

DURANTE O PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO

Frederico Henrique da Silva Costa, Moacir Pasqual, Adriene Matos dos Santos, Evaristo Mauro de Castro e Jonny Everson Scherwinski-Pereira

RESUMO

O estudo e compreensão das alterações decorrentes do processo de micropropagação constituem caminhos interessantes para o aprimoramento desta tecnologia. O objetivo deste trabalho foi avaliar modificações anatômicas em folhas de bananeira (*Musa spp.*) durante o processo de adaptação das plantas micropropagadas às condições *ex vitro*. Brotações axilares assépticas da cv. Preciosa (AAAB) foram enraizadas em meio MS, adicionado de ANA (1mg·l⁻¹) e ágar (6g·l⁻¹) por 24 dias, e aclimatizadas por 120 dias. Os tratamentos consistiram de folhas em diferentes estádios de desenvolvimento: T1 - folhas de plantas ao final da fase de enraizamento *in vitro*, T2 - folhas persistentes de plantas aos 30 dias de aclimatização, T3 - novas folhas de plantas

aos 30 dias de aclimatização (folhas de transição), T4 - folhas de transição de plantas aclimatizadas por 60 dias, T5 - novas folhas de plantas aclimatizadas por 60 dias, e T6 - novas folhas de plantas aclimatizadas por 120 dias. Maior grau de diferenciação e, portanto melhor adaptação ocorre em folhas provenientes de primórdios foliares diferenciados em condição *ex vitro*. A fase de aclimatização é imprescindível para o maior espessamento e diferenciação dos parênquimas clorofilianos e para corrigir as modificações desenvolvidas nas plantas *in vitro*. O estudo sobre a anatomia foliar possibilita uma melhor compreensão das alterações que ocorrem em plantas de bananeira micropropagadas.

MODIFICATIONS ON LEAF ANATOMY OF BANANA DURING THE MICROPROPAGATION PROCESS

Frederico Henrique da Silva Costa, Moacir Pasqual, Adriene Matos dos Santos, Evaristo Mauro de Castro and Jonny Everson Scherwinski-Pereira

SUMMARY

The study and understanding of alterations taking place during the micropropagation process can provide valuable information about this technology. The objective of this work was to evaluate the anatomical modifications in leaves of micropropagated banana (*Musa spp.*) plants during their adaptation to *ex vitro* conditions. Aseptic axillary shoots of 'Preciosa' cultivar (AAAB) were rooted for 24 days in MS medium containing NAA (1mg·l⁻¹) and agar (6g·l⁻¹), and acclimatized for 120 days. The treatments consisted of leaves at different stages of development: T1 - leaves from plants at the end of *in vitro* rooting phase, T2 - persistent leaves from plants after 30 days of acclimatization, T3 - new leaves from plants after 30 days of acclimatiza-

tion (transition leaves). T4 - transition leaves from plants after 60 days, T5 - new leaves from plants after 60 days of acclimatization, and T6 - new leaves from plants after 120 days of acclimatization. A higher degree of differentiation and, thereby, better adaptation took place in leaves from leaf primordial differentiated in *ex vitro* conditions. The acclimatization phase is crucial for a greater thickness and differentiation of spongy and palisade parenchyma, and to correct the modifications of plants developed *in vitro*. The study of leaf anatomy provides a better understanding of alterations occurring in micropropagated banana plants.

Introdução

No Brasil, a bananeira é uma das mais importantes frutíferas e seu cultivo uma atividade de expressivo interesse econômico e social. Em sua maioria, as cultivares utilizadas em plantios comerciais são tri-

plóides e, em menor proporção tetraplóides, caracterizadas por possuírem esterilidade parcial ou total (Crouch *et al.*, 1998). Por essa razão, a forma convencional de propagação é a assexuada, por meio de brotações laterais (perfilhos) desenvolvidas a partir de gemas

do seu caule subterrâneo ou rizoma, que além de ser ineficaz pode disseminar pragas e doenças (Roels *et al.*, 2005).

Este fato conduz à necessidade por grandes quantidades de material propagativo, estimulando assim, o desenvolvimento de métodos mais

eficientes de multiplicação. Dentre as técnicas aprimoradas, destaca-se a micropropagação de ápices caulinares que, atualmente, permite a produção massal de propágulos com elevado padrão genético e fitossanitário, em períodos de tempo e espaço físico

PALAVRAS CHAVE / Aclimatização / Alterações Estruturais / Cultivo *in vitro* / *Musa spp.* /

Recebido: 27/11/2007. Modificado: 25/07/2008. Aceito: 30/07/2008.

Frederico Henrique da Silva Costa. MSc. e Doutorando em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Brasil. Endereço: C.P. 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil. e-mail: frederico_acreano@hotmail.com

Moacir Pasqual. Dr. em Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo (Esalq/USP), Brasil. Professor, UFLA, Brasil.

Adriene Matos dos Santos. Agrônomo, UFLA, Brasil.
Evaristo Mauro de Castro. Dr. em Fitotecnia, UFLA, Brasil. Professor, UFLA, Brasil.

Jonny Everson Scherwinski-Pereira. Dr. em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas, Brasil. Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasil.

MODIFICACIONES EN LA ANATOMÍA FOLIAR DE BANANAS DURANTE EL PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN

Frederico Henrique da Silva Costa, Moacir Pasqual, Adriene Matos dos Santos, Evaristo Mauro de Castro y Jonny Everson Scherwinski-Pereira

RESUMEN

El estudio y comprensión de las alteraciones ocurridas durante el proceso de micropropagación pueden proveer información valiosa acerca de esta tecnología. El objetivo de este trabajo fue evaluar las modificaciones anatómicas que tienen lugar en las hojas de plantas de banano (*Musa spp.*) micropropagadas durante el proceso de adaptación de las mismas a las condiciones *ex vitro*. Brotes axilares asépticos de cv. Preciosa (AAAB) fueron enraizados por 24 días en medio MS, adicionado con ANA ($1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y agar ($6\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$); y aclimatados por 120 días. Los tratamientos consistían de hojas en diferentes estadios de desarrollo: T1 - hojas de plantas en el final de la fase de enraizamiento *in vitro*, T2 - hojas persistentes de plantas con 30 días de aclimatación, T3

- hojas nuevas de plantas con 30 días de aclimatación (hojas de transición), T4 - hojas de transición de plantas aclimatadas por 60 días, T5 - hojas nuevas de plantas aclimatadas por 60 días, y T6 - hojas nuevas de plantas aclimatadas por 120 días. Mayor grado de diferenciación y, por tanto, mejor adaptación ocurrió en hojas provenientes de primordios foliares diferenciados en condiciones *ex vitro*. La fase de aclimatación es fundamental para un mayor espesor y diferenciamiento de los parénquimas clorofilianos y para corregir las modificaciones desarrolladas en las plantas *in vitro*. El estudio de la anatomía foliar posibilita una mejor comprensión de las alteraciones que ocurren en bananeras micropropagadas.

reduzidos, sem interrupção sazonal (Gübbük e Pekmezci, 2004; Rocha, 2005). Todavía, embora o processo de micropropagação seja considerado uma tecnologia de ampla utilização e bem estabelecida para a bananeira, existe pouco entendimento sobre as modificações estruturais decorrentes do peculiar microambiente *in vitro* no qual as plantas são cultivadas.

Nesse sentido, Silva *et al.* (2005) afirmam que uma das dificuldades de sucesso quando se utiliza o cultivo *in vitro* diz respeito à etapa em que as plantas são removidas dos frascos de cultivo e transferidas para as condições *ex vitro*. Esta limitação seria relacionada com as características estruturais desenvolvidas às plantas *in vitro* como reduzida diferenciação dos parênquimas clorofilianos, ineficiente controle da transpiração foliar pelos estômatos e ausência ou baixa formação de cera epicuticular. Em consequência dessas alterações, uma fase de aclimatação *ex vitro* se torna necessária e imprescindível para evitar a morte de plantas, pois durante este período de adaptação, as modificações existentes podem ser corrigidas (Marin, 2003). Em adição, o novo ambiente *ex vitro* possibilita que novas folhas mais adaptadas e eficientes nos processos referentes ao desenvolvimento vegetal se-

jam formadas (Sandoval *et al.*, 1994).

Portanto, a partir do conhecimento do grau e tipo de alterações estruturais que ocorrem durante a micropropagação, é possível controlar e aperfeiçoar as condições de cultivo *in vitro* e *ex vitro*, maximizando assim a sobrevivência e crescimento na aclimatação (Apóstolo *et al.*, 2005). Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar modificações anatómicas em folhas de bananeira durante o processo de adaptação das plantas micropropagadas às condições *ex vitro*.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no município de Lavras, MG, Brasil, a 918m de altitude, $21^{\circ}14'S$ e $45^{\circ}00'O$, entre agosto 2006 e janeiro 2007. Como material vegetal foi utilizado plantas micropropagadas de bananeira 'Preciosa' (5,0cm). A cultivar Preciosa é um híbrido tetraplóide (AAAB) tipo Prata, gerado na Embrapa a partir do cruzamento da cultivar Pacovan (AAB) com o híbrido diplóide M53 (AA) possuindo resistência às principais doenças da bananicultura nacional e boas características agrônomicas.

Para obtenção das plantas, brotações axilares, proveniente da fase de multiplicação *in vitro*, foram alongadas

e enraizadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de ANA (ácido nafenolacético, $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) e ágar ($6\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), a pH $5,8 \pm 0,1$. Quanto ao cultivo, este foi realizado em frascos (250ml) contendo 40ml de meio e cinco brotações, os quais foram vedados com filme plástico transparente. Em seguida, os frascos foram mantidos em sala de crescimento, por 24 dias, a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 16h de irradiância de $35\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Osram 20 W, luz do dia especial).

Decorridos 24 dias *in vitro*, as plantas foram retiradas dos frascos de cultivo, submetidas à lavagem e poda manual de suas raízes para o tamanho aproximado de 3cm, e posteriormente a aclimatação. Para isso, as plantas foram transferidas para tubetes de 0,3l contendo terra de subsolo (abaixo da camada de 0-20cm), casca de arroz carbonizada e Plantmax[®] HT (1:1:1 v/v), adicionados de $50\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de húmus de minhoca e $20\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de superfosfato simples (20% P_2O_5). Em seguida, as mudas foram mantidas por 75 dias em casa de vegetação, coberta por filme de polietileno transparente (150 μm), apresentando sombreamento de 70% (distante 2,70m das plantas) e sistema de irrigação automático por microaspersão (acionado em função da umidade relativa do ar). Passado este período, as plantas foram

transferidas para sacos de polietileno preto (4 lit), contendo mesmo substrato, e mantidas em casa de vegetação desprovida de sombra, durante 45 dias, e irrigadas manualmente conforme as necessidades.

Os tratamentos consistiram de folhas formadas *in vitro* e em diferentes estádios de aclimatação, assim descritos: T1 - folhas de plantas ao final da fase de enraizamento *in vitro*, T2 - folhas persistentes de plantas aos 30 dias de aclimatação, T3 - novas folhas de plantas aos 30 dias de aclimatação (folhas de transição), T4 - folhas de transição de plantas aclimatizadas por 60 dias, T5 e T6 - novas folhas de plantas aclimatizadas por 60 dias e 120 dias, as quais foram comparadas em termos de características da anatomia foliar. O controle das folhas dos tratamentos T2 e T4 foi realizado marcando-se as folhas com fitilhos de cores distintas.

Para os estudos anatómicos, utilizou-se a região mediana da segunda folha expandida (em direção ápice-base), coletadas de pelo menos cinco plantas diferentes por tratamento. O material foi inicialmente fixado em FAA 70 por 72h e, em seguida, conservado em etanol 70% v/v (Johansen, 1940). A partir desse material, cortes transversais e paradermicos foram obtidos em micrótomo de mesa manual

e à mão livre com auxílio de lâmina de barbear, os quais foram submetidos à clarificação com hipoclorito de sódio (1,00-1,25% de cloro ativo), tripla lavagem em água destilada e coloração com azul de astra-safranina (transversais) e safranina 1% (paradérmicos). Posteriormente, foram montadas lâminas semipermanentes com água glicerina (Kraus e Arduim, 1997). Nas seções transversais, com auxílio de microscópio Ken-a-vision 2100 e ocular micrométrica foram feitas medições das epidermes e hipodermes em suas faces adaxial e abaxial, dos parênquimas paliçádico e esponjoso, na região após o quarto feixe lateral, além de medidas da nervura foliar. Para os cortes paradérmicos, avaliaram-se a densidade estomática e o índice estomático, ambos utilizando microscópio Olympus CBB. A densidade estomática foi expressa em número de estômatos por mm², segundo a técnica de Labouriau *et al.* (1961); enquanto o índice estomático foi obtido por (Cutter, 1986): Índice estomático = [(N° de estômatos por mm²) / (N° de estômatos por mm² + N° de células epidérmicas por mm²)] × 100. Adicionalmente, os diâmetros polar e equatorial foram mensurados com auxílio de microscópio Ken-a-vision 2100 e ocular micrométrica.

O delineamento foi o inteiramente casualizado (DIC),

com seis e cinco repetições para os cortes transversais e paradérmicos. A análise de variância dos dados foi efetuada por meio do Software Sisvar (Ferreira, 2000) e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Resultados e Discussão

Nas seções transversais da lâmina foliar (Tabela I), resultados superiores para a espessura das epidermes adaxial e abaxial foram observados em folhas ao final da fase de enraizamento *in vitro* (T1), folhas persistentes (T2) e novas folhas aos 30 dias de aclimatização (folhas de transição, T3), as quais não diferiram entre si ($p \leq 0,05$). Todavia, de acordo com Sandoval *et al.* (1994), embora bananeiras 'Grande Naine' advindas do cultivo *in vitro* apresentem epiderme com células relativamente largas, suas paredes são finas, o que possivelmente pode explicar a maior espessura das células epidérmicas obtidas no presente trabalho.

Quanto aos parênquimas (Tabela I), tanto o paliçádico quanto o esponjoso apresentaram maior espessamento em folhas aos 120 dias de aclimatização (T6), seguido das novas folhas aos 60 dias (T5) ($p \leq 0,05$). Por outro lado, comparando-se as folhas ao final do enraizamento *in vitro* e folhas persistentes (T1 e T2), bem como as folhas

de transição (T3 e T4) nenhuma diferença significativa foi observada. Em relação ao parênquima esponjoso, os tratamentos um, dois, três e quatro não diferiram entre si ($p \leq 0,05$), fato também verificado para a espessura do feixe central (nervura).

Este resultado corresponde àquele obtido por Gonçalves *et al.* (2000) em plantas micropropagadas de castanha (*Castanea sativa* × *C. crenata*), onde um progressivo incremento na porcentagem de parênquima paliçádico ocorreu com a aclimatização *ex vitro*. Adicionalmente, estes autores observaram que as folhas persistentes não mostraram boa diferenciação entre o parênquima paliçádico e esponjoso, sendo constituída de células com forma circular. Todavia, folhas formadas *ex vitro* tiveram progressivamente células paliçádicas organizadas, uniformes e de formato mais retangular, sendo a diferenciação entre os parênquimas mais notável na segunda e terceira folhas formadas na aclimatização. Nesse contexto, Serret e Trillas (2000) afirmam que as variações estruturais associadas com o desenvolvimento de tecidos fotossintéticos podem exercer papel positivo na sobrevivência e aclimatização das plantas como, por exemplo, a redução deste processo.

Para as hipodermes, resultados superiores para a face adaxial ocorreram nos tratamentos três, quatro, cinco e

seis, que embora não tenham diferido significativamente entre si, foram maiores que aos demais ($p \leq 0,05$). Quanto à hipoderme da superfície abaxial maior e menor espessuras foram observadas nos tratamentos quatro e seis, respectivamente, ao passo que para o limbo foliar, maior espessamento ocorreu em folhas aos 120 dias de aclimatização ($p \leq 0,05$). Além disso, todas as folhas formadas após o transplante apresentaram valores superiores às folhas advindas do cultivo *in vitro* (Tabela I).

Os resultados observados no presente estudo mostram que algumas características anatômicas verificadas em folhas formadas *in vitro* ainda persistem nas primeiras folhas desenvolvidas *ex vitro* e que somente folhas oriundas de primórdios foliares diferenciados na condição *ex vitro* possuem anatomia com maior grau de diferenciação. Resultados esses concordantes às observações reportadas por outros autores em castanha (*Castanea sativa* × *C. crenata*; Gonçalves *et al.*, 2000) e sobreiro (*Quercus suber* L.; Romano e Martins-Loução, 2003). De modo semelhante, Sandoval *et al.* (1994) argumentam que o grau de transição e diferenciação em relação à anatomia foliar durante a fase de adaptação *ex vitro* das plantas micropropagadas está associado à quantidade e estágio de maturidade dos primórdios foliares remanescentes do cultivo *in vitro* no momento da transferência das plantas, bem como também às condições de estresses nas quais as plantas são submetidas.

Observações similares às do presente estudo são citadas também por Sandoval *et al.* (1994) com a bananeira cultivar Grande Naine sob diferentes estágios de micropropagação. De acordo com estes autores, as folhas formadas em cultura *in vitro* apresentaram como principais características anatômicas a presença de epiderme e hipoderme com células relativamente largas, porém com paredes finas; mesofilo não diferenciado, com

TABELA I
MODIFICAÇÕES NA ESPESSURA DOS TECIDOS EM DIFERENTES TIPOS DE FOLHAS DE BANANEIRAS MICROPROPAGADAS

Trat.*	Feixe central	Epiderme adaxial	Hipoderme adaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso	Hipoderme abaxial	Epiderme abaxial	Limbo foliar
				(µm)				
T1	417,42 c	12,33 a	52,38 b	28,78 d	64,03 c	50,50 c	12,43 a	220,43 c
T2	500,92 c	12,13 a	54,15 b	27,78 d	68,48 c	44,58 c	14,03 a	221,13 c
T3	463,65 c	14,53 a	70,58 a	41,60 c	60,68 c	59,45 b	13,75 a	260,58 b
T4	477,90 c	10,45 b	72,13 a	37,40 c	66,80 c	51,33 c	10,65 b	248,75 c
T5	633,71 b	10,60 b	70,90 a	51,38 b	84,08 b	68,45 a	11,15 b	296,55 b
T6	981,47 a	8,58 b	84,30 a	86,55 a	153,60 a	36,23 d	8,93 c	378,18 a
CV (%)	15,38	18,75	27,64	15,11	13,63	11,64	14,03	12,33

* T1: folhas de plantas ao final da fase de enraizamento *in vitro*, T2: folhas persistentes de plantas aos 30 dias de aclimatização, T3: novas folhas de plantas aos 30 dias de aclimatização (folhas de transição). T4: folhas de transição de plantas aclimatizadas por 60 dias, T5: novas folhas de plantas aclimatizadas por 60 dias, e T6: novas folhas de plantas aclimatizadas por 120 dias. Médias seguidas por letras distintas dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade. CV: coeficiente de variação.

TABELA II
DENSIDADE ESTOMÁTICA, ÍNDICE ESTOMÁTICO E NÚMERO DE CÉLULAS EPIDÉRMICAS DAS FACES ABAXIAL E ADAXIAL EM DIFERENTES TIPOS DE FOLHAS DE BANANEIRAS MICROPROPAGADAS

Trat.*	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
CV (%)	13,79	11,42	10,35	33,17	27,77	8,33

* Ver Tabela I.

Médias seguidas por letras distintas dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade. CV: coeficiente de variação.

apenas uma camada de células isodiamétricas de parênquima paliçádico próximas ao parênquima esponjoso; cutícula extremamente fina, entre outras características. Contrariamente às folhas desenvolvidas *ex vitro*, que apresentam epiderme com parede espessa; cutícula fina a espessa (dependendo do período); hipoderme com uma a duas camadas; mesofilo com início de diferenciação e duas a três camadas de células de parênquima paliçádico e esponjoso. Além do mais, as folhas de bananeira *in vitro*, em casa de vegetação e a campo apresentam estruturas básicas semelhantes, diferindo de maneira geral apenas quantitativamente.

Quanto à caracterização dos estômatos, as folhas de bananeira Preciosa apresentam estômatos do tipo tetracítico, caracterizados por possuir quatro células subsidiárias, duas delas paralelas às células-guarda e o par restante polar e, frequentemente, menor. Em relação à sua distribuição, os estômatos ocorrem em ambas às faces da epiderme, porém, com maior densidade na face abaxial (Tabela II), razões que classificam a bananeira como anfi-hipoestomática (Sandoval *et al.*, 1994; Rocha, 2005).

Ainda na Tabela II, verifica-se que para a densidade estomática, resultados superiores para ambas às faces da epiderme foram observados em folhas formadas na condição *in vitro* (T1 e T2), que

embora não tenham diferido entre si, suplantaram as folhas desenvolvidas em ambiente *ex vitro* (T3, T4, T5 e T6; $p \leq 0,05$). Contudo, essa elevada densidade estomática das folhas formadas *in vitro*, sob ambiente heterotrófico, aliado a baixa capacidade dos estômatos em fechar após a retirada das plantas dos fracos de cultivo, têm sido os principais fatores associados à excessiva dessecação e lento crescimento das plantas nos primeiros dias subsequentes ao transplante (Hazarika, 2006). Em adição, a redução na densidade estomática durante a aclimatização é consistente com Dignart (2006), que atribui esse decréscimo à elevada taxa de crescimento das células epidérmicas e demais tecidos foliares durante a exposição a um ambiente de reduzida

umidade, promovendo assim a adaptação e melhoria da funcionalidade dos estômatos. Por outro lado, o incremento no número de estômatos por mm^2 das folhas *in vitro* em detrimento daquelas desenvolvidas na aclimatização ou em campo tem sido observada e relacionada, sobretudo, a elevada umidade relativa do ar nos recipientes de cultivo e baixa irradiância (Khan *et al.*, 2003).

Em relação ao índice estomático, nenhuma diferença significativa entre folhas formadas *in vitro* e *ex vitro* foi verificada, em ambas as faces da epiderme. Em contraste, resultados significativamente superiores para o número de células epidérmicas foram constatados em folhas *in vitro* (T1) e folhas persistentes (T2; Tabela II). Para o tamanho

TABELA III
DIÂMETRO EQUATORIAL (DE) E POLAR (DP) E RELAÇÃO DP/DE DAS FACES ABAXIAL E ADAXIAL EM DIFERENTES FOLHAS DE BANANEIRAS MICROPROPAGADAS

Trat.*	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
CV (%)	4,85	7,99	7,75	6,46	5,83	7,41

* Ver Tabela I.

Médias seguidas por letras distintas dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade. CV: coeficiente de variação.

dos estômatos, maior diâmetro polar da face abaxial foi observado em folhas aos 60 dias de aclimatização (T5), enquanto menor diâmetro equatorial ocorreu nas folhas *in vitro* (T1) e aquelas aos 120 dias *ex vitro* (T6). Já para a relação diâmetro polar/diâmetro equatorial (DP/DE), resultados superiores ocorreram em folhas *in vitro* (T1) e plantas aclimatizadas por 60 e 120 dias (T5 e T6; $p \leq 0,05$; Tabela III).

Para a face adaxial, folhas aos 60 e 120 dias *ex vitro* apresentaram maior diâmetro polar, ao passo que menores dimensões para o diâmetro equatorial ocorreram em folhas formadas *in vitro* (T1 e T2), folhas de transição aos 60 dias de aclimatização (T4) e novas folhas formadas aos 60 dias (T5), as quais não diferiram entre si ($p \leq 0,05$). Para a relação DP/DE, folhas de plantas aclimatizadas por 60 dias (T5) apresentaram maior relação DP/DE, seguido de folhas de plantas *in vitro* (T1; $p \leq 0,05$; Tabela III). Rocha (2005) discute que a relação DP/DE, juntamente com o formato das células-guarda, são características importantes para indicar sobre a funcionalidade dos estômatos, uma vez que a forma elíptica (maior DP/DE) é característica de estômatos funcionais. Afirmar esta nem sempre condizente com os resultados obtidos no presente trabalho, pois a relação DP/DE de plantas *in vitro* mostrou, em alguns casos, resultados superiores e ou semelhantes às folhas *ex vitro* ($p \leq 0,05$).

De acordo com Sandoval *et al.* (1994) estômatos de *Musa cv. Grande Naine*, formados *in vitro* e de plantas adultas, possuem diâmetros polares e equatoriais de 38 e $27 \mu\text{m}$ e de 15 e $17 \mu\text{m}$, o que se traduz em relações DP/DE de 2,53 e 1,59, correspondendo em parte aos resultados observados no presente estudo. Já Gonçalves *et al.* (2000) observaram em castanheira (*Castanea sativa* \times *C. crenata*) cultivada *in vitro* estômatos esféricos, elevados, com células-guardas irregula-

res e consistentemente abertos, enquanto que as novas folhas formadas *ex vitro* apresentam estômatos deprimidos, quase fechados e de forma gradualmente elíptica com células guardas e subsidiárias bem diferenciadas.

Conclusões

– A passagem das plantas micropropagadas da condição heterotrófica para autotrófica *ex vitro* é essencial para promover maior espessamento e diferenciação dos parênquimas clorofilianos e corrigir as modificações desenvolvidas *in vitro*.

– Reduzido desenvolvimento anatômico e alta densidade estomática são observados em folhas oriundas de primórdios foliares diferenciados em ambiente *in vitro*.

– Folhas provenientes de primórdios foliares diferenciados em condição *ex vitro* apresentam anatomia com maior grau de diferenciação e, portanto mais adaptadas.

– Folhas de bananeiras micropropagadas apresentam estômatos em ambas as faces da epiderme, com maior densidade na face abaxial (espécie anfi-hipoestomática).

– As características anatômicas das folhas de bananeira

possuem plasticidade fenotípica em função do estágio de desenvolvimento da planta e das condições ambientais.

– O estudo sobre a anatomia foliar possibilita uma melhor compreensão das alterações que ocorrem em plantas de bananeira micropropagadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão das bolsas e a Embrapa Acre, pelo fornecimento do material vegetal. Trabalho financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Minas Gerais, Brasil.

REFERÊNCIAS

Apóstolo NM, Brutti CB, Llorente BE (2005) Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. *In vitro Cell. Devel. Biol.-Plant* 41: 307-313.

Crouch JH, Vuylsteke D, Ortiz R (1998) Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa* spp.). *E- J. Biotechnol.* 1: 1-12.

Cutter EG (1986) *Anatomia Vegetal. Parte -Células e tecidos.* 2ª ed. Roca. São Paulo, Brasil. 304 pp.

Dignart SL (2006) *Luz e sacarose na micropropagação de *Cataya walkeriana*: alterações*

anatômicas e fisiológicas. Dissertação. Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais, Brasil. 132 pp.

Ferreira DF (2000) *SISVAR 4. 3: sistema de análise estatística.* Lavras: UFLA; DEX. Software.

Gonçalves JC, Diogo G, Coelho MT (2000) Changes in leaf morphology and anatomy of *in vitro*-cultured chestnut plantlets during acclimatization. *Acta Hort.* 520: 183-193.

Gübbük H, Pekmezci M (2004) In Vitro Propagation of Some New Banana Types (*Musa* spp.). *Turk. J. Agric. Forest.* 28: 355-361.

Hazarika BN (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Sci. Hort.* 108: 105-120.

Johansen BA (1940) *Plant microtechnique.* McGraw-Hill. Nova Iorque, EEUU: 523 pp.

Khan SV, Kozai T, Nguyen OT, Kubota C, Dhawan V (2003) Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *Biol. Plant.* 46: 161-166.

Kraus JE, Arduim M (1997) *Manual básico de métodos em morfologia vegetal.* Seropédica. Rio de Janeiro, Brasil. 198 pp.

Labouriau LG, Oliveira JG, Salgado-Labouriau ML (1961) Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. *Anais Acad. Bras. Ciênc.* 33: 237-257.

Marin JA (2003) High survival rates during acclimatization of micropropagated fruit tree

rootstocks by increasing exposures to low relative humidity. *Acta Hort.* 616: 139-142.

Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Rocha HS (2005) *Luz e sacarose na micropropagação da bananeira "Prata Anã": alterações morfoanatômicas.* Tesis. Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais, Brasil. 98 pp.

Roels S, Escalona M, Cejas I, Noceda C, Rodríguez R, Canal MJ, Sandoval J, Debergh P (2005) Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 82: 57-66.

Romano A, Martins-Loução MA (2003) Water Loss and Morphological Modifications in Leaves during Acclimatization of Cork Oak Micropropagated Plantlets. *Acta Hort.* 616: 439-442.

Sandoval JA, Müller LE, Weberling F (1994) Foliar morphology and anatomy of *Musa* cv. Grande Naine (AAA) plants grown *in vitro* and during hardening as compared to field-grown plants. *Fruits* 49: 37-46.

Serret MD, Trillas MI (2000) Effects of light and sucrose levels on the anatomy, ultrastructure, and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* Ellis leaflets cultured *in vitro*. *Int. J. Plant Sci.* 161: 281-289.

Silva LM, Alquini Y, Cavallet VJ (2005) Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. *Acta Bot. Bras.* 19: 183-194.