



SIMONE ABREU ASMAR

**SILÍCIO NA MICROPROPAGAÇÃO DE
BANANEIRA: CARACTERÍSTICAS
MORFOFISIOLÓGICAS**

**LAVRAS - MG
2011**

SIMONE ABREU ASMAR

**SILÍCIO NA MICROPROPAGAÇÃO DE BANANEIRA:
CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS - MG

2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Asmar, Simone Abreu.

Silício na micropropagação de bananeira : características morfofisiológicas / Simone Abreu Asmar. – Lavras : UFLA, 2010.
89 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. *Musa* spp. 2. Cultura de tecidos. 3. Silicato. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.53

SIMONE ABREU ASMAR

**SILÍCIO NA MICROPROPAGAÇÃO DE BANANEIRA:
CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 01 de dezembro de 2010.

Dra. Aparecida Gomes de Araujo	PNPD/CAPES/UFLA
Dra. Ester Alice Ferreira	EPAMIG
Dra. Janice Guedes de Carvalho	UFLA
Dra. Leila Aparecida Salles Pio	PNPD/CAPES/EMBRAPA
Dr. Sebastião de Oliveira e Silva	EMBRAPA

Dr. Moacir Pasqual
Orientador

**LAVRAS - MG
2010**

A Deus e à Nossa Senhora,

Pelo dom da vida e proteção cotidiana.

OFEREÇO

Aos meus queridos pais, Roberto e Fátima;

Aos meus irmãos, Adriano e Roberta;

Aos meus sobrinhos Mateus, Gabriel e Miguel;

Ao meu namorado, Antonio Marcos;

À minha tia Ofélia,

por tanto amor, dedicação, confiança, incentivo e apoio,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora, por serem presença constante em minha vida, por sempre terem me enchido de graças, principalmente durante o doutorado. Agradeço pela saúde e pelo dom da vida, que fizeram com que eu vencesse mais esta etapa.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, professor Moacir Pasqual, pessoa de simplicidade e alegria constantes, por ter me acolhido e me incluído em sua equipe de trabalho. Sou imensamente grata pela oportunidade, confiança, amizade e os diversos ensinamentos.

À amiga e pós-doutoranda Aparecida Gomes de Araujo (Cida), que tanto me ensinou pacientemente, auxiliando-me em tudo e que fez toda diferença para que eu chegasse até aqui.

À amiga e pós-doutoranda Leila Aparecida Salles Pio, por toda ajuda, contribuição, atenção e carinho dedicados a mim.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, especialmente na pessoa do pesquisador Sebastião de Oliveira e Silva, pela colaboração, amizade e por ter cedido todo material usado no trabalho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade de revisão, avaliação e enriquecimento do trabalho.

Ao professor Evaristo Mauro de Castro, pelas ideias e sugestões durante a execução do trabalho.

Ao pesquisador Fabrício José Pereira, pela total disponibilidade, paciência e atenção, as quais foram indispensáveis na conclusão deste trabalho.

Aos laboratoristas Vantuil, Claret, Antonio Carlos e Evaldo, pelos ensinamentos, dedicação, prestatividade e por todos os momentos de descontração no laboratório.

À Marli, secretária da pós-graduação em Fitotecnia, pelo atendimento eficiente e amizade.

A todos os amigos (doutorandos, mestrandos e estagiários) do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais que auxiliaram neste trabalho, pelos bons momentos compartilhados no laboratório e na salinha do Necult. De forma especial, a Ana Catarina (Catá), Ana Paula, Aurinete, Claudinéia (Néia), Dalilha, Filipe (Batata), Franciane (Fran), Joyce, Karine, Rafael (Rafinha), Renato e Ylana.

Aos meus amigos de curso, Alexana Baldoni, Leandro Lino, Rafaella Zambaldi, Thatiane Padilha, Verônica Andrade e Vivian Nascimento, por compartilharem tão grande esforço.

À Renata Alves Lara Silva (Renatinha), que não mediu esforços em auxiliar nas análises anatômicas.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia, em especial à laboratorista Eloísa (Elô) e ao estudante Douglas, pela ajuda e disponibilidade durante a realização das análises de microscopia de varredura.

Ao Laboratório de Produtos Vegetais do Departamento de Ciência dos Alimentos, especialmente à laboratorista Constantina (Tina), pela ajuda e auxílio prestados.

Ao Laboratório de Fertilizantes do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia.

À minha família, razão de tudo!

Enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu profundo agradecimento.

Muito obrigada!

RESUMO

A banana tem destacada expressão social e econômica em todo o mundo, sendo considerada importante fonte de alimento e uma das frutas de maior consumo e produção entre as espécies frutíferas tropicais. Um dos principais aspectos que limitam a expansão da cultura da bananeira é a utilização de mudas produzidas por métodos convencionais. Assim, o cultivo *in vitro* tem sido uma boa alternativa devido à obtenção de grande quantidade de mudas sadias em menor tempo e espaço físico. Por não ser considerado um elemento essencial às plantas, o silício não tem sido muito estudado na micropropagação, no entanto, seu uso contribui para a qualidade final do vegetal. Ele confere proteção às plantas, aumento da capacidade fotossintética, redução de perda de água e promove maior crescimento. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar fontes de silício na micropropagação de bananeira, por meio de análises fitotécnicas, bioquímicas, ultraestruturais e anatômicas, visando melhorar a qualidade final das mudas produzidas *in vitro*. Utilizaram-se propágulos já estabelecidos *in vitro* e inoculados em meio Murashige & Skoog (MS), adicionado de 30g L⁻¹ de sacarose, 1mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) e solidificado com 1,8 g L⁻¹ de PhytigelTM. Foram testadas três fontes de silicato acrescidas ao meio MS, silicato de sódio, silicato de potássio e silicato de cálcio, na dosagem de 1g L⁻¹ e o meio MS sem silicato como testemunha. Os propágulos foram mantidos, por 45 dias, em sala de crescimento, sob condições controladas. Verificou-se aumento nos teores de clorofila a, b e total na presença de silicato de cálcio. A suplementação do meio de cultura com silicato de sódio promove aumento de comprimento, massa fresca e seca de parte aérea. Quanto às características anatômicas, maior número de estômatos e relação diâmetro polar e equatorial é obtido utilizando-se fonte de silício ao meio. A adição de silicato de cálcio proporciona maior espessura de epiderme, mesofilo e parênquima paliçádico e aumenta a taxa fotossintética. As plantas também foram avaliadas 60 dias após o transplante e conclui-se que o uso do silício *in vitro* traz benefícios durante a aclimatização de bananeira. Os silicatos de cálcio e potássio promovem aumento de clorofila a, b e total; maiores teores de celulose e taninos são obtidos com silicato de sódio e maior diâmetro do pseudocaule, massa fresca e seca de parte aérea e massa fresca de raiz são obtidos utilizando fonte de silício. O processo de aclimatização é fundamental, pois proporciona aumento na camada de cera epicuticular em folhas de bananeira.

Palavras-chave: *Musa* spp. Cultura de tecidos. Silicato.

ABSTRACT

Banana fruit has an outstanding social and economic expression all over the world, its being regarded as an important source of food and on the fruits of highest consumption and production among the tropical fruit-bearing species. One of the main aspects limiting the spread of the crop is the use of conventional method-produced seedlings. The *in vitro* cultivation has been accepted in a number of areas of commercial agriculture, chiefly in fruit-bearing trees. For not being regarded as an element essential to plants, silicon has not been much studied in micropropagation, nevertheless, its use contributed to the final quality of the product. It confers increased photosynthetic capacity, reduction of water loss to plants and also promotes increased growth. The present work was intended to evaluate the sources of silicon in banana tree micropropagation by means of phytotechnical, biochemical, ultrastructural and anatomical analyses aiming to improve the physiological and phytosanitary quality of the *in vitro*-produced seedlings. Propagules already established *in vitro* and inoculated in Murashige & Skoog (MS) medium, added of 30g L⁻¹ of sucrose, 1mg L⁻¹ of ANA (naftalenoacetic acid) and solidified with 1.8 g L⁻¹ of PhytigelTM were used. Three sources of silicate added to the MS medium, sodium silicate and calcium silicate at the dosage of 1g L⁻¹ and MS medium without silicate as a control were tested. The propagules were kept for 45 days in a growth room under controlled conditions. Increase in the contents of a, b and total chlorophyll in the presence of calcium silicate was found. The supplementation of the culture medium with sodium silicate promotes increase of length, fresh and dry matter of the shoot. As to the anatomical characteristics, increased number of stomata and ratio polar and equatorial diameter are obtained by using source of silicon into the medium. The addition of calcium silicate provides greater thickness of epidermis, mesophyll, palisade parenchyma and increases the photosynthetic rate. The plants were also evaluated 60 days after transplanting and it follows that use of silicon in the *in vitro* rooting brings benefits during acclimatization of the banana tree. Calcium and potassium silicates promote increase of a, b and total chlorophyll; higher contents of cellulose and tannins are obtained with sodium silicate; increased diameter of the pseudostem, fresh and dry mass of shoot and fresh mass of root are obtained by utilizing silicon source. The process acclimatization is fundamental, for it provides increase in the epicuticular wax layer in banana tree leaves.

Keywords: *Musa* spp. Tissue culture. Silicate.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral	11
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Importância da bananicultura	15
2.2	Micropropagação da bananeira	16
2.3	Meios nutritivos	18
2.4	Silício	19
2.4.1	Essencialidade, absorção, transporte e acúmulo	19
2.4.2	Silício como elemento benéfico para as plantas	21
2.5	Aclimatização	22
	REFERÊNCIAS	24
	CAPÍTULO 2 Fontes de silício no desenvolvimento de plântulas de bananeira ‘Maçã’ micropropagadas	30
1	INTRODUÇÃO	33
2	MATERIAL E MÉTODOS	34
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	CAPÍTULO 3 Modificações na anatomia foliar de bananeiras ‘Maçã’ submetidas a diferentes fontes de silício <i>in vitro</i>	46
1	INTRODUÇÃO	49
2	MATERIAL E MÉTODOS	51
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	CAPÍTULO 4 Aclimatização de bananeira ‘Grande Naine’ em resposta a diferentes fontes de silício <i>in vitro</i>	68
1	INTRODUÇÃO	71
2	MATERIAL E MÉTODOS	73
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS	85

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A banana tem destacada expressão social e econômica em todo o mundo, sendo considerada importante fonte de alimento e uma das frutas de maior consumo e produção entre as espécies frutíferas tropicais. A área total mundial cultivada é estimada em 4,1 milhões de hectares, num total de 120 países tropicais e subtropicais, e a produção é de 70 milhões de toneladas.

O Brasil é o quarto produtor mundial de banana, tendo produzido 6.972.408 toneladas da fruta em 2007, em uma área colhida de 508.845 hectares (ANUÁRIO BRASILEIRO DE AGRICULTURA, 2009). Os dois principais estados produtores brasileiros são Bahia, com 1.407.741 toneladas, e São Paulo, com 1.238.087 toneladas, em 2009 (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2010). Entretanto, a produtividade nacional de banana é considerada baixa, o que se deve, entre outros fatores, ao baixo nível tecnológico adotado para o cultivo da bananeira.

Um dos principais aspectos que limitam a expansão da cultura da bananeira é a utilização de mudas produzidas por métodos convencionais que, além de apresentarem baixa taxa de multiplicação, podem constituir um mecanismo de disseminação de pragas e doenças (ROELS et al., 2005), ocasionando perdas que podem alcançar 100% na produtividade, no caso da sigatoka-negra e do mal-do-panamá (SILVA et al., 2003). No entanto, como em qualquer espécie cultivada em grandes áreas, a bananeira é afetada por diversos problemas fitossanitários.

Diante destas limitações, a micropropagação constitui uma importante ferramenta para a obtenção massal de clones dos genótipos de interesse, facilitando a distribuição, a conservação e o intercâmbio de germoplasma, além de proporcionar a rápida propagação e validação de variedades recentemente lançadas pelos programas de melhoramento genético da bananeira (GÜBBÜK;

PEKMEZCI, 2004). O uso do cultivo *in vitro* tem sido aceito em numerosas áreas da agricultura comercial, especialmente em frutíferas tropicais.

Em escala comercial, a micropropagação já é realidade em diversas áreas no mundo. No Brasil, a principal limitação para o maior acesso dos produtores a esse tipo de muda é seu elevado custo, que é superior ao das mudas convencionais (DIGNART et al., 2009; ROCHA et al., 2007), além do estabelecimento de protocolos adequados e viáveis economicamente.

Dessa forma, é necessário aprimorar as etapas da micropropagação para tornar este processo mais eficiente. Dentre estas etapas, destaca-se a otimização do protocolo mediante alterações do meio para o cultivo do material, objetivando maiores taxas de multiplicação, enraizamento e posterior aclimatização das plântulas.

O enraizamento *in vitro* é uma etapa importante da micropropagação e é realizado em meio nutritivo contendo ágar geleificado ou Phytigel™. Porém, o sistema radicular emitido em meio com esse suporte é, em geral, pouco ramificado, quebradiço e com poucos pêlos radiculares (HOFFMANN et al., 2001), o que acarretará em dificuldades durante o processo de aclimatização. Assim, a adição de silício ao meio de cultivo poderá auxiliar na obtenção de um sistema radicular mais vigoroso e eficiente durante o processo de aclimatização.

Por não ser considerado um elemento essencial às plantas, o silício não tem sido muito estudado na micropropagação. Seu uso, no entanto, contribui para a qualidade final do vegetal, pois seu acúmulo na cutícula das folhas permite proteção às plantas, aumento da capacidade fotossintética, redução de perda de água e, ainda, promove um maior crescimento, características estas desejáveis no processo de aclimatização de plantas micropropagadas. Isso porque, ao serem transferidas para o ambiente *ex vitro*, podem morrer devido à perda d'água e à baixa funcionalidade dos estômatos.

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar fontes de silício na micropropagação de bananeira, por meio de análises fitotécnicas, bioquímicas, ultraestruturais e anatômicas, visando melhorar a qualidade final das mudas produzidas *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da bananicultura

A bananicultura assume importância social e econômica em mais de 80 países, sendo cultivada principalmente em pequenas propriedades (SILVA et al., 2002), destacando-se como uma das culturas de maior produção entre as frutíferas tropicais (DONATO et al., 2006).

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de banana, com produção de 7 milhões de toneladas, em 2007 e área cultivada de 513 mil hectares (AGRIANUAL, 2009). No Brasil, seu cultivo estende-se de norte ao sul do país e seu fruto representa uma fonte contínua de alimento e de renda para os produtores (SILVA et al., 2003).

A banana é a fruta mais consumida no mundo e não seria exagero concluir que é também a mais importante. Consumida em sua quase totalidade na forma *in natura*, é parte integrante da alimentação das populações de baixa a alta renda, não só pelo seu alto valor nutritivo, como pelo baixo custo. Ademais, a banana pode ser utilizada para a produção de banana chips e preparação de diversos pratos culinários, como tortas, sorvetes, mingaus e salada de frutas. Além disso, o fruto apresenta propriedades terapêuticas e medicinais e também grande potencial ornamental e artesanal (BAKRY et al., 2009).

Aliado a estes fatores, o cultivo da bananeira apresenta um fluxo contínuo de produção a partir do primeiro ano, fato este que garante emprego e renda para milhares de brasileiros e exerce importante papel na fixação de mão-de-obra rural e do agricultor no campo (ALVES et al., 1999). Nesse sentido, estima-se que existam 600.000 propriedades agrícolas envolvidas com a cultura, das quais mais de 60% são de pequenos agricultores que cultivam de 2 a 50 hectares.

No Brasil, as cultivares mais plantadas são triploides sem sementes (grupo AAB) e pertencem ao tipo prata ('Prata', 'Prata-anã' e 'Pacovan'), que representa 60% da banana produzida; ao tipo terra ('Terra' e 'Terra Maranhão') e maçã, todas utilizadas unicamente para o mercado interno (SILVA et al., 2001). A restrita exportação dessas variedades deve-se à inadequação do produto ao mercado externo, bem como à grande demanda interna decorrente da alta preferência pelo tipo prata, especialmente por nordestinos e nortistas. Já a banana do tipo maçã é considerada a mais nobre para os brasileiros, dado o seu paladar, enquanto a terra é, praticamente, consumida apenas na forma cozida ou frita (SILVA et al., 2008).

Somente as bananas d'água ou do subgrupo cavendish (AAA, 'Grande Naine', 'Nanica' e 'Nanicão'), apesar de possuírem uma produção menos representativa no país, têm características adequadas para exportação, como, por exemplo, frutos delgados, longos, encurvados e de paladar muito doce quando maduros (SILVA et al., 2008). No entanto, as cultivares tipo cavendish são suscetíveis à sigatoka-negra, principal praga da cultura, e, à exceção da 'Terra' e da 'Maçã', são, também, suscetíveis à sigatoka-amarela. Com relação ao mal-do-panamá, a 'Grande Naine' e a 'Terra' são resistentes, a 'Maçã' é altamente suscetível e as demais cultivares são medianamente suscetíveis (SILVA et al., 2001). Tais pragas, geralmente, resultam em perdas na produção, especialmente em grandes áreas destinadas ao cultivo industrial (BAKRY et al., 2009).

2.2 Micropropagação da bananeira

A cultura de tecidos vegetais representa um ramo da biotecnologia, constituindo uma técnica de crescimento de células, tecidos e órgãos em um meio nutritivo artificial, isolados da planta mãe (GEORGE, 1996).

A aplicação mais prática da cultura de tecidos é a micropropagação,

também denominada de propagação vegetativa *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Dentre os principais benefícios da micropropagação de plantas podem ser citadas: possibilidade de aumento rápido do número de indivíduos geneticamente idênticos a partir de plantas selecionadas, produção de mudas durante todo o ano, mesmo em regiões nas quais a planta não apresenta condições para a propagação sexuada e produção de plantas com elevada qualidade fitossanitária (ECHEVERRIGARAY et al., 2001).

A propagação da bananeira ocorre vegetativamente pela emissão de novas brotações, que são utilizadas pelos agricultores para o plantio comercial. Entretanto, a facilidade de disseminação de patógenos e a baixa qualidade das mudas, associadas ao elevado custo de implantação e à pequena quantidade de mudas obtidas, levaram à busca por novas tecnologias de produção de mudas, visando à expansão da bananicultura (RUGGIERO et al., 1994).

O emprego da cultura de meristemas e da propagação rápida *in vitro* possibilita a produção em larga escala de plantas livres de vírus para uso em pesquisas e fornecimento a viveiristas e bananicultores.

A bananeira é uma das primeiras culturas utilizadas na propagação *in vitro* em larga escala no Brasil, abrindo novas perspectivas no cenário nacional da bananicultura. No início da década de 1990, biofábricas foram criadas, visando à micropropagação de cultivares comerciais de bananeira. A carência de informações e a falta de domínio dessa nova tecnologia e a ausência de legislação para produção de mudas produzidas por meio da micropropagação foram responsáveis pela colocação no mercado de um produto de qualidade duvidosa, que causou prejuízos aos agricultores, devido à ocorrência de variação somaclonal proveniente do cultivo *in vitro* inadequado (RODRIGUES, 1996). Esperava-se uniformidade genética no material micropropagado, já que a técnica de micropropagação envolve, basicamente, divisões mitóticas. Porém, a variação somaclonal observada em cultura de tecidos é decorrente principalmente do

meio de cultivo, do regulador de crescimento, além da suscetibilidade da cultivar utilizada e do número de subcultivos (SKIRVIN et al., 1994).

A produção comercial de mudas de laboratório das variedades mais comuns de banana plantadas no Brasil tem sido inviabilizada pelo alto custo de produção. Dessa forma, para viabilizar este tipo de muda, protocolos mais eficientes devem ser estabelecidos, a fim de reduzir os custos de produção e melhorar a qualidade das mudas micropropagadas.

2.3 Meios nutritivos

Dentre os fatores que afetam a cultura de tecidos vegetais, a composição do meio aparece como fator fundamental para o sucesso do cultivo *in vitro*.

O meio de cultura é constituído de componentes essenciais (água, sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento) e opcionais (aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas). A composição do meio de cultura tem importante função nas respostas de crescimento de células e tecidos *in vitro* (TORRES et al., 2001).

Plantas ou explantes cultivados *in vitro* têm exigências nutricionais específicas, sendo os meios modificados de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e espécie. Assim, ao excisar parte da planta para o cultivo *in vitro*, observa-se que os explantes não são completamente autotróficos e requerem meios nutritivos suplementados com as necessidades exógenas da célula, considerando os elementos essenciais, constituintes orgânicos e energia (TORRES et al., 2001). Dessa forma, a adição do silício ao meio pode promover efeitos benéficos às plantas ao aumentar o conteúdo de hemicelulose e lignina e, conseqüentemente, a rigidez na parede celular, elevando as taxas de sobrevivência durante a aclimatização (CAMARGO et al., 2007).

2.4 Silício

A ação benéfica do silício tem sido associada a diversos efeitos indiretos, como aumento da capacidade fotossintética, aumento no teor de clorofila total, redução da transpiração, maior crescimento de plantas e aumento da resistência mecânica das células (ZHOU, 1995).

2.4.1 Essencialidade, absorção, transporte e acúmulo

Por não ser considerado um elemento essencial às plantas, o silício (Si) não tem sido muito estudado na micropropagação. Contudo, do ponto de vista fisiológico, esse elemento tem demonstrado efeito benéfico sobre o aumento de produção de diversas culturas (GOMES et al., 2008). Segundo este autor, acredita-se que ele possa interferir na arquitetura das plantas, ao proporcionar folhas mais eretas, o que significa maior eficiência fotossintética.

O Si não é considerado elemento essencial às plantas porque não atende aos critérios diretos e indiretos de essencialidade (MENGEL; KIRKBY, 2001). De acordo com o critério direto de essencialidade, um elemento é considerado essencial quando faz parte de um composto ou participa de uma reação necessária para a sobrevivência da planta. No critério indireto, um elemento é considerado essencial quando, na sua ausência, a planta não completa seu ciclo de vida, não pode ser substituído por nenhum outro elemento, tem efeito direto no crescimento e desenvolvimento das plantas e não exerce nenhum papel neutralizador de efeitos físicos, químicos ou biológicos desfavoráveis para a planta (MALAVOLTA, 1980).

O Si é absorvido pelas raízes na forma de ácido monossilícico (H_4SiO_4), uma molécula de carga neutra e, nessa mesma forma, é transportado até a parte aérea, pelo xilema. Nas folhas, a perda de água por transpiração faz com que o

ácido monossilícico se concentre e polimerize em sílica (SiO_2), depositando-se nos diferentes tecidos vegetais (MA et al., 2006). O transporte de Si à longa distância, da raiz até a parte aérea, é feito essencialmente via apoplasto. O transporte de Si nas paredes celulares e espaços intercelulares para o lúmen das células e citosol envolve difusão e fluxo de massa.

A absorção de Si está relacionada a alguma forma de defesa, seja ela contra estresse biótico ou abiótico. Assim, as plantas absorvem mais desse elemento nestas condições e, com isso, resistem melhor a esse distúrbio (DALLAGNOL et al., 2009).

Após ser absorvido e transportado até a parte aérea, o ácido monossilícico passa por transformações e deposita-se na forma de sílica amorfa hidratada, inicialmente nos tecidos mais jovens e, posteriormente, vai acumulando-se rapidamente nas células senescentes, sob a forma de sílica, também chamada de opala biogênica, fitólitos ou simplesmente corpos silicosos (DAYANANDAM et al., 1983).

Os depósitos de sílica ocorrem com maior frequência na epiderme foliar com a sílica combinada às frações de polissacarídeos (celulose e hemicelulose) da parede celular, lúmen e espaços intercelulares (EPSTEIN, 1999).

A concentração de sílica é maior na parte aérea que na raiz, com maior concentração nas folhas velhas que nas folhas novas (WIESE et al., 2007).

Embora todas as plantas contenham Si, há grandes variações nos padrões de acúmulo de Si na parte aérea das espécies. A concentração de Si pode variar de 0,1% a 10 % de Si do peso seco, dependendo da espécie de planta (EPSTEIN, 1999). Plantas classificadas como acumuladoras de Si são aquelas cujos teores de SiO_2 variam de 1% a 3% na matéria seca e não acumuladoras são plantas com menos de 0,5% de SiO_2 (MENGEL; KIRKBY, 2001). Há também uma variação genotípica na concentração de Si dentro de cada espécie, embora a

variação não seja tão grande quanto à observada entre espécies (HODSON et al., 2005).

2.4.2 Silício como elemento benéfico para as plantas

O Si é o segundo elemento em maior abundância na crosta terrestre depois do oxigênio, mas sua importância no crescimento das plantas ainda não é bem compreendida. Entretanto, hoje já é bastante aceita a importância do Si como nutriente benéfico para as plantas, quando sob efeito de estresses abióticos e bióticos (LAING; ADANDONON, 2005).

Podem-se dividir os efeitos benéficos do Si, relatados por Korndörfer et al. (2002), sobre o crescimento das plantas em dois grupos: benefício físico e fisiológico. Os benefícios físicos estão relacionados ao acúmulo do Si na parede celular das plantas, reduzindo a perda d'água, melhorando a arquitetura das plantas e a barreira física à penetração de fitopatógenos e de insetos (POZZA; POZZA, 2003; SANTOS et al., 2005). Os benefícios fisiológicos são pouco estudados, porém, alguns autores relatam que plantas adubadas com Si apresentam maior atividade fotossintética e resistência ao ataque de fitopatógenos e pragas, devido ao fato de o Si induzir uma série de reações metabólicas que atuam na defesa natural das plantas, resultando na formação de compostos fenólicos e de outras substâncias químicas, como fitoalexinas e ligninas (POZZA et al., 2004; LAING; ADANDONON, 2005).

O Si é considerado elemento benéfico (MALAVOLTA, 2006) e é assim definido por conferir às plantas aumento da resistência ao ataque de pragas e doenças e aumento na capacidade fotossintética, do número de folhas, do diâmetro de caules e do tamanho de plantas. O Si favorece a translocação do carbono para panículas e sementes, aumenta a eficiência de uso de água, com diminuição da transpiração e passagem mais rápida da fase vegetativa para a

fase reprodutiva de crescimento (EPSTEIN, 1999; ZUCCARINI, 2008). Os benefícios do Si incluem também melhor absorção de fósforo e aumento da tolerância à toxidez por Al, Mn, Fe, entre outros. Estes benefícios contribuem para o aumento da produtividade das culturas (MA et al., 2001; MA; TAKAHASHI, 2002).

O Si também promove resistência das plantas a condições de estresse salino e falta de água, isso por garantir integridade e estabilidade da membrana celular (ZUCCARINI, 2008).

2.5 Aclimatização

A etapa de aclimatização compreende a transferência das plântulas das condições assépticas da cultura de tecidos para um ambiente externo, normalmente uma casa de vegetação, para crescimento e desenvolvimento. Essa transferência deve ser feita sob condições controladas, para aumentar ao máximo a sobrevivência das plântulas. Um número expressivo de espécies vegetais micropropagadas não consegue sobreviver à transferência brusca do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* (HARARIKA, 2003). A mudança de um ambiente protegido, estéril, com açúcares e umidade saturada, para um ambiente não estéril, sem açúcares e com reduzida umidade, tem resultado em perda de muitas plantas, baixa taxa de crescimento e período prolongado na obtenção de plantas completamente aclimatizadas (SOUZA JÚNIOR et al., 2001).

Devido a estes efeitos, é necessário um processo de aclimatização que consiste em modificações morfológicas, anatômicas e fisiológicas das plantas, como forma de diminuir a possibilidade de estresse, para que as mesmas possam sobreviver e crescer vigorosamente em um novo ambiente (HARARIKA, 2003).

Segundo Zimmerman (1988), são as alterações no metabolismo da planta, de um estágio heterotrófico para autotrófico, que promovem as alterações

anatômicas e fisiológicas nas microplantas. Essas alterações, por sua vez, podem ser observadas na cutícula, na cera epicuticular, na não funcionalidade do aparato estomático e, conseqüentemente, na perda expressiva de água das células e na diminuição do processo fotossintético (POSPÍSILOVÁ et al., 2000). Por essa razão, a transferência para as condições naturais deve ser progressiva, evitando-se possíveis estresses (SILVA et al., 1995), uma vez que esse processo pode ser o fator limitante para o fechamento do ciclo da micropropagação.

As raízes produzidas *in vitro* são fracas e pouco funcionais, devendo ser substituídas o mais rápido possível, o que só ocorrerá se a planta for mantida com baixa transpiração (PIERIK, 1990). Para MacClelland (1990), as raízes formadas *in vitro* são pouco funcionais por não apresentarem pelos radiculares, além de propiciarem pobre conexão vascular com a parte aérea das plantas, resultando numa restrita transferência de água e nutrientes para a parte aérea, comprometendo o crescimento.

A aclimatização de plantas tem sido um grande entrave para a micropropagação de muitas espécies. Apesar de a bananeira apresentar um bom desempenho nesta etapa em diversas condições (PEREIRA et al., 2005), a otimização do processo pode melhorar ainda mais a eficiência na sobrevivência e vigor das mudas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. J. et al. Exigências climáticas. In: _____. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. rev. Brasília: EMBRAPA, 1999. p. 35-46.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2010. 129 p.
- ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA - Agriannual. São Paulo: Instituto FNP Consultoria e Comércio, 2009
- BAKRY, F. et al. Genetic improvement of banana. In: JAIN, S. M.; PRIYADARSHAN, P. M. (Ed.). **Breeding plantation tree crops: tropical species**. London: Springer, 2009. p. 3-46.
- CAMARGO, M. S.; KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H. S. Solubilidade do silício em solos: influência do calcário e ácido silícico aplicados. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 637-647, ago./set. 2007.
- DALLAGNOL, L. J. et al. Defective active silicon uptake affects some components of rice resistance to brown spot. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, n. 1, p. 116-121, Jan. 2009.
- DAYANANDAM, P.; KAUFMAN, P. B.; FRAKIN, C. I. Detection of silica in plants. **American Journal Botany**, Sto. Louis, v. 70, p.1079-1084, 1983.
- DIGNART, S. L. et al. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun. 2009.

DONATO, S. L. R. et al. Comportamento de variedades e híbridos de bananeira (*Musa* spp.) em dois ciclos de produção no Sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 139-144, abr. 2006.

ECHEVERRIGARAY, S. et al. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 257-276.

EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 641-664, June 1999.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2nd ed. Edington: Exegetics, 1996. Part. 1, 574 p.

GOMES, F.B. et al. Uso de silício como indutor de resistência em batata a *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 2, p.185-190, mar./abr. 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa/SNPH, 1998. v. 1, p.183-26.

GÜBBÜK, H.; PEKMEZCI, M. In vitro propagation of some new banana types (*Musa* spp.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Istanbul, v.28, p.355-361, Oct. 2004.

HARARIKA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Stamford, v.85, n.12, p.1704-1712, Dec. 2003.

HODSON, M.J. et al. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n.6, p.027–1046, Nov. 2005.

HOFFMANN, A. et al. Substratos na indução e desenvolvimento *in vitro* de raízes em dois porta-enxertos de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.11, p.1371-1379, nov. 2001.

KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H. S.; CAMARGO, M. S. **Silicatos de cálcio e magnésio**. 2. ed. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2002. 23 p. (Boletim Técnico, 1).

LAING, M. D.; ADANDONON, A. Silicon and insect management – Review. In: SILICON IN AGRICULTURE CONFERENCE, 3., 2005, Uberlândia. **Anais...**, Uberlândia: UFU/ICIAG, 2005. 152 p.

MA, J.F.; MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Silicon as a beneficial element for crop plant. In: DATNOFF, L. E.; KORNDÖRFER, G. H.; SNYDER, G. (Ed.). **Silicon in Agriculture**. New York: Elsevier science. 2001. p.17-39.

MA, J. F.; TAKAHASHI, E. **Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan**. Elsevier: New York, 2002. 274 p.

MA, J.F. et al. A silicon transporter in rice. **Nature**, London, v. 440, p. 688-691, Mar. 2006.

MacCLELLAND, M.T.; SMITH, M.A.L.; CAROTHERS, Z.B. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 23, n.2, p. 115-123, 1990.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Ceres, 1980. 215p.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638p.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. **Principles of plant nutrition**. 5th ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001. 849 p.

PEREIRA, M.C.T. et al. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n. 2, p. 238-240, ago. 2005.

PIERIK, R.L.M. Produccion de plantas libres de enfermedades. In: PIERIK, R.L.M. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Pronsa, 1990. p.169-180.

POSPÍSILOVÁ et al. Photosynthetic pigments and gas exchange during *ex vitro* acclimatization of tobacco plants as affected by CO₂ supply and abscisic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.61, p.125-133, May 2000.

POZZA, A.A.A. et al. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.2, p. 185-188, abr. 2004.

POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. Manejo de doença de plantas com macro e micronutrientes. **Revista Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v. 28, p. 52-54, 2003. Suplemento.

ROCHA et al. Propagação *in vitro* de bananeira ‘Prata anã (AAB)’: intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v.3, n.1, p. 10-17, 2007.

RODRIGUES, P. H. V. **Efeito do número de subcultivos na ocorrência de variação somaclonal em mudas de bananeira micropropagadas, das cultivares nanicão e grande naine**. 1996. 104 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Escola Superior “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

ROELS, S. et al. Optimization of plantain (Musa AAB) micropropagation by temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 82, n. 1, p. 57-66, July 2005.

RUGGIERO, C.; GOTTARDI, M. V. C.; NOGUEIRA FILHO, G. Propagação rápida da bananeira. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CULTURA DA BANANEIRA, São Paulo, 1994. **Anais...** São Paulo: Instituto Biológico, 1994. p. 37-50.

SANTOS, D. M. et al. Intensidade da cercosporiose em mudas de cafeeiro em função de fontes e doses de silício. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 582-588, nov./dez. 2005.

SILVA, A. T. et al. Aclimação de plantas provenientes da cultura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.1, p.49-53, 1995.

SILVA, S. O. et al. Banana breeding program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 4, p. 399-436, abr. 2001.

SILVA, S. de O.; FLORES, J. C. O.; LIMA NETO, F. P. Avaliação de cultivares e híbridos de bananeira em quatro ciclos de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1567-157, nov. 2002.

SILVA, S. de O. et al. **Programa de melhoramento de bananeira no Brasil: resultados recentes**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 36 p. (Documentos, 123).

SILVA, S. O.; PEREIRA, L. V.; RODRIGUES, M. G. V. Variedades. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 29, n. 245, p. 78-83, jul./ago. 2008.

SKIRVIN, R. M.; McPHEETERS, K. D.; NORTON, M. Sources and frequency of somaclonal variantion. **HortScience**, Alexandria, v. 29, p. 1232-1236, Nov. 1994.

SOUZA JÚNIOR, E. E.; BARBOZA, S. B. S. C.; SOUZA, L. A. C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimatação de plântulas de abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merrill] cv. Pérola. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.31, n.2, p.147-151, jun. 2001.

TORRES, A.C. et al. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa, 2001. 19p. (Circular Técnica, 24).

WIESE, H.; NIKOLIC, M.; ROMHELD, V. Silicon in plant nutrition. In: SATTELMACHER, B.; HORST, W.J. (Ed.). **The Apoplast of Higher Plants**: compartment of storage, transport and reactions. Dordrecht: Springer, 2007. p.33-47.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. **Acta Horticulture**, Leuven, v. 227, p. 489-499, 1988.

ZHOU, T. S. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, London, v. 75, n. 6, p. 605-607, Dec. 1995.

ZUCCARINI, P. Effects of silicon on photosynthesis, water relations and nutrient uptake of *Phaseolus vulgaris* under NaCl stress. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 52, n.1, p. 157-160, 2008.

CAPÍTULO 2

FONTES DE SILÍCIO NO DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE BANANEIRA 'MAÇÃ' MICROPROPAGADAS

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes fontes de silício durante a fase de enraizamento *in vitro* de bananeira 'Maçã' por meio de análise fisiológica, fitotécnica e ultraestrutural. Foram utilizados propágulos já estabelecidos *in vitro* e inoculados em meio Murashige & Skoog (MS) adicionado de 30g L⁻¹ de sacarose, 1mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) e solidificado com 1,8 g L⁻¹ de PhytigelTM. Foram testadas três fontes de silicato acrescidas ao meio MS, silicato de sódio, silicato de potássio e silicato de cálcio, na dosagem de 1g L⁻¹ e o meio MS sem silicato como testemunha. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quinze repetições. Os propágulos foram mantidos, por 45 dias, em sala de crescimento, sob condições controladas. Verificou-se aumento nos teores de clorofila a, b e total na presença de silicato de cálcio. A suplementação do meio de cultura com silicato de sódio promove aumento de comprimento, massa fresca e seca de parte aérea. O silício proporciona adequado desenvolvimento das plântulas.

Palavras-chave: *Musa* spp. Cultura de tecidos. Silicato.

ABSTRACT

The objective of the work was evaluating the effect of different sources of silicon during the *in vitro* rooting phase of 'Maçã' banana tree by means of physiological, phytotechnical and ultrastructural analysis. Propagules already established *in vitro* and inoculated in Murashige & Skoog (MS) medium, added of 30g L⁻¹ of sucrose, 1mg L⁻¹ of ANA (naftalenoacetic acid) and solidified with 1.8 g L⁻¹ of PhytigelTM. Three sources of silicate added to the MS medium, sodium silicate, potassium silicate and calcium silicate at the dosage of 1g L⁻¹ and the MS medium without silicate was a control were tested. The experimental design was the completely randomized with fifteen replicates. The propagules were kept for 45 days in a growth room under controlled conditions. Increase in the contents of a, b and total chlorophyll in the presence of calcium silicate was found. The supplementation of culture medium with sodium silicate promotes increase of length, fresh and dry mass of shoot. Silicon provides adequate development of seedlings.

Keywords: *Musa* spp. Tissue culture. Silicate.

1 INTRODUÇÃO

A banana tem destacada expressão econômica e social em todo o mundo, sendo considerada importante fonte de alimento e uma das frutas de maior consumo e produção, entre as fruteiras tropicais (DONATO et al., 2006).

A micropropagação de ápices caulinares é prática comum entre os produtores, permitindo a produção massal de propágulos com elevado padrão genético e fitossanitário, em períodos de tempo e espaço físico reduzidos, sem interrupção sazonal (GÜBBÜK; PEKMEZCI, 2004).

Embora o processo seja considerado uma tecnologia de ampla utilização e bem estabelecida para bananeira, ainda existem poucas informações sobre os efeitos advindos das modificações no ambiente de cultivo *in vitro*, especialmente pela utilização do silício, sobre as plantas micropropagadas.

O uso do silício *in vitro* promove efeitos benéficos às plantas, elevando o conteúdo de hemicelulose e lignina, aumentando, assim, a rigidez na parede celular, fazendo com que sejam obtidas elevadas taxas de sobrevivência de plantas na aclimatização (CAMARGO et al., 2007).

A ação benéfica do silício tem sido associada a diversos efeitos indiretos, como aumento da eficiência da capacidade fotossintética, redução da transpiração, crescimento das plantas e aumento da resistência mecânica das células (ZHOU, 1995).

Diante do exposto, objetivou-se, com a realização deste trabalho, avaliar fontes de silício no desenvolvimento *in vitro* de bananeira ‘Maçã’, por meio de análise fisiológica, fitotécnica e ultraestrutural, a fim de melhorar a qualidade das mudas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido entre os meses de maio e agosto de 2010, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, MG.

Material vegetal e descrição do ambiente de cultivo - Brotos de bananeira ‘Maçã’ já estabelecidos *in vitro* foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) adicionado de 30g L⁻¹ de sacarose, 1mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) e solidificado com 1,8 g L⁻¹ de Phytigel™. Três fontes de silicato foram adicionadas ao meio MS, silicato de sódio (Na₂SiO₃), silicato de potássio (K₂SiO₃) e silicato de cálcio (CaSiO₃), na dosagem de 1g L⁻¹ e o meio MS (sem adição de silicato) como testemunha. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e, em seguida, autoclavado, a 121°C e 1,2 atm, durante 20 minutos.

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os propágulos foram inoculados em frascos de 200 mL, contendo 30 mL do meio de cultivo MS modificado de acordo com o tratamento. Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno e plástico do tipo parafilme e mantidos em sala de crescimento convencional, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C, com intensidade de 52,5W m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes.

Após 45 dias, foram avaliados os parâmetros descritos a seguir.

Concentração de silício – Análise realizada no Laboratório de Fertilizantes, Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia. Folhas e raízes foram secas, em estufa ventilada, a 60°C, por 72 horas, até peso constante e moídas separadamente. A determinação de silício foi realizada pela metodologia proposta por Korndörfer et al. (2004). Para isso, 0,1 g da amostra (folhas ou raízes secas e moídas) foi pesada em tubo de polietileno e a esta adicionados 2,0 mL de 30% (v/v) de H₂O₂ e 3,0 mL de NaOH (25 mol

L⁻¹). Os tubos foram fechados e levados para digestão em autoclave, por 1 hora, a 123°C e 0,15 MPa. Após resfriamento, o volume foi completado com água deionizada. Desse extrato foi retirada uma alíquota de 1 mL, transferida para frasco com capacidade de 20 mL, com o volume completado com água deionizada. A concentração de silício foi determinada por método espectrofotométrico com monitoramento, a 410 nm, da cor amarela do ácido molibdosilícico formado após reação entre silício e molibdato de amônio em meio HCl.

Características fisiológicas – Análise realizada no Laboratório de Produtos Vegetais, Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras. Teores de clorofila a, b e total foram quantificados segundo a metodologia de Arnon (1949). Foram coletadas cinco folhas de cada tratamento, em que 0,5 g dos tecidos foliares foram macerados em nitrogênio líquido e colocados em acetona 80%. Em seguida, o material foi centrifugado, a 8.000 x g, por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado para determinação em espectrofotômetro (663 nm e 645 nm) dos conteúdos de pigmentos.

Características fitotécnicas – Compreende número de folhas, comprimento de parte aérea, em cm, massa fresca e seca de parte aérea, em g, comprimento de raiz, em cm e massa fresca e seca de raiz, em g. A massa seca do material vegetal foi realizada após secagem em estufa, a 60°C, por 72 horas, até peso constante.

Características ultraestruturais – Análise realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Amostras do terço mediano de 3 folhas em 5 plantas foram fixadas em Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO₄) e, em seguida, desidratados em soluções crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo então submetidas à secagem ao ponto crítico, utilizando-se CO₂ como líquido de transição (ROBARDS, 1978).

Posteriormente, foram recobertas com ouro (20 nm) e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura LEO-EVO, seguindo o protocolo de Alves (2004).

Delineamento experimental e análises estatísticas - O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos consistindo de 15 frascos cada um, sendo que cada frasco continha 2 explantes. 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.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de silício nas folhas e nas raízes de bananeira foram influenciados significativamente pelas fontes estudadas. A concentração de silício na folha foi maior com silicato de sódio (Na_2SiO_3) e cálcio (CaSiO_3) acrescido ao meio de cultivo (Tabela 1), devido à maior absorção destes elementos pelas raízes e posterior translocação para a parte aérea, justificando, assim, as baixas concentrações de silício observadas nas raízes destes tratamentos. Para o silicato de potássio (K_2SiO_3), o silício concentrou-se nas raízes, indicando reduzida distribuição e translocação para as folhas. Este fato pode justificar a baixa eficiência do silicato de potássio sobre as características fisiológicas e fitotécnicas estudadas.

Tabela 1 Concentração de silício em folhas (SiF) e raízes (SiR) de bananeira ‘Maçã’ cultivada *in vitro* por 45 dias

Fonte de silício	SiF (%)	SiR (%)
Testemunha	0,482 c	0,010 c
MS+ Na_2SiO_3	0,800 a	0,014 c
MS+ K_2SiO_3	0,562 b	0,150 a
MS+ CaSiO_3	0,820 a	0,030 b

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

De forma geral, o silício tende a concentrar-se nos tecidos de suporte/sustentação do caule, nas folhas e, em menores concentrações, nas raízes (ELAWAD; GREEN JUNIOR, 1979).

A presença de silício na testemunha (MS sem silício) pode ser explicada pelo fato de o silício ser um elemento muito abundante na natureza, estando presente em toda parte, inclusive na água (LUZ et al., 2006). No entanto, não há

como confirmar esta hipótese, pois não foi medida a quantidade de silício na água utilizada para o preparo do meio de cultura.

O tratamento com silicato de cálcio (CaSiO_3) adicionado ao meio MS apresentou maiores teores de clorofilas a, b e total (Tabela 2). No entanto, todas as fontes de silício utilizadas proporcionaram maiores teores de clorofilas, quando comparadas com a testemunha (MS sem silício). Maior relação clorofila a/b foi observada no meio MS sem silício.

Tabela 2 Teores de clorofila a, b, total e razão a/b em folhas de bananeira 'Maçã' cultivada *in vitro* por 45 dias, em meio de cultura contendo diferentes fontes de silício

Fonte de silício	Clorofila ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	A	b	total	a/b
Testemunha	9,45 d	3,08 d	12,54 d	3,06 a
MS+ Na_2SiO_3	10,85 b	3,76 c	14,62 b	2,88 b
MS+ K_2SiO_3	10,24 c	3,54 b	13,78 c	2,90 b
MS+ CaSiO_3	13,85 a	4,61 a	18,46 a	3,00 ab

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Resultado semelhante ao deste trabalho foi reportado por Adatia; Besford (1986), que observaram maiores níveis de clorofila em pepineiro quando utilizaram silicatos na propagação convencional desta cultura.

Segundo Epstein (2001), o uso de uma fonte de silício é capaz de aumentar o teor de clorofila das folhas e a tolerância das plantas aos estresses ambientais, como frio, calor, seca, desbalanço nutricional e toxicidade a metais, além de reforçar a parede celular e aumentar a resistência a patógenos e insetos.

Tais resultados demonstram os benefícios do uso de uma fonte de silício na micropropagação de bananeira, principalmente quanto a aparatos fotossintéticos, proporcionando maior nível de clorofila. Esses resultados são importantes, visto que a fase de aclimatização é de extrema importância para a cultura, ou seja, planta com um aparato fotossintético eficiente resultará em maior vigor das mudas e taxa de sobrevivência.

Houve diferença significativa para as variáveis fitotécnicas relacionadas à parte aérea (Tabela 3). Maior comprimento, massa fresca e massa seca de parte aérea foram observadas no tratamento com silicato de sódio (Na_2SiO_3). Já para as variáveis relacionadas à raiz, não houve diferença significativa, uma vez que o silício tende a acumular-se nas folhas, formando uma barreira protetora e regulando a perda de água da planta por evapotranspiração. O silício é prontamente absorvido pelas plantas e depositado principalmente nas paredes das células da epiderme (KORNDÖRFER, 2006). Resultados semelhantes a estes foram observados em morangueiro ‘Oso Grande’ micropropagado em meio MS contendo diferentes fontes de silício, por Braga et al. (2009), que obtiveram maior número de folhas, massa fresca e massa seca no tratamento com adição de silicato de sódio ao meio MS.

Tabela 3 Número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa seca de parte aérea (MSPA), massa fresca de raiz (MFR) e massa seca de raiz (MSR) de bananeira ‘Maçã’ cultivada *in vitro* por 45 dias, em meio de cultura com diferentes fontes de silício

Fonte de silício	NF	CPA (cm)	CR (cm)	MFPA (g)	MSPA (g)	MFR (g)	MSR (g)
Testemunha	3,22 a	8,54 b	6,11 a	1,46 b	0,36 b	1,24 a	0,23 a
MS+ Na_2SiO_3	3,70 a	11,29 a	6,81 a	1,63 a	0,48 a	1,33 a	0,22 a
MS+ K_2SiO_3	3,55 a	10,15 ab	6,38 a	1,44 b	0,35 b	1,23 a	0,21 a
MS+ CaSiO_3	3,65 a	10,35 ab	6,15 a	1,48 b	0,35 b	1,22 a	0,26 a

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Quanto às características ultraestruturais, a testemunha (MS sem silício) apresentou deformações na epiderme em relação aos tratamentos que continham fontes de silício, tanto na superfície adaxial (Figuras 1A, 1B, 1C e 1D) como na superfície abaxial (Figuras 2A, 2B, 2C e 2D). Houve deformação das células da epiderme nas plantas do tratamento sem silício, pois este nutriente pode se depositar nas paredes celulares dessas células e conferir resistência ao tecido (PIWPUAN; THAMMATHAWORN, 2008). Assim, a má formação dessas células pode ter ocasionado deformações estruturais, as quais não se restringem apenas à epiderme, mas, possivelmente, ao parênquima, devido a um aumento da sinuosidade dessas paredes. A presença do silício conferiu às plantas o correto arranjo das células da epiderme, sem que houvesse desidratação dos tecidos que, por sua vez, prejudica o processo de aclimatização.

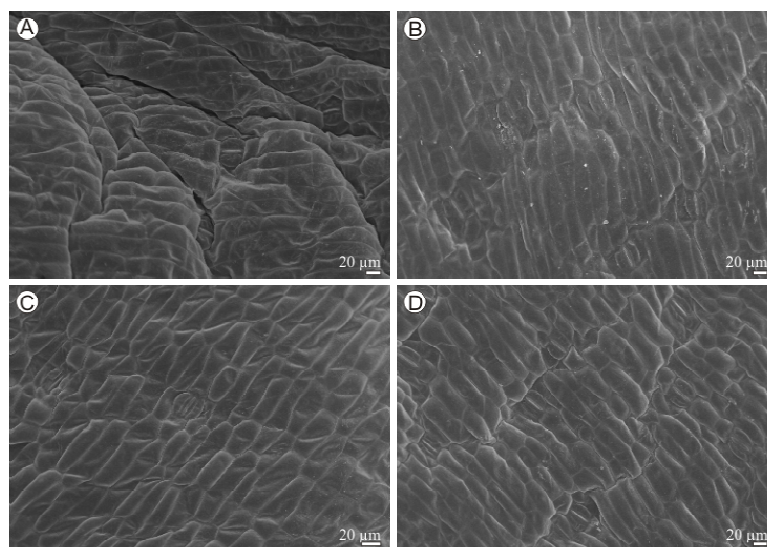


Figura 1 Eletromicrografia da superfície adaxial de folhas de bananeira submetidas a diferentes fontes de silício: testemunha sem silício (A), silicato de sódio (B), silicato de potássio (C) e silicato de cálcio (D)

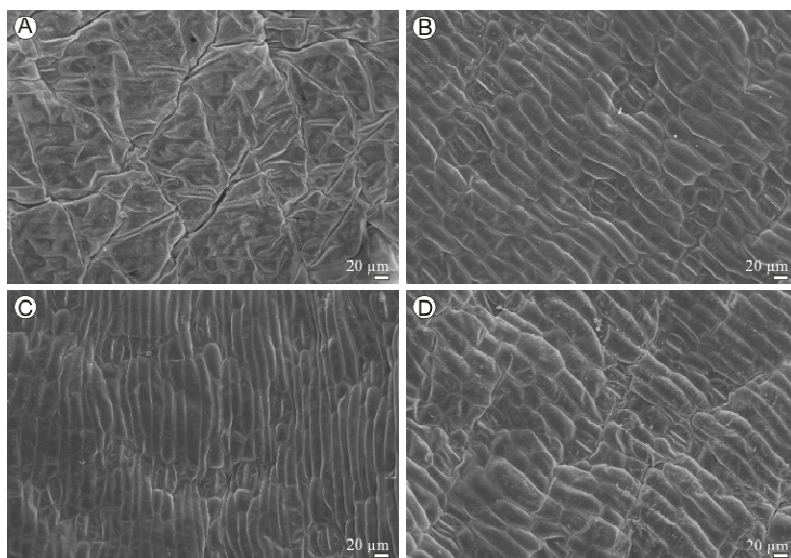


Figura 2 Eletromicrografia da superfície abaxial de folhas de bananeira submetidas a diferentes fontes de silício: testemunha sem silício (A), silicato de sódio (B), silicato de potássio (C) e silicato de cálcio (D)

De modo geral, informações a respeito das contribuições acerca da estrutura foliar e do crescimento das plantas podem contribuir para um melhor entendimento ou, mesmo, permitir a elucidação de lacunas relativas às diferenças nas taxas de crescimento de plantas (SCHLUTER et al., 2003). Adicionalmente, as alterações que ocorrem na estrutura interna das folhas constituem aspectos determinantes na capacidade de aclimatização das espécies (HANBA et al., 2002). Assim, a presença do silício no cultivo *in vitro* neste trabalho proporcionou benefícios estruturais que fizeram com que a planta mantivesse um correto desenvolvimento.

4 CONCLUSÃO

A presença do silício na estrutura foliar proporciona adequado desenvolvimento de bananeira 'Maçã' micropropagada.

REFERÊNCIAS

ADATIA, M.H.; BESFORD, R.T. The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. **Annals of Botany**, London, v. 58, n. 3, p. 343-351, Mar. 1986.

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88 p.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolates choroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, n. 1, p. 1-15, Jan. 1949.

BRAGA, F. T. et al. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 128-132, fev. 2009.

CAMARGO, M. S.; KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H. S. Solubilidade do silício em solos: influência do calcário e ácido silícico aplicados. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 637-647, ago. 2007.

DONATO, S. L. R. et al. Comportamento de variedades e híbridos de bananeira (*Musa spp.*) em dois ciclos de produção no Sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 139-144, abr. 2006.

ELAWAD, S. H.; GREEN JUNIOR, V. E. Silicon and the rice plant environment: a review of recent research. **Revista IL RISO**, v. 28, p. 235-253, 1979.

EPSTEIN, E. Silicon in plants, facts vs. Concepts. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier, 2001. p. 1-15.

FERREIRA, D. F. **Sisvar 4.3**: sistema de análises de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Lavras: UFLA/DEX, 2000.

GÜBBÜK, H.; PEKMEZCI, M. In Vitro Propagation of Some New Banana Types (*Musa* spp.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Istanbul, v.28, p.355-361, 2004.

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.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, n. 15, p. 137-138, Apr. 1965.

KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H. S.; NOLLA, A. **Análise de silício**: solo planta e fertilizante. Uberlândia, GPSi-ICIAG-UFU, Boletim Técnico; 02. 50 p., 2004.

KORNDÖRFER, G. H. Elementos benéficos. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. Cap.14, p.355-370.

LUZ, J. M. Q. et al. Produção hidropônica de alface em solução nutritiva com e sem silício. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.24, n.3, p. 295-300, Sept. 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

PIWPUAN, N.; THAMMATHAWORN, A. Leaf and root anatomy of *acriopsis reinw. ex blume* (Orchidaceae) in Thailand. **KKU Science Journal**, Khon Kaen, v. 36, n. 62, p. 58-63, Jan. 2008. Supplement.

ROBARDS, A. W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: HALL, J. L. (Ed.). **Electron microscopy and cytochemistry of plant cells**. New York: Elsevier, 1978. p. 343-444.

SCHLUTER, U. et al. Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 383, p. 867-874, Feb. 2003.

ZHOU, T. S. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, London, v. 75, n. 6, p. 605-607, Dec. 1995.

CAPÍTULO 3

MODIFICAÇÕES NA ANATOMIA FOLIAR DE BANANEIRAS ‘MAÇÃ’ SUBMETIDAS A DIFERENTES FONTES DE SILÍCIO *IN VITRO*

RESUMO

O silício é um elemento benéfico para as plantas e interfere nas características anatômicas da superfície foliar. Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar as diferenças morfológicas nas plantas em consequência do uso do silício adicionado ao meio para o cultivo *in vitro* de bananeira ‘Maçã’. Brotos de bananeira já estabelecidos *in vitro* foram inoculados em meio Murashige & Skoog (MS), adicionado de 30g L⁻¹ de sacarose, 1mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) e solidificado com 1,8 g L⁻¹ de PhytigelTM. Testaram-se três fontes de silicato acrescidas ao meio MS, silicato de sódio, silicato de potássio e silicato de cálcio, na dosagem de 1g L⁻¹ e o meio MS sem adição de silicato como testemunha. Após 45 dias, foram avaliadas as características anatômicas. O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições, totalizando quatro tratamentos. Maior número de estômatos e relação diâmetro polar e equatorial são obtidos utilizando-se fonte de silício ao meio. A adição de silicato de cálcio proporciona maiores espessuras de epiderme superior e inferior, mesofilo, parênquima paliçádico e aumenta a taxa fotossintética. O uso de silício favorece a anatomia foliar de bananeira ‘Maçã’ micropropagada.

Palavras-chave: *Musa* spp. Alterações estruturais. Silicato.

ABSTRACT

Silicon is an element beneficial to plants and interferes in the anatomical characteristics of the leaf surface. The objective of this work was verifying the morphologic differences in the plants whereupon the use of silicon added to the medium for *in vitro* cultivation of 'Maçã' banana tree. Banana tree shoots already established *in vitro* were inoculated in Murashige & Skoog medium (MS), added of 30g L⁻¹ of sucrose, 1mg L⁻¹ of ANA (naftalenoacetic acid) e solidified with 1.8 g L⁻¹ of PhytigelTM. Three sources of silicate added to the MS medium, sodium silicate, potassium silicate and calcium silicate at the dosage of 1g L⁻¹ and the MS medium without the addition of silicate as a control. After 45 days, the anatomical characteristics were evaluated. The design was completely randomized with five replicates, amounting to four treatments. Increased number of stomata and relation polar and equatorial diameter are obtained by using source of silicon to the medium. Addition of calcium silicate provides greater thicknesses of the upper and lower epidermis, mesophyll, palisade parenchyma and increases the photosynthetic rate. The use of silicon supports the leaf anatomy of micropropagated 'Maçã' banana tree.

Keywords: *Musa* spp. Structural alterations. Silicate.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, o cultivo de ápices caulinares e de meristemas por meio do processo de micropropagação tem constituído a base da propagação massal de mudas de bananeiras (GÜBBÜK; PEKMEZCI, 2004). A técnica da cultura de tecidos possibilita uma produção em larga escala, de plantas livre de doenças, para fornecimento a viveiristas e produtores de banana.

Apesar de seus benefícios para a produção de mudas, o cultivo *in vitro*, sob condições heterotróficas convencionais, promove nas plantas o desenvolvimento de certas características morfofisiológicas indesejáveis, tais como reduzida deposição de cera epicuticular e diferenciação do mesofilo, feixes vasculares rudimentares e baixo controle de abertura e fechamento dos estômatos (ROMANO; MARTINS-LOUÇÃO, 2003). Todas essas alterações são proporcionadas por complexas condições formadas na atmosfera dos frascos de cultivo, incluindo reduzida irradiância, presença de carboidrato exógeno, baixa disponibilidade de CO₂, alta umidade relativa e baixas trocas gasosas com o ambiente *ex vitro* (ARGITA et al., 2002).

A composição do meio de cultura tem importante função nas respostas de crescimento de células e tecidos. Plantas ou explantes cultivados *in vitro* têm exigências nutricionais específicas e requerem meios nutritivos compostos por minerais, vitaminas e fontes de energia. Os meios de cultura podem ainda ser modificados de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e espécie (TORRES et al., 2001).

O silício é um elemento classificado como benéfico para as plantas e, de acordo com Epstein (1999), as plantas cultivadas em ambiente enriquecido com silício diferem das cultivadas na ausência deste elemento, principalmente quanto à composição química, à resistência mecânica das células, às características de

superfície foliar, à tolerância aos estresses bióticos e abióticos e à resistência a pragas e doenças.

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar, por meio da anatomia foliar, as diferenças morfológicas nas plantas em consequência do uso do silício adicionado ao meio de cultura para o cultivo *in vitro* de bananeira ‘Maçã’.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido entre os meses de maio e outubro de 2010, nos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura e de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

Material vegetal e descrição do ambiente de cultivo - Brotos de bananeira ‘Maçã’ já estabelecidos *in vitro* foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionado de 30g L⁻¹ de sacarose, 1mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) e solidificado com 1,8 g L⁻¹ de PhytigelTM. Foram testadas três fontes de silicato acrescidas ao meio MS, silicato de sódio (Na₂SiO₃), silicato de potássio (K₂SiO₃) e silicato de cálcio (CaSiO₃), na dosagem de 1g L⁻¹ e o meio MS sem adição de silicato como testemunha. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 121°C e 1,2 atm, durante 20 minutos.

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os propágulos foram inoculados em frascos de 200 mL, contendo 30 mL do meio de cultivo MS modificado de acordo com o tratamento. Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno e plástico do tipo parafilme. Após a inoculação, estes foram mantidos em sala de crescimento convencional, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C, com intensidade de 52,5W m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes.

Após 45 dias, os tratamentos foram avaliados quanto à anatomia foliar e à taxa fotossintética e transpiratória.

Os estudos anatômicos foram conduzidos utilizando-se o terço médio da segunda folha completamente expandida, coletadas de cinco plantas diferentes por tratamento, previamente fixadas em FAA 70% (formaldeído - ácido acético glacial - álcool etílico 70%) (JOHANSEN, 1940), por 72 horas e,

posteriormente, conservadas em etanol 70% (v v⁻¹). As secções transversais foram obtidas em micrótomo de mesa tipo LPC e as secções paradérmicas à mão livre, com uso de lâmina de aço, que foram submetidos à clarificação com hipoclorito de sódio (1%-1,25% de cloro ativo), tríplex lavagem em água destilada, coloração com solução safrablau (azul de astra 0,1% e safranina 1%), para as secções transversais e safranina 1%, para as secções paradérmicas, sendo, posteriormente, montados em lâminas semipermanentes com água glicerinada (KRAUS; ARDUIN, 1997).

As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio óptico modelo Olympus BX 60 acoplado à câmera digital Canon A630. As imagens foram analisadas em software para análise de imagens UTHSCSA Imagetool, com a medição de cinco campos por repetição para cada variável analisada. Foram medidas: EAB = espessura da epiderme da face abaxial; EAD = espessura da epiderme da face adaxial; HAB = espessura da hipoderme da face abaxial; HAD = espessura da hipoderme da face adaxial; MF = espessura do mesofilo; PP = espessura do parênquima paliçádico; PE = espessura do parênquima esponjoso e PP/PE = proporção entre o parênquima paliçádico e esponjoso. Para a caracterização dos estômatos, foram analisados a densidade estomática (número de estômatos por mm²) e os diâmetros polar e equatorial, obtidos em microscópio Olympus CBB e Ken-a-vision 2100.

As taxas fotossintética e transpiratória das plantas foram avaliadas com analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA) modelo LI-6400. Para a avaliação dessas variáveis, foram selecionadas folhas completamente expandidas em sete plantas por tratamento, a partir 10h00, tendo a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos sido fixada na câmara do aparelho para 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições, e 15 e 12 campos para as secções transversais e paradérmicas,

respectivamente. Os dados obtidos foram analisados por meio do programa estatístico Sisvar 4.3 (FERREIRA, 2000) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as observações anatômicas, as folhas de bananeira 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 (Figura 1).

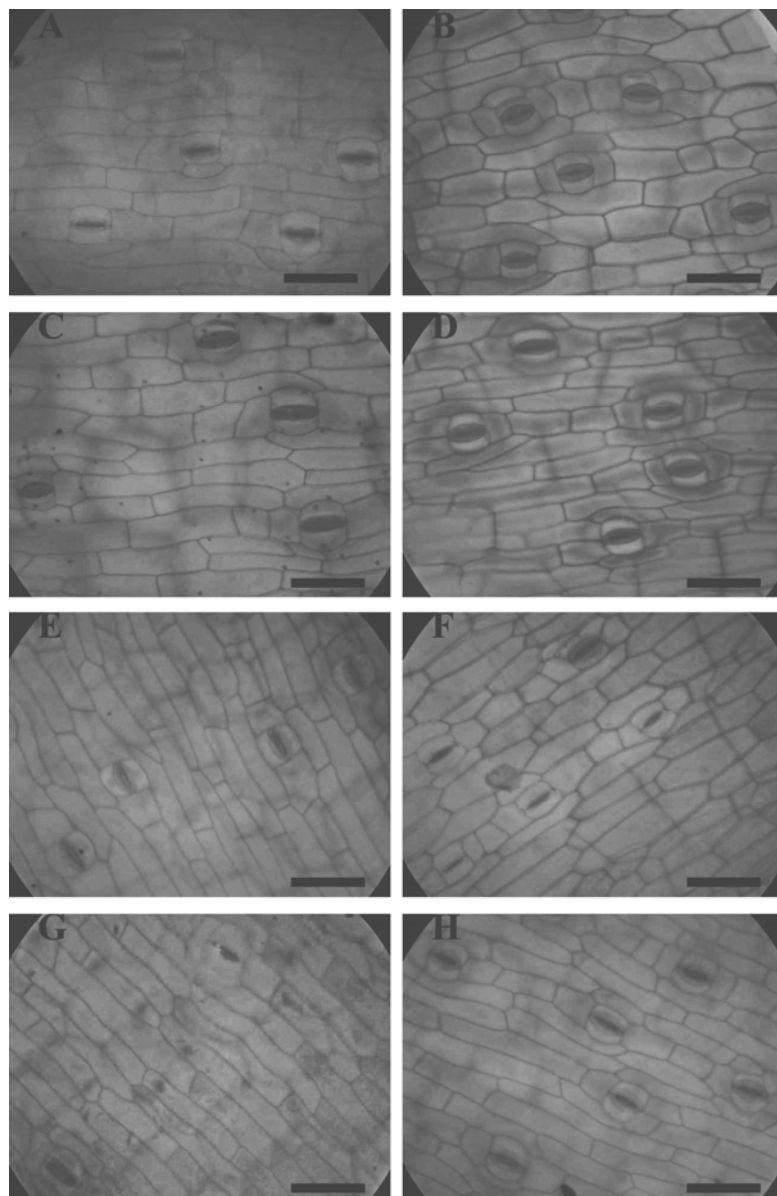


Figura 1 Secções paradérmicas da face abaxial (A-D) e face adaxial (E-H) de folhas de bananeira ‘Maçã’ cultivada *in vitro*, por 45 dias, em meio de cultura contendo diferentes fontes de silício. A, E = Testemunha, B, F = Na₂SiO₃, C, G = K₂SiO₃, D, H = CaSiO₃. Barras = 50 µm.

Os estômatos estão distribuídos em ambas as superfícies da epiderme, porém, em maior número na superfície abaxial (Tabela 1). Esta característica classifica a bananeira como anfi-hipoestomática e está de acordo com Sandoval et al. (1994) e Costa et al. (2009).

Tabela 1 Densidade estomática da superfície adaxial e abaxial de folhas de bananeira ‘Maçã’ cultivada *in vitro*, por 45 dias, em meio de cultura contendo diferentes fontes de silício

Fonte de silício	Número de estômatos por mm ²	
	Epiderme adaxial	Epiderme abaxial
Testemunha	56,13 b	70,88 a
MS+Na ₂ SiO ₃	69,53 a	71,52 a
MS+K ₂ SiO ₃	53,46 b	55,54 b
MS+CaSiO ₃	71,40 a	75,99 a

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Quanto ao número de estômatos por mm², maiores resultados para a superfície adaxial ocorreram em plântulas cultivadas na presença de silicato de cálcio e sódio, as quais não apresentam diferença significativa entre si. Maior número de estômatos por mm² na superfície abaxial foi observado nos tratamentos com silicato de cálcio, sódio e na testemunha, os quais não apresentaram diferenças significativas (Tabela 1).

O aumento na densidade estomática nas folhas das plantas cultivadas *in vitro*, comparado ao de folhas de plantas mantidas em ambiente natural, tem sido reportado em diversas espécies, estando associado, principalmente, à elevada umidade relativa no interior dos recipientes de cultivo e à reduzida intensidade de luz (KHAN et al., 2003). Para Hazarika (2006), a baixa intensidade de luz

utilizada durante o cultivo *in vitro*, aliada ao acúmulo de etileno e à elevada concentração de sacarose no meio de cultura, é um dos principais responsáveis pela elevação na densidade de estômatos, acompanhada da reduzida capacidade de fechamento dos ostíolos. Para o mesmo autor, o reduzido controle estomático e a alta frequência de estômatos têm sido consideradas as principais causas da rápida dessecação das plantas durante a fase de aclimatização.

Para o diâmetro dos estômatos, maior diâmetro polar da superfície adaxial ocorreu na presença de silicato de potássio e na testemunha, enquanto maior diâmetro equatorial foi obtido com silicato de cálcio e também na testemunha. No entanto, maior relação diâmetro polar e diâmetro equatorial foi observada na presença dos silicatos de sódio e potássio.

Para a superfície abaxial, a testemunha e o meio com silicato de potássio apresentaram maior diâmetro polar, ao passo que maior diâmetro equatorial ocorreu na presença dos silicatos de cálcio e sódio. Maior relação diâmetro polar e diâmetro equatorial foi verificada com silicato de potássio e na testemunha (Tabela 2).

Tabela 2 Diâmetro polar (DP) e equatorial (DE) dos estômatos e relação DP/DE de folhas de bananeira 'Maçã' cultivada *in vitro*, por 45 dias, em meio de cultura contendo diferentes fontes de silício

Fonte de silício	Epiderme adaxial (μm)			Epiderme abaxial (μm)		
	DP	DE	DP/DE	DP	DE	DP/DE
Testemunha	29,08 a	14,51 a	2,01 b	30,22 a	11,70 b	2,61 a
MS+Na ₂ SiO ₃	27,91 b	12,58 b	2,26 a	28,57 b	13,86 a	2,06 b
MS+K ₂ SiO ₃	29,77 a	12,45 b	2,31 a	31,69 a	12,31 b	2,58 a
MS+CaSiO ₃	27,36 b	14,22 a	1,94 b	29,26 b	14,36 a	2,04 b

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Khan et al. (2002) afirmam que a relação diâmetro polar e diâmetro equatorial (DP/DE) está associada ao formato das células-guarda e constitui uma importante particularidade sobre a funcionalidade dos estômatos, visto que a forma elíptica (maior DP/DE) é característica de estômatos funcionais, ao passo que a forma arredondada (menor DP/DE) está associada a estômatos que não apresentam funcionalidade normal. No entanto, cada espécie e condição de cultivo podem apresentar um resultado específico.

Resultados semelhantes a estes foram obtidos por Braga (2009a) que verificou maior número de estômatos, diâmetro polar e relação DP/DE utilizando fonte de silício na micropropagação de abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’ (*Ananas comosus* (L.) Merr).

Quanto à organização do mesofilo, a bananeira é uma espécie classificada como dorsiventral ou bifacial, com o parênquima paliçádico voltado para a epiderme adaxial e imediatamente abaixo da hipoderme adaxial, e o parênquima esponjoso dirigido à epiderme abaxial, o que se confirmou neste trabalho (Figura 2). As células do parênquima paliçádico são tipicamente alongadas, dispostas em fileiras, apresentando uma ou mais camadas de células. Já para o parênquima esponjoso, as células não são bem definidas (COSTA et al., 2009).

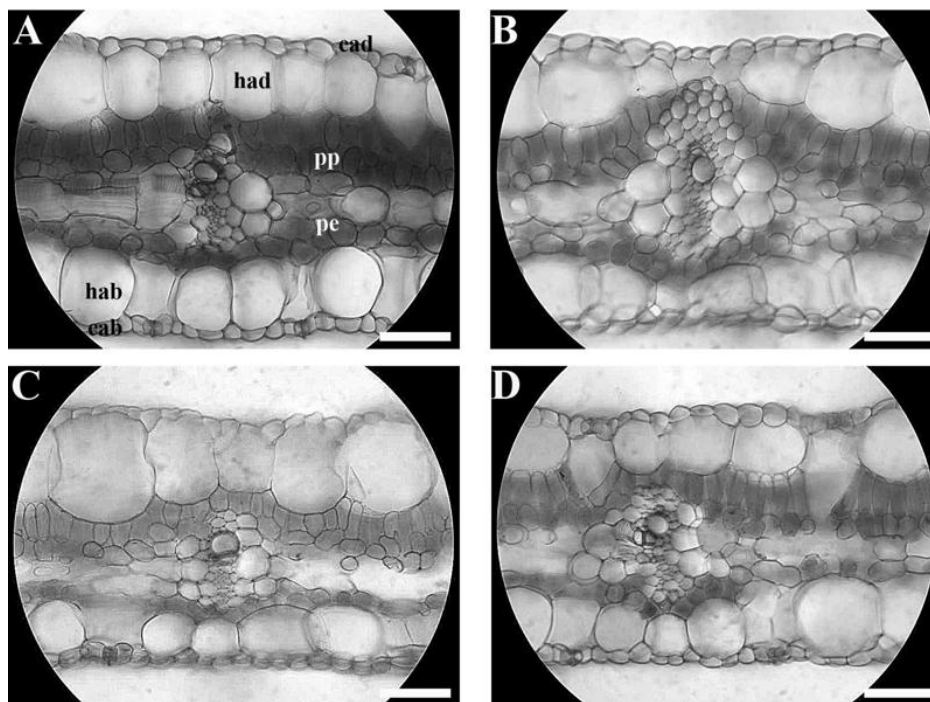


Figura 2 Eletromicrografias de secções transversais de folhas de bananeira ‘Maçã’ cultivada *in vitro* com diferentes fontes de silício. (A) MS, (B) Na_2SiO_3 , (C) K_2SiO_3 , (D) CaSiO_3 . ead = epiderme da face adaxial; eab = epiderme da face abaxial; had = hipoderme da face adaxial; hab = hipoderme da face abaxial; PP = parênquima paliçádico; pe = parênquima esponjoso. Barras = $100\mu\text{m}$.

As características avaliadas relacionadas com o espessamento dos tecidos mostraram efeitos significativos para todos os parâmetros, exceto para o parênquima esponjoso (Tabela 3).

Tabela 3 Modificações na espessura dos tecidos foliares de bananeira ‘Maçã’ cultivada *in vitro*, por 45 dias, em meio de cultura contendo diferentes fontes de silício

Fonte de silício	Epiderme abaxial (µm)	Epiderme adaxial (µm)	Hipoderme abaxial (µm)	Hipoderme adaxial (µm)	Mesofilo (µm)	Parênquima paliçádico (PP) (µm)	Parênquima esponjoso (PE) (µm)	PP/PE
Testemunha	18,70b	20,74b	095,08a	099,19b	340,31b	72,62b	95,69a	0,78c
MS+Na ₂ SiO ₃	20,08b	21,45b	084,45b	131,03a	357,62b	66,91c	91,75a	0,75c
MS+K ₂ SiO ₃	20,11b	22,45b	084,23b	136,65a	359,14b	73,78b	87,37a	0,89b
MS+CaSiO ₃	25,38a	28,55a	103,29a	135,26a	400,57a	93,30a	94,21a	1,03a

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott- Knott, a 5% de probabilidade.

Para a epiderme, maior espessura nas superfícies adaxial e abaxial foi observada nas plântulas cultivadas na presença de silicato de cálcio. Quanto à espessura das hipodermes, todos os tratamentos que continham silício apresentaram maiores espessuras da superfície adaxial. Para a superfície abaxial, maior espessura foi obtida nos tratamentos com silicato de cálcio e na testemunha (Tabela 3).

Epstein (1999) relata que, ao ser acumulado pelas plantas, o silício proporciona mudanças anatômicas nos seus tecidos, como o surgimento de células epidérmicas mais espessas, em decorrência da deposição de sílica. No entanto, Botelho et al. (2009) não detectaram diferenças significativas nas espessuras da epiderme e do parênquima esponjoso utilizando diferentes doses de ácido silícico em cafeeiro.

Quanto à espessura do parênquima paliçádico, maior espessamento foi observado utilizando silicato de cálcio. De acordo com Alquini et al. (2006), os parênquimas paliçádico e esponjoso são parênquimas clorofilianos que têm a característica principal de serem fotossintetizantes, devido à presença de cloroplastos que, por sua vez, convertem energia luminosa em química, armazenando-a na forma de carboidratos. Sendo assim, a falta de diferenciação pode resultar em baixa eficiência fotossintética e, conseqüentemente, problemas durante a fase de aclimatização.

Braga et al. (2009b) também obtiveram resultados satisfatórios utilizando silício no cultivo *in vitro* de morangueiro. Maiores espessuras de parênquima esponjoso, paliçádico e mesófilo foram observadas utilizando-se fonte de silício no meio MS.

Muitos resultados obtidos neste trabalho corroboram os de outros autores, como Sandoval et al. (1994) e Costa et al. (2009), os quais evidenciaram que plantas micropropagadas apresentam epiderme pouco espessa, com células irregulares em tamanho e com sinuosidade, hipoderme formada por extensas

células, falta de diferenciação entre os parênquimas paliçádico e esponjoso e uma fina camada de cutícula.

Não ocorreram diferenças significativas para a taxa transpiratória. Contudo, observa-se que, nas plântulas cultivadas na presença de silicato de cálcio, houve aumento na taxa fotossintética, quando comparadas com os demais tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 Taxa fotossintética (A) e transpiratória (E) em folha de bananeira ‘Maçã’ cultivada *in vitro*, por 45 dias, em meio de cultura contendo diferentes fontes de silício

Fonte de silício	A ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Testemunha	0,35 b	0,27 a
MS+Na ₂ SiO ₃	0,95 b	0,16 a
MS+K ₂ SiO ₃	0,23 b	0,46 a
MS+CaSiO ₃	1,56 a	0,40 a

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

A fotossíntese pode variar conforme o ambiente de cultivo da planta e as duas principais limitações ambientais para a taxa fotossintética são a disponibilidade de CO₂ e a de radiação (ZHOU; HAN, 2005). Como a quantidade de radiação foi fixada na câmara do IRGA ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$), o aumento na taxa fotossintética observado para as plântulas cultivadas com silicato de cálcio pode estar relacionado com adaptações morfológicas que favoreçam a captação de CO₂ e o aproveitamento da radiação incidente nas folhas. Dessa forma, a adição de silicato de cálcio pode ter promovido um aumento na taxa fotossintética, por promover um aumento na densidade estomática (Tabela 1) que favoreceu o fluxo de CO₂ para o interior da folha, bem como um espessamento do parênquima paliçádico (Tabela 3) que permitiu maior aproveitamento da radiação incidente. Esses resultados demonstram que a adição

de silicato de cálcio é importante na melhoria na estrutura interna das folhas de bananeira ‘Maçã’.

A transpiração não se modificou na presença do silício, provavelmente, pelas condições de alta umidade relativa do ar dentro dos frascos de cultivo.

Com os resultados apresentados, pode-se inferir que a adição de silício ao meio de cultivo é benéfica para as características anatômicas, em que os fatores que regulam a perda de água na planta são favorecidos quando se acrescenta silicato ao meio.

Adicionalmente, as alterações que ocorrem na estrutura interna das folhas constituem aspectos determinantes na capacidade de aclimatização das espécies (HANBA et al., 2002).

4 CONCLUSÃO

O uso de silício favorece a anatomia foliar de bananeira 'Maçã' micropropagada.

REFERÊNCIAS

ALQUINI, Y. et al. Epiderme In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p.87-108.

ARGITA, L.; GONZALEZ, A.; TAMÉS, R. S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transplantation of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v.115, n.1, p.166-173, May 2002.

BOTELHO, D. M. S. et al. Aspectos anatômicos e fisiológicos de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) com cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke) adubadas com ácido silícico. **Coffee Science**, Lavras, v. 4, n.2, p. 93-99, jul./dez. 2009.

BRAGA, F. T. **Silício, luz e substrato na micropropagação de abacaxizeiro [Ananas comosus (L.) Merr 'Gomo de Mel']**. 2009. 95 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

BRAGA, F. T. et al. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 128-132, fev. 2009.

COSTA, F. H. S. et al. Alterações anatômicas de bananeiras micropropagadas em resposta a aclimatização *ex vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n.2, p. 386-392, mar./abr. 2009.

EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 641-664, June 1999.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3**: sistema de análises de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

GÜBBÜK, H.; PEKMEZCI, M. In Vitro Propagation of Some New Banana Types (*Musa* spp.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Istambul, v.28, n.5, p.355-361, 2004.

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**, New York, v. 25, n. 8, p. 1021-1030, Aug. 2002.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.108, p.105-120, 2006.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill, 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**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 141-146, Nov. 2002.

KHAN, S. V. et al. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 46, n. 2, p. 161-166, Sept. 2003.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 1997. 198 p.

ROMANO, A.; MARTINS-LOUÇÃO, M.A. Water loss and morphological modifications in leaves during acclimatization of Cork Oak micropropagated plantlets. **Acta Horticulturae**, 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**, Les Ulis, v.49, n.1, p.37-46, 1994.

TORRES, A. C. et al. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2001. 20p. (Circular Técnica).

ZHOU, Y. M.; HAN, S. J. Photosynthetic response and stomatal behaviour of *Pinus koraiensis* during the fourth year of exposure to elevated CO₂ concentration. **Photosynthetica**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 445-449, Sept. 2005.

CAPÍTULO 4

ACLIMATIZAÇÃO DE BANANEIRA ‘GRANDE NAINÉ’ EM RESPOSTA A DIFERENTES FONTES DE SILÍCIO *IN VITRO*

RESUMO

Pesquisas acerca das modificações estruturais e fisiológicas inerentes ao processo de aclimatização são fundamentais para compreender os efeitos desta fase. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes fontes de silício no enraizamento *in vitro* de bananeira ‘Grande Naine’ sobre características bioquímicas, fitotécnicas e ultraestruturais, durante o processo de aclimatização. Para tanto, brotos de bananeira já estabelecidos *in vitro* foram inoculados em meio Murashige & Skoog (MS), com adição de 30g L⁻¹ de sacarose, 1mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) e solidificado com 1,8 g L⁻¹ de PhytigelTM. Foram testadas três fontes de silicato acrescidas ao meio MS, silicato de sódio, silicato de potássio e silicato de cálcio, na dosagem de 1g L⁻¹ e o meio MS sem silicato como testemunha. Decorridos 45 dias do enraizamento *in vitro*, as plantas foram mantidas em casa de vegetação por 60 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. O uso do silício no cultivo *in vitro* é benéfico durante a aclimatização de plantas de bananeira. Silicatos de cálcio e potássio aumentam os teores de clorofila a, b e total. Maiores teores de celulose e taninos são obtidos com silicato de sódio. Verificou-se maior diâmetro do pseudocaule, massa fresca e seca de parte aérea e massa fresca de raiz utilizando fonte de silício.

Palavras-chave: *Musa* spp. Cultivo *in vitro*. Cera epicuticular.

ABSTRACT

Research about structural and physiological modifications inherent to the acclimatization process is fundamental to understand the effects of this phase. The objective of this work was evaluating different sources of silicon in the *in vitro* rooting of the 'Grande Naine' banana tree on the biochemical, phytotechnical and ultrastructural characteristics during the acclimatization process. For such, banana tree seedlings already established *in vitro* were inoculated in Murashige & Skoog medium (MS) with the addition of 30g L⁻¹ of sucrose, 1mg L⁻¹ of ANA (naftalenoacetic acid) and solidified with 1.8 g L⁻¹ of PhytigelTM. Three sources of silicate added to the MS medium, namely sodium silicate, potassium silicate and calcium silicate at the dosage of 1g L⁻¹ and to the MS medium without silicate as a control were tested. Elapsed 45 days from the *in vitro* rooting, the plants were kept in a greenhouse for 60 days. The experimental design was completely randomized. Use of silicon in *in vitro* rooting is beneficial during the acclimatization of banana plants. Calcium and potassium silicates increased the contents of a, b and total chlorophylls. Increased contents of cellulose and tannins are obtained with sodium silicate. Larger diameter of the pseudostem, fresh and dry mass of the shoot and fresh mass of root was found by making use of source of silicon.

Keywords: *Musa* spp. *In vitro* cultivation. Epicuticular wax.

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais aspectos que limitam a expansão da bananicultura no Brasil é a utilização de mudas provenientes de métodos convencionais de propagação que, além da baixa taxa de multiplicação (3 a 8 filhotes por matriz/ciclo), possibilita a disseminação de pragas e doenças (ROELS et al., 2005).

A micropropagação é um método de propagação vegetativa amplamente estudado nas mais diversas espécies vegetais, sendo a modalidade dentro da cultura de tecidos a que mais tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas. Entre as vantagens de sua utilização, estão a possibilidade de obtenção de várias plantas a partir de um explante inicial, independentemente da estação do ano; a redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; as melhores condições sanitárias por meio do cultivo de meristemas para eliminação de doenças e a reprodução do genótipo da planta-mãe, entre outras (ERIG; SCHUCH, 2005). Entretanto, o emprego da micropropagação em escala comercial na produção de mudas pode ser limitado, devido ao elevado custo para obtenção da muda e baixas taxas de sobrevivência na fase de aclimatização.

Por essa razão, uma fase de aclimatização logo após as etapas de cultivo *in vitro* é necessária e vantajosa, pois possibilita que alterações fisiológicas e estruturais benéficas ocorram nas plantas devido ao novo ambiente (MARIN, 2003).

O silício é capaz de aumentar o teor de clorofila das folhas e a tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos, além de elevar a resistência contra patógenos e insetos (EPSTEIN, 2001). Também exerce importante papel na estruturação das plantas. Sua presença na parede celular pode elevar os conteúdos de celulose, hemicelulose e lignina, aumentando a rigidez da célula

(BARBOSA FILHO et al., 2001), características estas desejáveis, pois eleva as taxas de sobrevivência durante a aclimatização.

A escassez de informações sobre o uso do silício em bananeira justificou o presente trabalho, que foi realizado com o objetivo de avaliar diferentes fontes de silício no cultivo *in vitro* de bananeira ‘Grande Naine’ sobre características bioquímicas, fitotécnicas e ultraestruturais, durante o processo de aclimatização.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido entre os meses de junho e setembro de 2010, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e em casa de vegetação no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

Material vegetal e descrição do ambiente de cultivo - Brotos de bananeira 'Grande Naine' já estabelecidos *in vitro* foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com adição de 30g L⁻¹ de sacarose, 1mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) e solidificado com 1,8 g L⁻¹ de Phytigel™. Foram testadas três fontes de silicato acrescidas ao meio MS, silicato de sódio (Na₂SiO₃), silicato de potássio (K₂SiO₃) e silicato de cálcio (CaSiO₃), na dosagem de 1g L⁻¹ e o meio MS sem adição de silicato como testemunha. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 121°C e 1,2 atm, durante 20 minutos.

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os propágulos foram inoculados em frascos de 200 mL, com 30 mL do meio de cultivo MS modificado de acordo com o tratamento. Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno e com plástico do tipo parafilme. Após a inoculação, estes foram mantidos em sala de crescimento convencional, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C, com intensidade de 52,5W m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes.

Decorridos 45 dias do cultivo *in vitro*, as plantas foram retiradas dos frascos, individualizadas, submetidas à lavagem em água corrente para remover o excesso de meio de cultura aderido às raízes, sendo imediatamente transferidas para tubetes de 0,3 L preenchidos com substrato comercial Plantmax®.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação por 60 dias, correspondente aos meses de julho e agosto, cobertas com filme de polietileno transparente (150 microns), sombrite 70% e sistema de nebulização intermitente.

A parcela experimental foi constituída de três plantas (uma por tubete), com cinco repetições, num total de quinze plantas por tratamento, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos, os quais consistiram da mesma disposição da fase de enraizamento *in vitro*. Os dados foram submetidos ao programa estatístico Sisvar 4.3 (FERREIRA, 2000) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Ao final de 60 dias do período de aclimatização, foram avaliadas as características listadas a seguir.

Concentração de silício – Análise realizada no Laboratório de Fertilizantes do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia. O material vegetal utilizado para esta análise foi constituído de parte aérea e raízes secas em estufa ventilada, a 60°C, por 72 horas, até peso constante e moídas separadamente. A determinação de silício foi realizada pela metodologia proposta por Korndörfer et al. (2004). Para isso, 0,1 g da amostra (parte aérea ou raízes secas e moídas) foi pesada em tubo de polietileno e a ela adicionados 2,0 mL de 30% (v/v) de H₂O₂ e 3,0 mL de NaOH (25 mol L⁻¹). Os tubos foram fechados e levados para digestão em autoclave, por 1 hora, a 123°C e 0,15 MPa. Após resfriamento, o volume foi completado com água deionizada. Desse extrato foi retirada uma alíquota de 1 mL e transferida para frasco com capacidade de 20 mL, com o volume completado com água deionizada. A concentração de silício foi determinada por método espectrofotométrico com monitoramento a 410 nm da cor amarela do ácido molibdosilícico formado após reação entre silício e molibdato de amônio em meio HCl.

Determinação dos teores de clorofila – Análise realizada no Laboratório de Produtos Vegetais, Departamento de Ciência dos Alimentos, na Universidade Federal de Lavras. Teores de clorofila a, b e total foram quantificados segundo a metodologia de Arnon (1949). Foram coletadas cinco folhas de cada tratamento, no qual 0,5 g dos tecidos foliares foram macerados

em nitrogênio líquido e colocados em acetona 80%. Em seguida, o material foi centrifugado a 8000 x g, por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado para a determinação em espectrofotômetro (663 nm e 645 nm) dos conteúdos de pigmentos.

Determinação dos teores de celulose, hemicelulose, lignina e taninos

– Análise realizada no Laboratório de Produtos Vegetais, Departamento de Ciência dos Alimentos, na Universidade Federal de Lavras. Os teores de celulose, hemicelulose e lignina foram determinados pelo método de Soest (1967). Na quantificação de taninos, o extrato foi obtido segundo a metodologia de Deshpande et al. (1986) e a determinação foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Denis, conforme (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1990).

Características fitotécnicas – Foram analisados número de folhas, número de raízes, comprimento de parte aérea (cm), comprimento de raiz (cm), diâmetro de pseudocaule (cm), massa fresca e seca de parte aérea (g) e massa fresca e seca de raiz (g). A massa seca do material vegetal foi analisada após secagem em estufa, a 60°C, por 72 horas, até peso constante.

Características ultraestruturais – Análise realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Amostras do terço mediano de 3 folhas em 5 plantas foram fixadas em Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO₄) e, em seguida, desidratadas em soluções crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo então submetidas à secagem ao ponto crítico, utilizando-se CO₂ como líquido de transição (ROBARDS, 1978). Posteriormente, foram recobertas com ouro (20 nm) e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura LEO-EVO, seguindo o protocolo de Alves (2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de silício na parte aérea das plantas foi influenciado significativamente pelos tratamentos utilizados. A concentração de silício foi maior utilizando-se silicato de cálcio (CaSiO_3) acrescido ao meio de cultivo, provavelmente devido à maior absorção e translocação deste elemento, favorecendo maior acúmulo na parte aérea das plantas submetidas a este tratamento. A concentração de silício nas raízes também foi influenciada significativamente, e todos os tratamentos que continham fonte deste elemento apresentaram maior concentração em suas raízes (Tabela 1), comparados à testemunha. De acordo com Wiese et al. (2007), a concentração de sílica é maior na parte aérea que na raiz, com maior concentração nas folhas velhas que nas folhas novas.

Tabela 1 Concentração de silício na parte aérea (SiPA) e raízes (SiR) de bananeira 'Grande Naine' cultivada *in vitro* com diferentes fontes de silício e aclimatizadas por 60 dias

Fonte de silício	SiPA (%)	SiR (%)
Testemunha	0,98 c	0,45 b
MS+ Na_2SiO_3	1,38 b	0,62 a
MS+ K_2SiO_3	1,10 b	0,75 a
MS+ CaSiO_3	1,75 a	0,66 a

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Botelho et al. (2005) verificaram que o teor de silício no caule de cafeeiros foi influenciado pelas fontes aplicadas deste elemento, tendo a concentração sido maior com a fonte silicato de sódio.

Neste estudo, a presença de silício na testemunha pode ser explicada pelo fato de o silício ser um elemento muito abundante na natureza, estando presente em toda parte, inclusive na água (LUZ et al., 2006). No entanto, não há como confirmar esta hipótese, pois não foi medida a quantidade utilizada de silício na água para o preparo do meio de cultura e nem da água usada no sistema de nebulização na casa de vegetação.

Os resultados deste trabalho indicam que o silício foi absorvido pelas raízes e translocado para a parte aérea, desempenhando importantes funções fisiológicas e estruturais (BARROS et al., 2002).

Maior concentração de clorofila a foi encontrada no tratamento com silicato de cálcio (CaSiO_3), enquanto maiores concentrações de clorofila b e total foram registradas nos tratamentos silicatos de cálcio (CaSiO_3) e potássio (K_2SiO_3). Maior relação clorofila a/b foi obtida utilizando-se silicato de sódio (Na_2SiO_3) (Tabela 2).

Tabela 2 Teores de clorofila a, b, total e razão a/b em folhas de bananeira ‘Grande Naine’ cultivada *in vitro* com diferentes fontes de silício e aclimatizadas por 60 dias

Fonte de silício	Clorofila ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	a	b	total	a/b
Testemunha	7,04 b	2,46 b	9,50 b	2,86 b
MS+ Na_2SiO_3	6,21 d	1,80 c	8,01 c	3,57 a
MS+ K_2SiO_3	7,80 b	3,03 a	10,83 a	2,58 b
MS+ CaSiO_3	8,01 a	2,85 a	10,86 a	2,80 b

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Segundo Deren et al. (1994), a absorção de silício traz diversos benefícios. Dentre estes, proporciona melhor arquitetura da planta ao tornar as

folhas mais eretas, aumenta os teores de clorofila e, conseqüentemente, melhora a eficiência fotossintética.

Braga et al. (2009) encontraram maiores teores de clorofila a, b e total utilizando fonte de silício no cultivo *in vitro* de morangueiro ‘Oso Grande’ (*Fragaria x ananassa*).

Os teores de celulose, hemicelulose e taninos presentes nas folhas também foram influenciados significativamente pelos tratamentos.

Maiores teores de celulose e taninos foram observados no tratamento silicato de sódio (Na_2SiO_3) (Tabela 3). Gomes et al. (2008) também detectaram maior conteúdo de taninos em batata usando adubação silicatada foliar e via solo, comparativamente à testemunha.

Para todas as fontes de silício utilizadas, foi verificada maior concentração de hemicelulose que na testemunha (Tabela 3). O conteúdo de lignina não diferiu entre os tratamentos estudados. No entanto, Botelho et al. (2005) e Amaral et al. (2008) verificaram maior conteúdo de lignina em cafeeiro com a adição de diferentes fontes de silício ao substrato de plantio.

Tabela 3 Teores de celulose, hemicelulose, lignina e taninos em folhas de bananeira ‘Grande Naine’ cultivada *in vitro* com diferentes fontes de silício e aclimatizadas por 60 dias

Fonte de silício	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Taninos (%)
Testemunha	1,44 c	1,05 b	1,14 a	532,61 c
MS+ Na_2SiO_3	1,90 a	1,83 a	1,18 a	838,95 a
MS+ K_2SiO_3	1,72 b	1,93 a	1,25 a	748,27 b
MS+ CaSiO_3	1,73 b	2,11 a	1,12 a	529,87 c

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

O silício é capaz de induzir uma série de reações metabólicas que atuam na defesa natural das plantas, resultando na formação de taninos e de outras substâncias químicas, como as ligninas (LAING; ADANDONON, 2005). Ainda segundo Chérif et al. (1994), estas substâncias químicas são importantes componentes na resistência de plantas a patógenos, pois limita a ação destes pela formação de barreira física.

Não houve diferença significativa para as variáveis fitotécnicas número de folhas, número de raízes e comprimento de parte aérea (Tabela 4). Entretanto, maior comprimento de raiz foi observado nos tratamentos com silicato de sódio (Na_2SiO_3) e potássio (K_2SiO_3).

Tabela 4 Número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR) e diâmetro do pseudocaule (DP) em bananeira ‘Grande Naine’ cultivada *in vitro* com diferentes fontes de silício e aclimatizadas por 60 dias

Fonte de silício	NF	NR	CPA (cm)	CR (cm)	DP (cm)
Testemunha	5,10 a	3,80 a	17,11 a	14,24 b	0,87 b
MS+ Na_2SiO_3	5,30 a	3,90 a	18,87 a	18,62 a	1,14 a
MS+ K_2SiO_3	5,00 a	4,80 a	16,82 a	17,24 a	1,06 a
MS+ CaSiO_3	4,60 a	3,90 a	14,05 a	12,83 b	1,11 a

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

A adição de silicato ao meio de cultivo promoveu maiores diâmetros do pseudocaule, massa fresca e seca de parte aérea e massa fresca de raiz (Tabelas 4 e 5). Maior massa seca de raiz foi registrada apenas no tratamento com silicato de sódio.

Tabela 5 Massa fresca de parte aérea (MFPA), massa seca de parte aérea (MSPA), massa fresca de raiz (MFR) e massa seca de raiz (MSR) em bananeira 'Grande Naine' cultivada *in vitro* com diferentes fontes de silício e aclimatizadas por 60 dias

Fonte de silício	MFPA (g)	MSPA (g)	MFR (g)	MSR (cm)
Testemunha	4,57 b	0,39 b	1,41 b	0,08 b
MS+Na ₂ SiO ₃	7,74 a	0,63 a	2,64 a	0,22 a
MS+K ₂ SiO ₃	7,44 a	0,60 a	2,58 a	0,13 b
MS+CaSiO ₃	7,63 a	0,55 a	3,25 a	0,14 b

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

De modo semelhante, Romero-Aranda et al. (2006) evidenciaram maior massa de plântulas de tomate com a utilização de silicato de potássio. Trabalhando com orquídea, Zhou (1995) também constatou incremento em massa com a utilização de silicato de cálcio. A capacidade de absorção e acúmulo de silício pelas plantas é variável de acordo com a forma como elemento é disponibilizado, bem como a espécie estudada.

Gomes et al. (2009) não verificaram diferenças significativas utilizando silício para altura e diâmetro de hastes de plantas de batata. Contudo, resultados satisfatórios pela aplicação de silício foram observados na produtividade de cana-de-açúcar (KORNDÖRFER et al., 2002) e de arroz (CARVALHO-PUPATTO et al., 2004). Dentre os benefícios proporcionados pela utilização do silício, destaca-se a influência positiva no crescimento e no desenvolvimento das plantas.

A camada de cera presente em plantas cultivadas *in vitro*, geralmente, é muito delgada, principalmente pela deficiência de luz nas salas de crescimento. A cera epicuticular é um polímero complexo com importantes funções nas células epidérmicas. Dentre elas, destaca-se a proteção contra a perda de água e, por se tratar de uma camada brilhante e refletora, atua também na proteção

contra o excesso de luminosidade (ALQUINI et al., 2006). A presença de uma camada mais espessa de cera em plantas cultivadas *in vitro* é importante, pois as funções citadas são fundamentais para a planta durante o processo de aclimatização, quando se observa que a morte das plantas se deve, principalmente, à perda excessiva de água devido à alta temperatura e à luminosidade na casa de vegetação.

Analisando as imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 1) é possível notar a presença de cera epicuticular nas superfícies adaxial e abaxial das folhas formadas *ex vitro* em todos os tratamentos, inclusive na testemunha. Por essa razão, ressalta-se a importância de se realizar uma fase de aclimatização, pois, dentre as principais características das plantas cultivadas *in vitro*, destaca-se a deficiente formação de cerosidade.

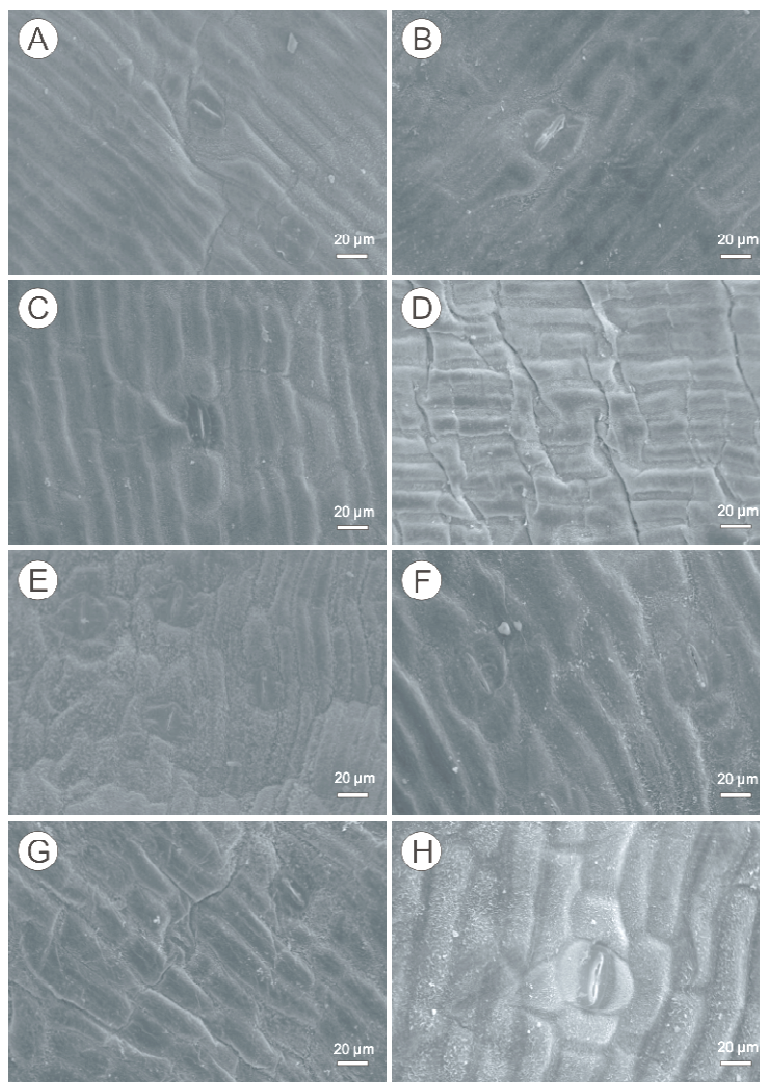


Figura 1 Eletromicrografias de folhas de bananeira submetidas a diferentes fontes de silício *in vitro* e aclimatizadas por 60 dias: superfície adaxial testemunha sem silício (A), superfície adaxial silicato de sódio (B), superfície adaxial silicato de potássio (C), superfície adaxial silicato de cálcio (D), superfície abaxial testemunha sem silício (E), superfície abaxial silicato de sódio (F), superfície abaxial silicato de potássio (G) e superfície abaxial silicato de cálcio (H)

Esses resultados estão de acordo com Sandoval et al. (1994) que relatam que a camada de cera se torna gradualmente espessa e mais bem distribuída em folhas novas de bananeira ‘Grande Naine’ formadas *ex vitro*, ao contrário do que ocorre em folhas *in vitro*.

No entanto, outros autores encontraram diferenças entre a aplicação de silício e a testemunha, tendo o silício influenciado na formação de camada de cera em plantas de cafeeiro analisadas com auxílio da microscopia eletrônica de varredura, tanto na aplicação de silicato via solo (POZZA et al., 2004) quanto via foliar (AMARAL et al., 2008). Porém, isso não foi observado neste trabalho.

Independente do efeito do silício, é possível perceber a necessidade de aclimatizar mudas de bananeira provenientes do cultivo *in vitro* antes de seu cultivo em campo, pois esta fase possibilita que ocorram importantes alterações estruturais que contribuirão para o sucesso da mesma.

4 CONCLUSÃO

O uso do silício no cultivo *in vitro* traz benefícios durante a aclimatização de plantas de bananeira.

O processo de aclimatização é fundamental, pois proporciona aumento na camada de cera epicuticular em folhas de bananeira ‘Grande Naine’.

REFERÊNCIAS

- ALQUINI, Y. et al. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 87-108.
- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88 p.
- AMARAL, D. R. et al. Silicato de potássio na proteção do cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 425-431, nov./dez. 2008.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 15th ed. Washington, 1990. v. 2, 1298 p.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolates choroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, n. 1, p. 1-15, Jan. 1949.
- BARBOSA FILHO M. P. et al. Silicato de cálcio como fonte de silício para arroz de sequeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 25, p. 325-330, 2001.
- BARROS, L. U.; CUNHA, C. F.; MIGUENS, F. C. Structure, morphology, and composition of silicon biocomposites in the palm tree *Syagrus coronata* (Mart.). **Becc Protoplasma**, New York, v. 220, n. 1-2, p. 89-96, Oct. 2002.
- BOTELHO, D. M. S. et al. Intensidade da cercosporiose em mudas de cafeeiro em função de fontes e doses de silício. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 582-588, dez. 2005.

BRAGA, F. T. et al. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 128-132, fev. 2009.

CARVALHO-PUPATTO, J. G.; BULL, L. T.; CRUSCIOL, C. A. C. Atributos químicos do solo, crescimento radicular e produtividade do arroz de acordo com a aplicação de escórias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 12, p. 1213-1218, dez. 2004.

CHÉRIF, M.; ASSELIN, A.; BÉLANGER, R. R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. **Phytopathology** Corvallis, v. 84, p. 236- 242, 1994.

DEREN, C. W. et al. Silicon concentration, disease response, and yield components of rice genotypes grown on flooded organic histosols. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 3, p. 733-737, May/Jun. 1994.

DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M.; SALUNKE, D. K. Tannin analysis of food products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 401-449, 1986.

EPSTEIN, E. Silicon in plants: facts vs concepts. In: L. E. DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001. p. 1-15.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

FERREIRA, D. F. **Sisvar 4.3**: sistema de análises de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Lavras: UFLA/DEX, 2000.

GOMES, F.B. et al. Uso de silício como indutor de resistência em batata a *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 185-190, mar./abr. 2008.

GOMES, F. B.; MORAES, J. C.; NERI, D. K. P. Adubação com silício como fator de resistência a insetos-praga e promotor de produtividade em cultura de batata inglesa em sistema orgânico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 18-23, jan./fev. 2009.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, n. 15, p. 137-138, Apr. 1965.

KORNDÖRFER, G.H.; PEREIRA, H.S.; CAMARGO, M.S. Papel do silício na produção de cana-de-açúcar. **STAB**, Piracicaba, v. 21, n. 2, p. 34-37, dez. 2002.

KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H. S.; NOLLA, A. **Análise de silício**: solo planta e fertilizante. Uberlândia: GPSi-ICIAG-UFU, 2004. 50 p. (Boletim Técnico, 2).

LAING, M. D.; ADANDONON, A. Silicon and insect management – Review. In: SILICON IN AGRICULTURE CONFERENCE, 3., 2005, Uberlândia. **Anais...**, Uberlândia: UFU/ICIAG, 2005. 152 p.

LUZ, J. M.Q.; GUIMARAES, S. T. M. R.; KORNDORFER, G.H. Produção hidropônica de alface em solução nutritiva com e sem silício. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. Sept. 2006.

MARIN, J.A. High survival rates during acclimatization of micropropagated fruit tree rootstocks by increasing exposures to low relative humidity. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 616, n. p.139-142, 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 473-497, Jan. 1962.

POZZA, A. A. A. et al. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 185-188, mar./abr. 2004.

ROBARDS, A. W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: HALL, J. L. (Ed.). **Electron microscopy and cytochemistry of plant cells**. New York: Elsevier, 1978. p. 343-444

ROELS, S. et al. Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 82, n. 1, p. 57-66, July 2005.

ROMERO-ARANDA, M.; JURADO, O.; CUARTETO, J. Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, n. 8, p. 847-855, Aug. 2006.

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**, v. 49, p. 37-46, 1994.

SOEST, P. J. Van. Development of a comprehensive system of feed analysis and its applications to forage. **Journal of Animal Science**, Palo Alto, v. 26, n 1, p. 119-128, Jan. 1967.

WIESE, H.; NIKOLIC, M.; ROMHELD, V. Silicon in plant nutrition. In: SATTELMACHER, B.; HORST, W. J. (Ed.). **The Apoplast of Higher Plants: compartment of storage, transport and reactions**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 33-47.

ZHOU, T. S. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, London, v. 75, n. 6, p. 605-607, Dec. 1995.