

**MICROPROPAGAÇÃO DA BANANEIRA:
CARACTERÍSTICAS FITOTÉCNICAS,
FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS**

FREDERICO HENRIQUE DA SILVA COSTA

2007

FREDERICO HENRIQUE DA SILVA COSTA

**MICROPROPAGAÇÃO DA BANANEIRA: CARACTERÍSTICAS
FITOTÉCNICAS, FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

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

Costa, Frederico Henrique da Silva

Micropropagação da bananeira: características fitotécnicas, fisiológicas e anatômicas. / Frederico Henrique da Silva Costa. -- Lavras : UFLA, 2007.
113 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. *Musa* spp. 2. Cultura de tecidos vegetais. 3. Aclimatização. 4. Anatomia.
5. Fisiologia I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.772

FREDERICO HENRIQUE DA SILVA COSTA

**MICROPROPAGAÇÃO DA BANANEIRA: CARACTERÍSTICAS
FITOTÉCNICAS, FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Curso de
Mestrado em Agronomia, área de concentração
Fitotecnia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2007

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro

DBI/UFLA

Pesquisador Dr. Leonardo Ferreira Dutra

EMBRAPA FLORESTAS

Prof. Dr Moacir Pasqual
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus, eterno pai e companheiro de todos os momentos da vida.

A minha avó, Maria da Conceição (Dona Concebida) e minha mãe, Maria Lúcia.

Ao meu sobrinho, Pedro Davi e minhas irmãs, Francianne e Francicléia.

Ao amigo e grande pesquisador Jonny Everson Scherwinski Pereira.

DEDICO

‘Os *VENCEDORES* não fazem coisas diferentes; fazem de modo diferente! Dessa maneira, a maioria das pessoas fracassa não por falta de capacidade ou de inteligência, mas por falta de desejo, direção, dedicação, disciplina e acima de tudo *Atitude*. (Shiv Khera)

BIOGRAFIA

FREDERICO HENRIQUE DA SILVA COSTA, filho de Francisco Lino Lima da Costa (falecido) e Maria Lúcia da Silva Costa, nasceu em 6 de setembro de 1982, no município de Tucuruí, estado do Pará. Nos primeiros anos de vida, mudou-se para o estado do Acre, onde iniciou seus estudos, desde a alfabetização até a graduação em Engenheiro Agrônomo, pela Universidade Federal do Acre, em janeiro de 2005.

No decorrer de sua formação acadêmica, sempre esteve envolvido em atividades de ensino, pesquisa e extensão, dedicando tempo integral à construção de melhores conhecimentos e a prestar contribuições à sociedade. Suas atividades se iniciaram no Programa de Educação Tutorial (PET) sendo, posteriormente, agraciado com bolsa de iniciação científica, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), durante 36 meses, divididos em atividades na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e na Universidade Federal do Acre. Também desenvolveu atividades no Centro de Pesquisa e Extensão em Sistemas Agroflorestais do Acre (PESACRE).

Suas primeiras atividades na área de Cultura de Tecidos Vegetais se realizaram em abril de 2004, sob a orientação do pesquisador Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira, trabalhando com frutíferas e palmáceas. Em março de 2005, iniciou o Mestrado em Agronomia (área de concentração Fitotecnia) na Universidade Federal de Lavras, sendo aprovado no Doutorado pela mesma Instituição em dezembro de 2006 e tendo defendido a dissertação em 23 fevereiro de 2007.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sua fidelidade e lealdade, sempre presentes na minha vida, mostrando soluções e dando-me atitude e coragem nos momentos difíceis e alegres, nos quais obtive aprendizados de grande valia para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao professor, orientador e amigo Moacir Pasqual, pessoa de simplicidade e alegria admiráveis e, principalmente, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e presteza, incondicionais, demonstrados e repassados, meus sinceros agradecimentos.

A Jonny Everson Scherwinski Pereira, orientador e amigo em todos os momentos, por me proporcionar o desenvolvimento e o aprimoramento dos primeiros e valiosos conhecimentos das ciências, pelo apoio científico e profissional e, acima de tudo, pelas várias oportunidades e por sempre acreditar e confiar em minhas potencialidades.

A minha avó, Maria da Conceição (Dona Concebida), por todas as grandes e pequenas oportunidades, pelo carinho, dedicação e confiança repassados durante toda a minha vida, meu eterno amor e gratidão.

A minha mãe, Maria Lúcia, minhas irmãs e meu sobrinho, pessoas que representam uma das maiores razões por estar buscando melhores condições de vida, por sempre acreditarem em minha capacidade de tornar sonhos realidade. Amo vocês.

Ao professor Evaristo Mauro de Castro, cuja simpatia, competência e força de vontade em contribuir para a melhor compreensão e melhoria dos avanços científicos não foram medidos.

Ao amigo Hermínio Souza Rocha, pelas valiosas contribuições a realização deste trabalho.

Aos meus tio e padrinhos Maronilson, Neto e Lilia, pela ajuda proporcionada e momentos de carinho repassados, minha eterna gratidão e carinho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de estudos durante toda a minha vida acadêmica.

A Embrapa Acre, instituição de valor e potencial inestimáveis, na qual dei início e sempre estarei buscando atividades de pesquisa.

A Universidade Federal do Acre e Universidade Federal de Lavras, instituições nas quais obtive aprendizados jamais esquecidos e que são parte integrante da minha vida.

Ao tio Marcondes Lima da Costa, pesquisador eminente, cujo sucesso constante no progresso das ciências me encorajou a prosseguir no ensino, pesquisa e extensão. O senhor é meu exemplo de cientista.

A Manuel Alves Ribeiro Neto e Ribamar Torres da Silva, pessoas que também contribuíram para a formação acadêmica, dedicando tempo valioso às pesquisas sobre os solos acreanos.

A Ester Alice Ferreira, cuja simpatia, carinho, prestatividade, companheirismo e compreensão tornaram um mero cotidiano pacato em momentos únicos, descontraídos e bastantes felizes, os quais serão sempre lembrados. Amo você.

A amiga Aparecida Gomes de Araújo (Cida), cujo caráter próprio, forte personalidade, competência, presteza, ensinamentos, oportunidades e vivência serão sempre lembrados.

As amigas Luzia e Adriene, pessoas cuja simplicidade e força de vontade em crescer profissionalmente as tornaram integrantes do grupo da banana do DAG/UFLA. Vocês seguirão em minha memória.

À 'família' do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFLA, na pessoa de Vantuil, Claret e Antônio Carlos, profissionais extremamente capazes, dedicados e prestativos, meu muito obrigado.

Ao amigo Evaldo do Laboratório de Cultura de Tecidos, cujos esforços foram preponderantes para a realização desta pesquisa. Aos momentos de risos e distração (aquela 'loirinha' bem acompanhada do torresmo de seu Natalino).

Aos professores Paulo César de Lima, mais conhecido por Paulo Bola, e a Daniel Ferreira Furtado, pela prestatividade e atenção na área de análise estatística.

A Leonardo Ferreira Dutra, pela colaboração na melhoria dos trabalhos.

Aos companheiros, profissionais e amigos Filipe (batata), Dalhília, Claudinéia, Lilian e Zacharias, pessoas importantes que conheci e que sempre me apoiaram.

Aos colegas Josimar, Washigton, Foguinho, Pedro, Igor, Tadário e Zé Márcio, pela convivência durante o mestrado e pelos momentos de distração.

Aos amigos Daniel Rufino (cabeça) e Luis Eduardo, pelo total apoio, presteza, convívio e amizade.

Aos amigos Zé Luis Sandes (Zezinho), Lucrécio e Fábio (Cebola), pessoas que tornaram dias de convívio mais agradáveis e divertidos.

Aos meus amigos Carlos Gibran e Janderson Nascimento que, embora não estivessem fisicamente próximos, sempre se fizeram presentes com suas palavras de conforto e segurança, durante os momentos difíceis e alegres.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
ARTIGO 1: Relação entre o tempo de enraizamento <i>in vitro</i> e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização.....	01
Resumo.....	02
Abstract.....	03
1 Introdução.....	04
2 Material e métodos.....	06
3 Resultados e discussão.....	09
4 Conclusões.....	21
5 Agradecimentos.....	22
6 Referências Bibliográficas.....	23
ARTIGO 2: Micropropagação de cultivares de bananeira, em função de alterações no ambiente de cultivo.....	27
Resumo.....	28
Abstract.....	29
1 Introdução.....	30
2 Material e métodos.....	33
3 Resultados e discussão.....	37
4 Conclusões.....	51
5 Agradecimento.....	52
6 Referências bibliográficas.....	53
ARTIGO 3: Características fisiológicas e anatômicas de plantas micropropagadas de bananeira, influenciadas por alterações no ambiente de cultivo	57
Resumo.....	58

Abstract.....	59
1 Introdução.....	60
2 Material e métodos.....	62
3 Resultados e discussão.....	68
4 Conclusões.....	81
5 Agradecimento.....	82
6 Referências Bibliográficas.....	83
ARTIGO 4: Alterações anatômicas em plantas de bananeira cv. Japira (AAAB) cultivadas <i>in vitro</i> e durante a aclimatização	89
Resumo.....	90
Abstract.....	91
1 Introdução.....	92
2 Material e métodos.....	94
3 Resultados e discussão.....	98
4 Conclusões.....	108
5 Agradecimento.....	109
6 Referências bibliográficas.....	110

RESUMO

COSTA, Frederico Henrique da Silva. **Micropropagação da bananeira: características fitotécnicas, fisiológicas e anatômicas**. Lavras: UFLA, 2007. 113 p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).*

O cultivo de ápices caulinares e meristemas utilizando técnicas *in vitro* constitui a base da propagação clonal massal de bananas e plátanos. Este trabalho objetivou estudar o desenvolvimento fitotécnico e o comportamento fisiológico e anatômico em bananeiras micropropagadas. Quatro experimentos foram realizados, os quais avaliaram: 1) a influência do tempo de enraizamento *in vitro*; 2) o ambiente de cultivo, concentrações de sacarose e cultivares; 3) diferenças fisiológicas e anatômicas em diferentes condições de cultivo *in vitro* e 4) alterações na anatomia foliar e existência de conexão vascular de raízes em diferentes etapas da micropropagação. O material vegetal consistiu de brotações axilares, provenientes do cultivo *in vitro* de ápices caulinares de cultivares de bananeira. Como meio de cultura básico, utilizou-se o MS, acrescido do regulador de crescimento BAP (5 mg.L^{-1}), para a fase de multiplicação e 1 mg.L^{-1} de ANA ou AIB para o enraizamento. Verificou-se que a fase de indução de raízes nas brotações de bananeira *in vitro* ocorreu até os 14 dias de cultivo, após o qual observa-se apenas alongamento. Entre as cultivares, a 'Caipira' apresentou desenvolvimento vegetativo *in vitro* e *ex vitro* (altura de plantas, número e comprimento de raízes e massa seca) superior ao das cultivares Preciosa e Japira, com exceção do diâmetro de pseudocaule. Após 21 dias de cultivo em meio de enraizamento, a sobrevivência das plantas foi de 100%. A rizogênese *in vitro* sob ambiente de luz natural e o acréscimo de 30 g.L^{-1} de sacarose, proporcionam resultados satisfatórios para as cultivares Caipira e Pacovan, com 100% de sobrevivência, contribuindo para a redução nos custos e nas perdas na aclimatização. Incremento na ocorrência do processo foto-oxidativo do pigmento de clorofila *a*, espessura dos parênquimas clorofilianos, densidade estomática da face abaxial da epiderme, conteúdo relativo de água e sobrevivência de plantas micropropagadas de bananeira, 'Caipira', são obtidos sob enraizamento *in vitro*, em ambiente de luz natural. A aclimatização de plantas micropropagadas de bananeira cultivar Japira, sob as condições deste trabalho, foi obtida a partir de 63 dias, em casa de vegetação. Conexão vascular entre as raízes e a parte aérea ocorrem em ambas as plantas *in vitro* e aclimatizadas.

*Orientador: Dr. Moacir Pasqual - UFLA. Co-orientador: Jonny Everson Scherwisnki Pereira (EMBRAPA/ACRE)

ABSTRACT

COSTA, Frederico Henrique da Silva. **Micropropagation of banana: agronomical, physiological and anatomical traits.** Lavras: UFLA, 2007. 113p. (Dissertation – Master Program in Crop Science). Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The cultivation of shoot tips and meristems through *in vitro* technical constitutes the basis of clonal propagation of bananas and plantain. This work aimed to study the agronomical development, physiologic and anatomical behavior of banana plants micropropagated. Four experiments were carried out which evaluated: 1) the influence of the time of rooting; 2) the atmosphere of cultivation, concentrations of sucrose and cultivars; 3) physiological and anatomical differences under different conditions of *in vitro* cultivation and 4) anatomical alterations of the leaves and existence of vascular connection of roots in different stages of the micropropagation process. The propagative material used was axillary shoots of bananas from *in vitro* multiplication process. The basic culture medium used was the MS within BA at 5 mg.L⁻¹ for the multiplication phase and NAA or IBA at 1 mg.L⁻¹ for rooting. It was verified that the root induction occurred after 14 days of shoots cultivation and the roots grown just in length after this period. Among cultivars, 'Caipira' was the one that presented best results of growing (plant height, number and length of roots and dry mass) when compared with Preciosa and Japira cultivars, except for diameter of the pseudostem. After 21 days in rooting medium, the plant survival reached 100%. The *in vitro* rhizogenesis in conditions of natural light and with 30 g.L⁻¹ of sucrose, provides satisfactory results for Caipira and Pacovan cultivars, with 100% of plant survival, contributing to the reduction in the costs and in the losses in acclimatization. Increase in the occurrence of photooxidative process of the *a* chlorophyll pigment, thickness of the chlorophyllian parenchyma, stomatal density on abaxial surface of the epidermis, relative water content and survival of micropropagated plants of Caipira cultivar, is obtained when the rooting *in vitro* is take under conditions of natural light. The acclimatization of micropropagated banana plants, cultivar Japira, it was obtained from 63 days at greenhouse. Vascular connection between roots and aerial parts is observed in both *in vitro* and acclimatized plants.

Adviser: Moacir Pasqual (DAG/UFLA); Co-adviser: Jonny Everson Scherwinski Pereira (EMBRAPA/ACRE)

ARTIGO 1

**RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E O
CRESCIMENTO DE PLANTAS DE BANANEIRA NA
ACLIMATIZAÇÃO**

(Preparado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Fruticultura)

**Frederico Henrique da Silva Costa, Moacir Pasqual, Jonny Everson
Scherwinski Pereira, Filipe Almendagna Rodrigues, Luzia Yuriko Miyata**

RESUMO

RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E O CRESCIMENTO DE PLANTAS DE BANANEIRA NA ACLIMATIZAÇÃO

O trabalho objetivou avaliar a influência do tempo de permanência em meio de enraizamento sobre o crescimento *in vitro* e *ex vitro* de plantas de bananeira. Como explantes, foram utilizadas brotações axilares de bananeira provenientes do estabelecimento e multiplicação *in vitro* de ápices caulinares das cultivares Caipira (AAA), Preciosa (AAAB) e Japira (AAAB). Para o enraizamento, empregou-se o meio MS reduzido a 50% da concentração de sais, adicionado de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 1 mg.L⁻¹ de AIB e 6 g.L⁻¹ de ágar. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 3x4, com três cultivares (Caipira, Preciosa e Japira) e quatro períodos de enraizamento *in vitro* (7, 14, 21 e 28 dias), num total de 12 tratamentos. Ao final de cada período a altura da parte aérea, número e comprimento de raízes foram avaliados e as plantas submetidas ao processo de aclimatização por 90 dias. Após este período as plantas foram avaliadas quanto à sobrevivência, número e comprimento de raízes, diâmetro do pseudocaule e massa seca de raízes, parte aérea e total. De modo geral, observou-se que a fase de indução de raízes nas brotações de bananeira *in vitro* ocorreu até os 14 dias de cultivo em meio de enraizamento, havendo apenas crescimento em tamanho das raízes após este período. Entre as cultivares, verificou-se que, com exceção do diâmetro de pseudocaule, a cultivar Caipira apresentou crescimento vegetativo *in vitro* e durante a aclimatização (altura de plantas, número e comprimento de raízes e massa seca da parte aérea, raízes e total) superior às cultivares Preciosa e Japira. Após 21 dias de permanência em meio de enraizamento, a taxa de sobrevivência das plantas observada em casa de vegetação alcançou 100%, independentemente da cultivar testada.

Termos para indexação: *Musa* spp., micropropagação, estabelecimento *ex vitro*, sistema radicular, genótipo.

ABSTRACT

RELATIONSHIP BETWEEN THE *IN VITRO* ROOTING TIME AND THE GROWTH OF BANANA PLANTS IN THE ACLIMATIZATION

The work aimed to evaluate the influence of the rooting time on the *in vitro* and *ex vitro* growth of banana plants. For *in vitro* rooting, it were used as explants, axillary shoots of bananas Caipira (AAA), Preciosa (AAAB) and Japira (AAAB) cultivars, from *in vitro* multiplication. Rooting medium used was the MS 1/2, added of sucrose (30 g.L⁻¹), IBA (1 mg.L⁻¹) and solidified with agar (6 g.L⁻¹). The treatments were disposed in a factorial 3x4, with three cultivars (Caipira, Preciosa and Japira) and four periods of rooting (7, 14, 21 and 28 days), in a total of 12 treatments. At the end of each period the height of aerial part and the number and length of roots was evaluated, being the plants submitted to the acclimatization process for 90 days. After this period, the plant survival, number and length of roots, diameter of plants and the dry mass weight of aerial part and roots were evaluated. In general, it was observed that the *in vitro* induction of roots occurred until 14 days of cultivation, with the roots just growing in length after this period. Among the cultivars, it was verified that, except for diameter of the plants, Caipira cultivar presented higher *in vitro* and *ex vitro* vegetative growth (height of plants, number and length of roots and aerial and roots dry mass) than Preciosa and Japira cultivars. After 21 days in the culture medium the plant survival at greenhouse reached 100%, independently of the cultivar.

Index terms: *Musa* spp.; micropropagation; *ex vitro* establishment; root system; genotype.

1 INTRODUÇÃO

A bananicultura é uma atividade de importância econômica e social em todo o mundo, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial, com produção de cerca de 6,4 milhões de toneladas e área plantada de 508,5 mil hectares (Borges et al., 2006; Silva et al., 2006). No entanto, como em qualquer espécie cultivada em grandes áreas, a bananeira é afetada por diversos problemas fitossanitários. A sigatoka-negra, causada pelo fungo *Mycosphaella fijiensis* Morelet, é considerada a mais grave doença (Silva et al., 2003) e que tem ocasionado redução significativa na produção das cultivares Prata, Prata-Anã, Nanicão e Grande Naine, atualmente as mais difundidas e cultivadas. Sendo assim, novos genótipos de bananeira vêm sendo introduzidos e produzidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, resultando na recomendação de cultivares com resistência às principais sigatokas e ao mal-do-panamá, entre as quais estão a ‘Caipira’ (AAA), ‘Preciosa’ (AAAB) e ‘Japira’ (AAAB).

Nesse contexto, a micropropagação de ápices caulinares e meristemas constitui uma importante ferramenta para a rápida propagação clonal massal e validação de genótipos de bananeira recentemente lançados pelos programas de melhoramento genético (Gübbük & Pekmezci, 2004; Rocha, 2005). De modo geral, o processo de micropropagação da bananeira tem início a partir de uma rigorosa seleção de plantas matrizes elites, seguido das fases de estabelecimento, multiplicação e enraizamento/alongamento *in vitro*, sendo as plantas obtidas submetidas a aclimatização em casa de vegetação ou telado.

Dentre as fases que compõem o processo *in vitro*, o enraizamento/alongamento é considerado fundamental para a maioria das espécies. Isso porque a obtenção de um sistema radicular funcional e uniforme em plantas micropropagadas é um requisito básico para que se alcancem

elevadas taxas de sobrevivência na fase de aclimatização. Contudo, alguns autores suportam a hipótese de que a redução do período de enraizamento *in vitro*, ou mesmo sua eliminação, não prejudique a sobrevivência e o posterior desenvolvimento de determinadas espécies de plantas durante a aclimatização (George, 1996; Grattapaglia & Machado, 1998; Preece & Sutter, 1991), contribuindo significativamente para a redução dos custos de produção e do tempo para a comercialização.

Assim, uma possível alternativa seria submeter as partes aéreas a uma fase de indução de raízes *in vitro*, seguida de uma etapa de alongamento em substrato (*ex vitro*). Isso porque raízes mais curtas, normalmente, estão em fase de ativo crescimento, sendo mais adequadas ao transplante, por facilitar o manuseio, o pegamento e o posterior desenvolvimento *ex vitro* das plantas (Grattapaglia & Machado, 1998; Woodhead & Bird, 1998). Portanto, é logo após os primeiros sinais de emergência dos primórdios radiculares *in vitro* que as plantas devem ser transplantadas. Além disso, alguns pesquisadores têm sugerido que o aumento do tempo de permanência das plantas em meio de cultura pode proporcionar um rápido envelhecimento das raízes, tornando-as menos funcionais (Pereira & Fortes, 2001).

Acrescente-se, ainda, que, do ponto de vista econômico, submeter as plantas ao enraizamento *ex vitro* pode representar uma considerável redução dos custos de mão-de-obra e infra-estrutura, pois uma etapa da micropropagação é eliminada. Além do mais, pode também conferir qualidades adicionais ao sistema radicular formado, refletindo no bom desenvolvimento da parte aérea, assim como um maior número de raízes laterais (Cuzzuol et al., 1996; Debergh & Read, 1991).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a influência do tempo de permanência em meio de enraizamento sobre o crescimento *in vitro* e *ex vitro* de plantas de bananeira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Anexos do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, região Sul do estado de Minas Gerais, a 918 m de altitude, latitude 21°14'S e longitude 45°00'GRW. Segundo a classificação climática de Köppen (1948), o clima regional é do tipo Cwa, com características Cwb, apresentando duas estações definidas: seca, com temperaturas mais baixas de abril a setembro, e chuvosa, com temperaturas mais elevadas, de outubro a março. O experimento foi realizado entre os meses de maio e setembro de 2006.

O material vegetal utilizado foi constituído de brotações axilares (com aproximadamente 2 cm e desprovidas de raízes), provenientes do estabelecimento e multiplicação *in vitro* de ápices caulinares das cultivares de bananeira 'Caipira' (AAA), 'Preciosa' (AAAB) e 'Japira' (AAAB), as quais foram obtidas do banco ativo de germoplasma (BAG) da Embrapa Acre, em Rio Branco. O meio básico utilizado para a obtenção dos explantes foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 5 mg.L⁻¹ de BAP, sendo os subcultivos realizados a cada 35 dias, até obtenção de número suficiente de explantes para início do experimento.

Para o enraizamento *in vitro*, foi utilizado o meio de MS reduzido a 50% da concentração de sais, adicionado de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 1 mg.L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB). Ambos os meios utilizados para a obtenção e o enraizamento dos explantes foram solidificados com 6 g.L⁻¹ de ágar (Merse®) e tiveram o pH ajustado para 5,8±0,1, antes da adição do agente geleificante, sendo em seguida autoclavados, por 20 minutos, a 120°C e 1 atm. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 3x4, constituído de diferentes períodos de enraizamento *in vitro* (7, 14, 21 e 28 dias) e três cultivares de

bananeira (Caipira, Preciosa e Japira), num total de 12 tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e quatro explantes por parcela. O cultivo foi feito em frascos de 250 mL contendo 40 mL de meio, selados com parafilme transparente.

Uma vez estabelecido, o cultivo foi mantido em sala de crescimento, sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 42 W.m^{-2} , fornecida por meio de lâmpadas fluorescentes tubulares do tipo luz do dia especial (OSRAM 20W). Ao final de cada período de cultivo *in vitro*, foram avaliados a altura da parte aérea e o número e comprimento de raízes.

Ao final das avaliações referentes a cada tempo de enraizamento *in vitro*, as plantas tiveram suas raízes lavadas em água corrente, sendo imediatamente transferidas para tubetes de 0,3 L preenchidos com substrato composto pela mistura de terra de subsolo (abaixo de 40 cm):Plantmax Hortaliças HT[®]:casca de arroz carbonizada (1:1:1 v/v), acrescido de 50 g.L^{-1} de húmus e 20 g.L^{-1} de super simples. Após o transplante, as plantas foram mantidas em casa de vegetação por 90 dias, coberta com filme de polietileno transparente (150 microns) e apresentando sombreamento de 70% (Sombrence[®]), sendo a irrigação das mudas realizada por sistema de nebulização intermitente. A parcela experimental foi constituída por três plantas (uma por tubete), com cinco repetições por tratamento, num total de 15 plantas por tratamento, em delineamento inteiramente casualizado.

Decorridos 90 dias da transferência para casa de vegetação, foram avaliados os seguintes parâmetros de crescimento: altura da parte aérea, diâmetro do pseudocaule (a 1,0 cm acima do coleto), número e comprimento de raízes, além da massa seca de raízes (MS'R), parte aérea (MS'PA) e total (MS'T) das plantas. A determinação da massa seca foi feita após secagem em estufa, a 60°C , por 48 horas, até peso constante.

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando o programa estatístico SANEST (Zonta & Machado, 1984), sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Na análise estatística, dados obtidos por contagem (x) foram transformados segundo $(x+0,5)^{0,5}$. Para a sobrevivência das plantas, os dados foram obtidos por simples observação visual e não foram analisados estatisticamente, sendo determinados pela razão entre o número de plantas desenvolvidas e o número total de plantas transferidas para as condições *ex vitro*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Enraizamento *in vitro*

Interação entre os fatores estudados (tempo de enraizamento e cultivares) foi observada apenas quanto à altura da parte aérea. Já em relação ao número e aocomprimento de raízes, verificou-se efeito isolado dos fatores (Tabela 1).

Entre as cultivares, a ‘Caipira’ apresentou os maiores valores para os parâmetros avaliados, sendo significativamente superior às demais. Em relação ao tempo de enraizamento, a maior permanência das plantas em meio de cultivo promoveu incremento para todas as características avaliadas, embora não tenham sido observadas diferenças significativas quanto ao número de raízes entre os 14, 21 e 28 dias, assim como também entre 7 e 14 dias para a altura da parte aérea (Tabela 1). Assim, pode-se inferir que, após a fase de indução dos primórdios radiculares, não há mais emissão de raízes, mas sim o desenvolvimento/alongamento destas. Este fato concorda com Grattapaglia & Machado (1990) e Woodhead & Bird (1998), segundo os quais o processo de enraizamento *in vitro* constitui-se de três fases: indução, iniciação e alongamento, sendo a duração de cada fase compreendida entre 1 a 3 semanas, a depender da espécie e das condições de cultivo.

De modo semelhante, Molla et al. (2004) evidenciaram maior número médio de raízes por explante, com aumento do período de cultivo em meio de enraizamento *in vitro*, independente das concentrações de AIB estudadas. Adicionalmente, os autores evidenciaram também pouco incremento no número de raízes entre o 20º e 25º dias de cultivo, tendo a maior média sido verificada aos 35 dias de cultivo *in vitro* em meio suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de AIB, com 8,28 raízes. Trabalhando com *Musa sapientum* cv. BARI-I, Rahman et al.

(2004) também constataram incremento no número de raízes com o tempo de cultivo *in vitro*, embora a média obtida nesta espécie tenha sido relativamente baixa (2,83 raízes aos 30 dias de cultivo).

TABELA 1. Influência do tempo de enraizamento *in vitro* sobre o número e comprimento de raízes e altura da parte aérea de plantas de diferentes cultivares de bananeira durante a fase de enraizamento *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Tempo (Dias)	Cultivares			Média
	Caipira	Preciosa	Japira	
Número de raízes				
7	2,7	1,6	1,5	1,9b
14	6,3	4,3	4,2	4,9a
21	6,4	4,3	4,2	5,0a
28	6,8	4,8	4,3	5,3a
Média	5,5A	3,7B	3,5B	
C.V. (%)	9,0			
Comprimento de raízes (cm)				
7	0,0	0,0	0,0	0,0d
14	3,5	1,9	1,9	2,4c
21	4,2	3,5	4,5	4,1b
28	6,3	6,0	5,6	6,0a
Média	3,5A	2,8B	3,0AB	
C.V. (%)	25,2			
Altura da parte aérea (cm)				
7	3,1cA	3,1bA	2,7bA	3,0c
14	3,5cA	3,1bB	2,9bAB	3,2c
21	4,7bA	3,2bB	4,0aA	4,0b
28	5,7aA	4,9aA	4,1aB	4,9a
Média	4,2A	3,6B	3,4B	
C.V. (%)	11,3			

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Para altura da parte aérea, nenhuma diferença significativa entre as cultivares estudadas foi evidenciada aos 7 dias, indicando que os explantes utilizados neste estudo foram homogêneos, com média de 3 cm. Analisando-se a interação, constata-se que as diferentes cultivares tiveram repostas diferenciadas

para cada tempo de enraizamento testado, embora a permanência das brotações por um maior período (28 dias) tenha promovido as maiores alturas. Esta especificidade de cada cultivar e as diferentes respostas obtidas neste trabalho podem ser atribuídas ao nível de oxidação observado na base dos explantes ainda nos primeiros dias após a inoculação, o qual foi mais expressivo nas cultivares Preciosa e Japira, grupo genômico AAAB, bem como também a constituição genômica de cada genótipo.

A oxidação verificada durante algumas das etapas do cultivo *in vitro* pode influenciar sobremaneira na absorção dos constituintes do meio pelo explante e, conseqüentemente, no crescimento destes, em virtude da obstrução do tecido oxidado, resultante da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina pelo tecido injuriado (Oliveira et al., 2001; Van Winkle et al., 2003). Nesse mesmo sentido, trabalho conduzido por Costa et al. (2006), com a bananeira 'Grande Naine' (AAA), durante a fase de multiplicação *in vitro*, demonstrou que a adição de 3 g.L⁻¹ de carvão ativado durante esta fase promove redução significativa do nível de oxidação, assim como também a obtenção de brotações mais altas, vigorosas e com maior número de raízes.

De acordo com Hirimburegama & Gamage (1997), cultivares portadoras do genoma B (*Musa balbisiana*) mostram maior escurecimento (oxidação) dos tecidos excisados ou cortados do que cultivares que apresentam apenas genoma A (*Musa acuminata*). Este escurecimento é mais intenso aos 2 dias de inoculação, após o qual há redução dos níveis de oxidação. Além do mais, entre os grupos genômicos avaliados, foi constatado acima de 75% de escurecimento na superfície dos explantes para o grupo BB, 50%-65% no ABB, de 50%-25% para o AAB e menos do que 25% para o AAA e AAAA.

Diferenças entre genótipos de bananeira foram observadas por Novak et al. (1990) para a massa fresca dos brotos, o que foi atribuído ao nível de ploidia e à constituição genômica dos híbridos estudados. Já Gübbük & Pekmezci

(2004), avaliando cultivares pertencentes ao subgrupo Cavendish, grupo AAA, verificaram diferenças quanto ao comprimento de raízes e diâmetro do pseudocaule, que variaram entre 8,74 e 10,15 cm e 4,49 e 6,14 mm, muito embora as cultivares não tenham sido comparadas entre si.

Aclimatização

O processo de aclimatização das plantas de bananeira micropropagadas, etapa primordial para a sobrevivência do material micropropagado, apresentou, ao final de 90 dias em casa de vegetação, elevada sobrevivência (acima de 80%), em todas as cultivares estudadas. Perdas foram verificadas apenas em plantas provenientes dos 7 e 14 dias de cultivo das cultivares Preciosa e Japira, respectivamente. Sob essas condições, observou-se pouco desenvolvimento da parte aérea (muitas vezes apresentando apenas uma folha expandida) e rizoma pouco definido, com fraca iniciação de primórdios radiculares, sugerindo baixa quantidade de reservas para sustentar seu desenvolvimento (Tabela 2).

TABELA 2. Percentual de mortalidade de plantas micropropagadas de cultivares de bananeira sob o efeito do tempo de enraizamento *in vitro*, após 90 dias de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Tempo (Dias)	Cultivares			Média
	Caipira	Preciosa	Japira	
Percentual de mortalidade (sobrevivência <i>ex vitro</i>)¹				
7	0,0 (100%)	20,0 (80%)	13,0 (87%)	11,0 (89%)
14	0,0 (100%)	0,0 (100%)	7,0 (93%)	2,0 (98%)
21	0,0 (100%)	0,0 (100%)	0,0 (100%)	0,0 (100%)
28	0,0 (100%)	0,0 (100%)	0,0 (100%)	0,0 (100%)
Média	0,0 (100%)	5,0 (95%)	5,0 (95%)	

¹ Valores obtidos pela relação entre o número de plantas desenvolvidas e o número total de plantas transferidas.

Estudando os efeitos de concentrações de AIB na formação de raízes e na subsequente transferência para condições *ex vitro* da bananeira cv. Bari, Molla et al. (2004) observaram de 95% a 100% de sobrevivência das plantas cultivadas por 15 e 20 dias em meio de cultura contendo entre 0,4 e 0,6 mg.L⁻¹ de AIB e submetidas à pré-aclimatização durante 7 dias à temperatura ambiente. Por outro lado, foi observado que plantas cultivadas *in vitro* por 5 dias não sobreviveram após o transplante, independentemente da concentração de auxina estudada, enquanto que, aos 10 dias, foi constatada entre 0% e 29,66% de sobrevivência, a qual aumentou com a concentração de AIB utilizada.

Já Bosa et al. (2003) verificaram 90% a 98% de sobrevivência *ex vitro* em plantas de *Gypsophila paniculata* enraizadas *in vitro* por 5 a 30 dias, respectivamente. Adicionalmente, foi observada resposta linear crescente, mostrando a importância da permanência das plantas *in vitro* sobre a acclimatização. A maior taxa de sobrevivência das plantas cultivadas por 30 dias foi atribuída ao maior acúmulo de reservas nos tecidos, conferindo maior resistência às folhas.

Resultados positivos quanto ao menor período de permanência em meio de enraizamento foram também evidenciados por Pereira & Fortes (2001), os quais verificaram que o transplante das brotações de macieira mantidas por 12, 15, 21 e 30 dias possibilitou a obtenção de uma taxa média de sobrevivência acima de 90%. Efeito semelhante foi observado por Ribas (1991), com a cultivar de macieira Gala, clone FZ, que verificou que períodos de 12, 15 e 20 dias de enraizamento também não apresentaram diferenças significativas na taxa de sobrevivência das plantas micropropagadas, variando entre 92% e 100%.

De acordo com Oliveira et al. (2001), brotos micropropagados de bananeira com tamanho inferior a 1,5 cm necessitam de maior período de alongamento em meio de enraizamento *in vitro* e são propensos a elevadas perdas durante a acclimatização. Além disso, o tipo de sistema radicular formado

ainda na fase de enraizamento *in vitro* tem sido considerado um dos fatores determinantes do sucesso na sobrevivência das plantas após o transplante, visto que, de acordo com Grattapaglia & Machado (1990), raízes mais curtas são mais adequadas, por se apresentarem em fase de crescimento ativo, facilitando a sobrevivência das plantas no momento da aclimatização.

Acrescente-se também que, embora existam trabalhos que reportem ser desejável a diminuição ou, até mesmo, a eliminação da etapa de enraizamento *in vitro*, devido ao aspecto econômico ou mesmo a possíveis benefícios ao sistema radicular (Debergh & Read, 1991; Pereira & Fortes, 2001), os resultados aqui apresentados demonstram que, para as cultivares de banana estudadas, esta fase é necessária, principalmente se as brotações tiverem tamanho reduzido nesse momento. Entretanto, pode-se otimizar o tempo de enraizamento *in vitro* sem, contudo, incorrer em perdas significativas de plantas, o que poderia possibilitar redução dos gastos com energia e mão-de-obra, uma vez que a maior permanência das culturas na sala de crescimento incrementa os custos da muda micropropagada (Bosa et al., 2003).

Em relação ao número e ao comprimento de raízes, observou-se interação significativa entre os fatores, enquanto que, para altura da parte aérea e diâmetro do pseudocaule, os fatores influenciaram de modo isolado (Tabela 3).

Na cultivar Caipira, verificou-se maior número de raízes em plantas mantidas por 7 dias em meio de enraizamento, embora diferenças significativas só tenham sido verificadas em relação às plantas cultivadas por 28 dias. Para comprimento de raízes, não foram observadas diferenças quanto ao tempo de enraizamento. Maior número e comprimento de raízes na cultivar Preciosa foram obtidos em plantas cultivadas por 21 e 28 dias. Já a cultivar Japira apresentou maior número e comprimento de raízes aos 21 dias, embora não tenha diferido daquelas enraizadas por 14 e 28 dias (Tabela 3).

Experimentos realizados por Blomme & Ortiz (2000), avaliando 11 genótipos de 6 grupos diferentes de *Musa*, sob dois métodos de propagação, diferentes idades vegetativas e cultivados em viveiro e condições de campo, mostraram haver boa formação do sistema radicular, independentemente da idade das plantas micropropagadas, fato associado ao vigor das plantas e à grande superfície foliar. No entanto, foram verificadas, ainda, diferenças em relação ao desenvolvimento do sistema radicular, tanto entre os grupos de *Musa* quanto para os diferentes tipos de propágulos (rebentos e micropropagados) testados, em que o sistema de micropropagação nem sempre favoreceu a melhor formação de sistema radicular.

Efeito benéfico do enraizamento *in vitro* no crescimento de raízes durante a aclimatização de plantas micropropagadas foram observados também por Carvalho et al. (1999) para a cultura do cafeeiro, embora este efeito não tenha sido verificado para a parte aérea. Já, Pereira & Fortes (2001) verificaram que, em macieira, quanto menor o tempo de permanência das brotações em meio de enraizamento, menor é o tamanho do sistema radicular e da parte aérea destas plantas em casa de vegetação, afetando, inclusive, o vigor das plantas. Além disso, os autores relatam que, por possuírem alta razão entre parte aérea e raiz, estas plantas tendem a apresentar problemas de sobrevivência, em razão da elevada transpiração, principalmente se a aclimatização for realizada nos meses mais quentes do ano.

De acordo com os resultados acima e com afirmações de Gribaudo et al. (1995), segundo os quais raízes formadas *in vitro* possuem substancial contribuição para o crescimento de videira durante a aclimatização, fica evidenciado que, nem sempre, as raízes formadas *in vitro* são não-funcionais.

Ainda quanto ao enraizamento *in vitro*, Thomas & Ravindra (1997) afirmam que a poda de raízes formadas *in vitro* proporciona maior facilidade no manejo e mais uniformidade no estande de plantas aclimatizadas de videira, em

comparação às plantas controle, além de elas apresentarem rápido crescimento e melhor sistema radicular. Já em experimento preliminar conduzido por estes autores, plantas controle contendo poucas raízes foram menos vigorosas, diferentemente daquelas com muitas raízes, que apresentaram mais vigor, após 4 semanas do plantio.

Quanto à altura da parte aérea e ao diâmetro do pseudocaule, constatou-se incremento nos valores destas variáveis à medida que as plantas permaneceram em meio de enraizamento. Isso mostra a importância de também se obter plantas com parte aérea mais alongada, já que aquelas cultivadas por 7 e 14 dias tiveram os piores resultados. Entre as cultivares, a 'Caipira' foi a que apresentou a maior altura de plantas, diferindo das demais. Tais resultados se devem, muito provavelmente, ao fato de essas plantas terem tido maior desenvolvimento *in vitro* em todos os tempos de enraizamento, favorecendo, assim, o conseqüente desenvolvimento *ex vitro* (Tabela 3).

Em relação ao diâmetro do pseudocaule, verificou-se que as cultivares Preciosa e Japira apresentam as maiores médias e foram significativamente superiores a cultivar Caipira. Já quando se avalia o fator tempo, observa-se um incremento no diâmetro, com a permanência das plantas *in vitro* até os 21 dias (Tabela 3).

TABELA 3. Influência do tempo de enraizamento sobre o número (NR) e comprimento de raízes, altura da parte aérea e diâmetro do pseudocaule, em diferentes cultivares de bananeira, após 90 dias de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Tempo (Dias)	Cultivares			Média
	Caipira	Preciosa	Japira	
Número de raízes				
7	8,0aA	5,9bcB	5,6bB	6,5ab
14	7,0abA	5,7cB	6,5abAB	6,3b
21	7,3abA	7,0abA	7,1aA	7,1a
28	6,4bA	7,2aA	6,5abA	6,7ab
Média	7,2A	6,4B	6,3B	
C.V. (%)	4,9			
Comprimento de raízes (cm)				
7	18,1aA	11,6cB	11,8bB	13,8b
14	18,7aA	13,5bcB	15,0aB	15,7b
21	18,4aA	15,3abB	16,2aAB	16,6a
28	16,9aA	16,3aA	16,1aA	16,4a
Média	18,0A	14,2B	14,8B	
C.V. (%)	9,6			
Altura da parte aérea (cm)				
7	11,8	9,9	9,2	10,3b
14	11,8	9,3	10,9	10,7b
21	16,8	13,7	14,4	15,0a
28	16,2	14,4	14,3	15,0a
Média	14,1A	11,8B	12,2B	
C.V. (%)	8,2			
Diâmetro do pseudocaule (cm)				
7	0,56	0,64	0,62	0,61b
14	0,65	0,65	0,69	0,66b
21	0,70	0,80	0,85	0,78a
28	0,72	0,82	0,77	0,77a
Média	0,66B	0,73A	0,73A	
C.V. (%)	7,2			

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Quanto à massa seca das plantas, cada cultivar foi influenciada de maneira distinta pelo tempo de permanência em meio de enraizamento *in vitro*. Para a cv. Caipira, maiores MS'R e MS'T foram verificadas aos 21 e 28 dias de

cultivo, embora o tempo de 21 dias não tenha diferido significativamente do cultivo aos 7 dias, para a MS'R. Por outro lado, maior MS'PA foi observada para brotações cultivadas por 21 dias (Tabela 4).

Efeitos semelhantes foram observados para a cultivar Japira, que apresentou maior MS'R quando as plantas foram submetidas a 21 e 28 dias de cultivo *in vitro*, sendo significativamente superiores aos demais tempos de permanência. Para a MS'PA e MS'T, a permanência das brotações por período de 21 dias possibilitou os melhores resultados. Já para a cultivar Preciosa a permanência das brotações por maior período (28 dias) promoveu os melhores resultados para a MS. Contudo, acrescenta-se que, avaliando-se isoladamente as médias dos fatores, observou-se que a cultivar Caipira foi superior às demais, exceção verificada apenas para MS'PA. Além disso, maior permanência em meio de enraizamento teve efeito benéfico mais pronunciado sobre a MS (Tabela 4).

Avaliando-se a possibilidade de redução do tempo de cultivo *in vitro* de plantas de bananeira por meio da inoculação com fungo micorrízico e diferentes estádios de enraizamento, Lins et al. (2003) não observaram diferença significativa na produção de parte aérea entre as plantas enraizadas ou apresentando estágio intermediário de enraizamento. Adicionalmente, também foi observado que o uso de plantas enraizadas resultou em mudas com maior crescimento de radículas no processo de aclimatização. Dessa forma, os autores concluíram que plantas em estágio intermediário de enraizamento podem trazer mais benefícios ao seu posterior desenvolvimento *ex vitro*, economizando tempo e espaço na formação das mudas *in vitro*.

TABELA 4. Influência do período de enraizamento *in vitro* sobre a massa seca de raízes (MS'R), parte aérea (MS'PA) e total (MS'T) de diferentes cultivares de bananeira, após 90 dias de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Tempo (Dias)	Cultivares			Média
	Caipira	Preciosa	Japira	
Massa seca de raízes (g)				
7	0,49bA	0,18cB	0,19bB	0,29c
14	0,35cA	0,22cB	0,23bB	0,27c
21	0,54abA	0,35 bB	0,38aB	0,42b
28	0,65aA	0,56aA	0,42aB	0,54a
Média	0,51A	0,33B	0,30B	
C.V. (%)	19,9			
Massa seca de parte aérea (g)				
7	0,25cA	0,17bA	0,17cA	0,20c
14	0,30cA	0,23bA	0,25cA	0,26c
21	0,82aA	0,50aB	0,92aA	0,75a
28	0,55bA	0,56aA	0,53bA	0,55b
Média	0,48A	0,36B	0,47A	
C.V. (%)	25,1			
Massa seca total (g)				
7	0,70bA	0,30cB	0,40cB	0,50b
14	0,60bA	0,44cB	0,50cAB	0,50b
21	1,4aA	0,85bB	1,30aA	1,2a
28	1,2aA	1,1aAB	0,94bB	1,1a
Média	0,97A	0,65B	0,77B	
C.V. (%)	15,7			

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Já em estudo realizado com plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata*, Bosa et al. (2003) verificaram, aos 30 dias de aclimatização, aumento no volume de raízes para as plantas que permaneceram entre 15 e 25 dias sob enraizamento *in vitro*, não sendo mais verificado incremento significativo a partir de então. Já em relação ao acúmulo da massa seca das folhas, melhor resultado foi observado nas mudas cujas brotações permaneceram entre 15 e 20 dias no meio de enraizamento, período acima do qual houve redução na taxa de crescimento. Além disso, comportamento quadrático

ascendente também foi observado para massa seca de raízes, em que maior acúmulo foi observado nas mudas cujas plantas permaneceram entre 15 e 20 dias no enraizamento. Nesse mesmo sentido, Pereira & Fortes (2001) verificaram um comportamento linear ascendente quanto à matéria seca de plantas de macieira micropropagadas, tanto da parte aérea como das raízes, com o aumento do tempo de permanência das brotações em meio de enraizamento.

4 CONCLUSÕES

1. Com exceção do diâmetro de pseudocaule, a cultivar Caipira apresenta desenvolvimento vegetativo *in vitro* e *ex vitro* (altura de plantas, número e comprimento de raízes e massa seca da parte aérea e radicular) superior ao das cultivares Preciosa e Japira.
2. A fase de indução de raízes em brotações de bananeira *in vitro* ocorre até os 14 dias de cultivo em meio de enraizamento. Após este período, há apenas o crescimento em tamanho das raízes.
3. O crescimento em altura das plantas é diretamente proporcional ao tempo de permanência de brotações de bananeira em meio de enraizamento *in vitro*.
4. A sobrevivência de plantas de bananeira em casa de vegetação atinge 100%, após 21 dias de cultivo em meio de enraizamento.

5 AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e concessão das bolsas de estudos. À Embrapa Acre pelo material vegetal utilizado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLOMME, G.; ORTIZ, R. Preliminary assessment of root systems morphology in *Musa*. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 540, p. 259-266, 2000.

BORGES, A. L.; SILVA, S. de O. e; CALDAS, R. C.; LEDO, C. A. da S. Teores foliares de nutrientes em genótipos de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 314-318, ago. 2006.

BOSA, N.; CALVETE, E. O.; NIENOW, A. A.; SUZIN, M.; Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 207-210, abr./jun. 2003.

CARVALHO, G. R., PASQUAL, M.; RESENDE, E.; SCARANTE, M. J. Aclimatização de plantas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 483-490, jul./set. 1999.

COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. de. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grande Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 280-283, ago. 2006.

CUZZUOL, G. R. F.; GALLO, L. A.; CROCOMO, O. J. Enraizamento de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro* e *ex vitro*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 60. 66, jan./abr. 1996.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Amsterdam: Kluwer Academic, 1991. p. 1-13

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361 p. Part 2: In Practice.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa CNPH, 1990. p. 99-169.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. p. 183-260.

GRIBAUDO, I.; MORTE, M. A.; SCHUBERT, A. Use of gentian Violet to differentiate *in vitro* and *ex vitro* formed roots during acclimatization of grapevine. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 41, n. 2, p. 187-188, May 1995.

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

HIRIMBUREGAMA, K.; GAMAGE, N. Cultivar specificity with respect to *in vitro* micropropagation of *Musa* spp. (banana and plantain). **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 72, n. 2, p. 205-211, Mar. 1997.

KÖPPEN, W. **Climatología**: con un estudio de los climas de la tierra. Mexico: Fondo de Cultura Economica, 1948. 478 p.

LINS, G. M. de L.; TRINDADE, A. V.; ROCHA, H. S. Utilização de *Gigaspora margarita* em plantas micropropagadas de bananeira em diferentes estádios de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 1, p. 143-147, abr. 2003.

MOLLA, M. M. H.; KHANAM, M. D.; KHATUN, M. M.; AL-AMIN, M.; MALEK, M. A. *In vitro* rooting and *ex vitro* plantlet establishment of BARI banana 1 (*Musa* sp.) as influenced by different concentration of IBA (indole 3-butyric acid). **Asian Journal of Plant Sciences**, Bholakpur, v. 3, n. 2, p. 196-199, 2004.

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

NOVAK, F. J.; AFZA, R.; VAN DUREN, M.; OMAR, M. S. Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot tips of banana and plantains (*Musa* cvs.). **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 67, n. 1, p. 21-28, Jan. 1990.

OLIVEIRA, R. P. de; SILVEIRA, D. G.; SILVA, S. de O. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (grupo AAAB). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 73-78, jan./mar. 2001.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. de L. Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 2, p. 417-420, ago. 2001.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Aclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishing, 1991. cap. 5, p. 71-93.

RAHMAN, M. Z.; NASIRUDDIN, K. M.; AMIN, M. A.; ISLAM, M. N. *In vitro* response and shoot multiplication of banana with BAP and NAA. **Asian Journal of Plant Sciences**, Bholakpur, v. 3, n. 4, p. 406-409, 2004.

RIBAS, L. L. F. **Micropropagação e estudo da parada de crescimento durante a aclimatização de mudas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv. Gala, clone FZ**. 1991. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ROCHA, H. S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira “Prata Anã”: alterações morfoanatômicas**. 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, E. A. da; BOLIANI, A. C.; CORRÊA, L. de S. Avaliação de cultivares de bananeira (*Musa* sp) na região de Selvíria-MS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 101-103, abr. 2006.

SILVA, S. de O. e; GASPAROTTO, L.; MATOS, A. P. de; CORDEIRO, Z. J. M.; FERREIRA, C. F.; RAMOS, M. M.; JESUS, O. N. de. **Programa de melhoramento de bananeira no Brasil – resultados recentes**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 36 p. (Documentos, 123).

THOMAS, P.; RAVINDRA, M. B. Effect of pruning or removal of *in vitro* formed roots on *ex vitro* rot regeneration and growth in micropropagated grapes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, n. 3, p. 177-180, 1997.

VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, n. 12, p. 1175-1182, Aug. 2003.

WOODHEAD, J. L.; BIRD, K. T. Efficient rooting and acclimation of micropropagated *Ruppia maritima* Loisel. **Journal of Marine Biotechnology**, New York, v. 6, n. 3, p. 152-156, 1998.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. SANEST - **Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: UFPel, SEI, 1984. 138 p.

ARTIGO 2

MICROPROPAGAÇÃO DE CULTIVARES DE BANANEIRA, EM FUNÇÃO DE ALTERAÇÕES NO AMBIENTE DE CULTIVO

(Preparado de acordo com as normas da Revista Ciência Rural)

**Frederico Henrique da Silva Costa; Moacir Pasqual; Jonny Everson
Scherwinski Pereira; Hermínio Souza Rocha; Luzia Yuriko Miyata**

RESUMO

MICROPROPAGAÇÃO DE CULTIVARES DE BANANEIRA, EM FUNÇÃO DE ALTERAÇÕES NO AMBIENTE DE CULTIVO

O uso de mudas micropropagadas de bananeira em plantações comerciais encontra-se bastante difundido entre os produtores dedicados à produção de frutas de qualidade e ou voltados a mercados de exportação. Dessa forma, estudos que possibilitem redução dos custos de produção e a melhoria na qualidade das mudas obtidas podem tornar ainda mais evidente o emprego deste tipo de material propagativo. Objetivou-se avaliar a influência do ambiente de cultivo e de concentrações de sacarose sobre o enraizamento *in vitro* e aclimatização de cultivares de bananeira. Para o enraizamento *in vitro*, brotações axilares provenientes da fase de multiplicação foram cultivadas em meio básico de MS, adicionado de 1 mg.L⁻¹ de ANA e 6 g.L⁻¹ de ágar (Merse®). Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2x2x2, com duas cultivares (Caipira e Pacovan), duas concentrações de sacarose (15 e 30 g.L⁻¹) e dois ambientes de cultivo (natural, em casa de vegetação e artificial, em sala de crescimento). Ao final de 45 dias, altura da parte aérea, número de raízes e de folhas senescentes e massa seca das plantas foram avaliados. Na aclimatização, plantas submetidas aos mesmos tratamentos mencionados foram transferidas para tubetes de 0,3 L preenchidos pela mistura de terra de subsolo:Plantmax HT®:casca de arroz carbonizada (1:1:1 v/v), acrescido de 50.g L⁻¹ de húmus e 20 g.L⁻¹ de super simples, permanecendo sob condições de casa de vegetação por 75 dias. Decorrido este período, altura da parte aérea, número de folhas expandidas e de raízes, comprimento de raízes, diâmetro do pseudocaule e massa seca de raízes, parte aérea e total foram avaliados. Verificou-se que, com exceção da altura da parte aérea, o enraizamento *in vitro* das brotações axilares sob ambiente de luz natural com 30 g.L⁻¹ de sacarose proporciona as melhores respostas para a cultivar Caipira e sua subsequente aclimatização. Para a cultivar Pacovan, o cultivo sob luz artificial com 30 g.L⁻¹ de sacarose possibilita melhores resultados, embora a luz natural possa ser satisfatoriamente utilizada. A luz natural, durante a etapa de enraizamento *in vitro*, pode ser utilizada para a produção de mudas de bananeira, contribuindo, assim para a redução nos custos e nas perdas na aclimatização, uma vez que possibilita a rustificação das plantas obtidas, com 100% de sobrevivência.

Palavras-chave: *Musa* spp., luz natural, enraizamento *in vitro*, aclimatização.

ABSTRACT

MICROPROPAGATION OF BANANA CULTIVARS IN FUNCTION OF ALTERATIONS IN THE ATMOSPHERE OF CULTIVATION

The use of micropropagated banana plants in commercial plantations must be a normal practice among producers dedicated to the production of fruits with quality destined to the exportation markets. In this way, the reduction of the production costs and the employment of practices to improve the quality of the plants can turn more evident the utilization of this type of propagative material. This work intended to evaluate the influence of the atmosphere of cultivation and sucrose concentrations on the *in vitro* rooting and acclimatization of bananas. For the *in vitro* rooting, axillary shoots from multiplication phase were cultivated in MS medium within 1 mg.L^{-1} NAA and 6 g.L^{-1} agar (Merse®). The treatments were disposed in a 2x2x2 factorial scheme being: two cultivars (Caipira and Pacovan), two concentrations of sucrose (15 and 30 g.L^{-1}) and two atmospheres of cultivation (natural, greenhouse and artificial, growth room). After 45 days, height of the aerial part, number of roots and senescence leaves and dry mass of the plants were evaluated. In the acclimatization, plants were submitted to the same treatments mentioned above and transferred to plastic tubes with capacity of 0,3 L filled with a mixture of subsoil earth: Plantmax HT®: carbonized rice rusk (1:1:1 v/v), and with 50 g.L^{-1} humus and 20 g.L^{-1} super simple fertilizer, at greenhouse conditions for 75 days. After this period it was evaluated the height of the aerial part, number of expanded leaves and roots, length of roots, diameter of the pseudostem and dry mass of the roots and aerial parts of the plants. It was verified that, except for height of the aerial part, the rooting of the axillary shoots under conditions of natural light and medium within 30 g.L^{-1} of sucrose provides the best results for Caipira cultivar and its subsequent acclimatization. For Pacovan, the cultivation under conditions of artificial light and medium with 30 g.L^{-1} of sucrose provide the best results, although natural light also can be used satisfactorily. The utilization of natural light during the stage of rooting of bananas *in vitro* are useful to production of microplants, contributing to the reduction of costs and in the losses during the acclimatization, once it facilitates the plant rusticity, with 100% of survival.

Keywords: *Musa* spp., natural light, *in vitro* rooting, acclimatization.

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 espécies frutíferas tropicais (Donato et al., 2006). No Brasil, segundo maior produtor mundial, a bananeira é cultivada de norte a sul do país, sendo uma das mais importantes fruteiras, ocupando cerca de 485 mil hectares plantados (Borges et al., 2006; Weber et al., 2006). Entretanto, a produtividade nacional é baixa, o que se deve, entre outros fatores, ao baixo nível tecnológico adotado para seu cultivo.

Um dos principais aspectos que limitam a expansão da cultura da bananeira é a utilização de mudas produzidas por meio de métodos convencionais que, além de apresentarem baixa taxa de multiplicação, podem se constituir num mecanismo de disseminação de doenças e pragas (Roels et al., 2005), ocasionando perdas que podem alcançar 100% na produtividade, no caso da sigatoka-negra (Silva et al., 2003).

Apesar de, teoricamente, cada folha de bananeira poder originar uma gema vegetativa, este potencial não se traduz naturalmente em filhotes (perfilhos/rebentos), em grande parte, pela influência da dominância apical da planta mãe e dos filhotes já desenvolvidos. Assim, de modo geral, o número de perfilhos da bananeira varia de 3 a 10 filhotes por matriz/ciclo (Vuylsteke & De Langhe, 1985), dependendo da cultivar e das condições de manejo da cultura.

Diante dessas limitações, a produção de mudas por micropropagação constitui uma importante ferramenta para a obtenção massal de clones de genótipos elite (Kozai et al., 1997), 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; Rocha, 2005).

Relatos das primeiras aplicações da micropropagação na multiplicação de espécies do gênero *Musa* datam da década de 1960. Desde então, houve uma intensificação nos trabalhos de pesquisa visando à utilização de técnicas mais eficientes, produtivas e menos onerosas. Dentre os avanços obtidos para a diminuição dos custos de produção, a substituição das lâmpadas fluorescentes, comumente utilizadas nas salas de crescimento pela luz natural, associada ou não à redução nos níveis exógenos de sacarose, é um dos mais importantes (Kodym & Zapata-Arias, 1999, 2001; Sendin, 2001; Rocha, 2005). Isso porque os gastos com iluminação artificial nas salas de cultivo somam, aproximadamente, 65% do total de energia elétrica utilizada nos laboratórios de cultura de tecidos de plantas (Standaert de Metsenaere, 1991).

Nesse sentido, efeitos benéficos da utilização da luz solar, associada a algumas modificações na composição nutricional e física dos meios de cultura, foram observados para a micropropagação das cultivares de bananeira ‘Grande Naine’ (AAA) e ‘Maçã’ (AAB), com redução nos custos de produção das mudas de até 90% (Kodym & Zapata-Arias, 1999, 2001; Sendin, 2001). Contudo, as informações e o entendimento sobre os efeitos da luz natural sobre as plantas cultivadas *in vitro* e, mais ainda, sobre sua subsequente aclimatização, ainda são incipientes. Dessa forma, a realização de pesquisas que contribuam para uma melhor compreensão de seus efeitos sobre mudas micropropagadas se torna necessário para melhores aceitação e aplicação desta fonte de luz, na obtenção massal de plantas de bananeira.

Além disso, modificações nas concentrações exógenas de carboidratos nos meios de cultivo podem ser determinantes para que se alcancem elevadas taxas de sobrevivência de plantas na aclimatização (Calvete, 1998; Leite et al.,

2000), já que influenciam vários processos metabólicos nas culturas, com efeitos diretos sobre o crescimento e a diferenciação dos tecidos (George, 1996).

Assim, objetivou-se avaliar a influência do ambiente de cultivo e de concentrações de sacarose sobre o enraizamento *in vitro* e a aclimatização de cultivares de bananeira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Anexos do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, região Sul do estado de Minas Gerais, a 918 m de altitude, latitude 21°14'S e longitude 45°00'GRW. Segundo a classificação climática de Köppen (1948), o clima regional é do tipo Cwa, com características Cwb, apresentando duas estações definidas: seca, com temperaturas mais baixas de abril a setembro, e chuvosa, com temperaturas mais elevadas, de outubro a março. Os experimentos foram conduzidos entre os meses de março a julho de 2006.

Material vegetal

Foram utilizadas brotações axilares (com aproximadamente 2,0 a 3,0 cm e 1 a 2 folhas expandidas) provenientes do estabelecimento e multiplicação *in vitro* de ápices caulinares de plantas matrizes das cultivares de bananeira Caipira (AAA) e Pacovan (AAB). O meio básico utilizado para a obtenção dos explantes foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 5 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina). Os subcultivos, realizados a cada 35 dias, foram mantidos em sala de crescimento, sob temperatura de 25 ± 2°C, irradiância de 42 W.m⁻² e fotoperíodo de 16 horas.

Experimento 1. Fase de enraizamento *in vitro*

Para o enraizamento *in vitro* das brotações de bananeira, que teve duração de 45 dias, empregaram-se os sais e vitaminas do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 1 mg.L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético). Ambos os meios utilizados para a obtenção dos explantes e na fase de enraizamento

foram solidificados com 6 g.L^{-1} de ágar (Merse[®]) e tiveram o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do agente geleificante, sendo, em seguida, autoclavados, por 20 minutos a 120°C e 1 atm.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial $2 \times 2 \times 2$, constituído de duas concentrações de sacarose (15 e 30 g.L^{-1}), duas cultivares de bananeira (Caipira e Pacovan) e dois ambientes de cultivo (sala de crescimento, ambiente artificial e casa de vegetação, ambiente natural), totalizando oito tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e quatro explantes por parcela. O cultivo foi feito em frascos de 250 mL contendo 40 mL de meio, selados com parafilme transparente.

Caracterização do ambiente de cultivo

Ambiente artificial: sala de crescimento com iluminação artificial fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia especial (OSRAM 20 W), com irradiância média de 42 W.m^{-2} , fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Ambiente natural: casa de vegetação coberta por filme de polietileno transparente com tratamento contra raios ultravioletas (150 microns) e sombreamento de 70% (Sombrence[®]), apresentando os seguintes parâmetros ambientais: temperaturas máximas, mínimas e médias de $26^\circ\text{C}/32^\circ\text{C}$, $16^\circ\text{C}/16^\circ\text{C}$ e $20^\circ\text{C}/23^\circ\text{C}$ e níveis de irradiância, máximos, mínimos e médios, de $93,95 \text{ W.m}^{-2}/199,69 \text{ W.m}^{-2}$, $11,13 \text{ W.m}^{-2}/10,66 \text{ W.m}^{-2}$ e $49,38 \text{ W.m}^{-2}/99,43 \text{ W.m}^{-2}$, referentes a dias nublados e claros típicos do período de experimentação.

Dados referentes à radiação solar diurna, incidente na altura dos frascos na sala de crescimento e casa de vegetação, foram obtidos por sensores de radiação (LI-200SA, Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Li-cor.Neb), a cada meia hora, durante 11 horas (das 7:00 às 18:00 horas). Para o ambiente de sala de crescimento, foi feita apenas uma

medida da radiação, durante 6 horas, visto se tratar de ambiente controlado. Para a coleta de dados referentes às temperaturas mínimas, médias e máximas semanais, empregou-se um termo-higrógrafo.

Experimento 2. Fase de aclimatização

Para este ensaio, utilizaram-se plantas submetidas aos mesmos tratamentos estudados na fase de enraizamento *in vitro*. Essas plantas foram inicialmente removidas dos frascos de cultivo e, em seguida tiveram suas raízes lavadas em água corrente e imediatamente transferidas para tubetes de 0,3 L preenchidos com substrato composto pela mistura de terra de subsolo (abaixo de 40 cm):Plantmax Hortaliças HT[®]:casca de arroz carbonizada (1:1:1 v/v), acrescido de 50.g L⁻¹ de húmus e 20 g.L⁻¹ de super simples.

Após o transplante, as plantas foram mantidas em casa de vegetação, coberta por filme de polietileno transparente com tratamento contra raios ultravioletas (150 microns), sombreamento de 70% (Sombrence[®]) e apresentando sistema de nebulização intermitente, permanecendo sob estas condições por 60 dias. A parcela experimental foi constituída de três plantas (uma por tubete).

Avaliações

Para a fase de enraizamento *in vitro*, foram avaliados os seguintes parâmetros de crescimento: altura da parte aérea, número de folhas senescentes e de raízes e massa seca total. Já para a fase de aclimatização, avaliaram-se ao final de 60 dias, a altura da parte aérea (APA), o número de folhas expandidas (NF'EXP) e de raízes (NR), o comprimento médio de raízes (CR), o diâmetro do pseudocaule (DP) (1,0 cm acima do coleto), a massa seca de raízes (MS'R), da parte aérea (MS'PA) e total (MS'T) das plantas. A determinação da massa seca

foi feita após secagem das plantas em estufa, a 60°C, por 48 horas, até peso constante.

Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x2, sendo duas concentrações de sacarose (15 e 30 g.L⁻¹), duas cultivares (Caipira e Pacovan) e dois ambientes de cultivo (natural e artificial), tendo sido utilizadas cinco e sete repetições por tratamento nos experimento 1 e 2, respectivamente.

Os dados obtidos foram inicialmente submetidos às análises de variâncias individuais (correspondente a cada ambiente de cultivo), realizando-se em seguida, o teste de homogeneidade de variância e a análise conjunta dos ambientes. Para isso, o programa estatístico Sisvar 4.3 (Ferreira, 2000) foi utilizado, sendo as médias comparadas pelo Teste F, a 5% de probabilidade. Dados referentes à sobrevivência das plantas foram obtidos por simples observação visual e expressos pela razão entre o número de plantas desenvolvidas e o número total de plantas transferidas para as condições *ex vitro*, não tendo sido analisados estatisticamente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fase de enraizamento *in vitro*

Nenhuma interação significativa entre os três fatores estudados (ambiente x sacarose x cultivar) foi observada para a fase *in vitro*. Nesta condição, efeito significativo ocorreu somente entre as interação A x S e C x S, para as variáveis NF'SEN e NR (Tabelas 1 e 3) e para NF'SEN, APA, MS'T e NR (Tabelas 1, 2 e 3), respectivamente. Influência do ambiente de cultivo sobre as cultivares (A x C) foi ainda observada, neste caso para a APA, MS'T e NR (Tabela 2 e 3).

O número de folhas senescentes (NF'SEN) foi estatisticamente superior em plantas enraizadas em ambiente natural, em ambas as concentrações de sacarose testadas. Já em relação às cultivares, diferenças significativas foram verificadas apenas para 'Caipira', com maior senescência foliar na concentração de 15 g.L⁻¹ (Tabela 1).

Essa maior senescência foliar em plantas enraizadas em ambiente natural é benéfica para a qualidade das plantas, favorecendo, inclusive, seu posterior desenvolvimento *ex vitro*. Isso porque novas folhas emitidas em ambiente de luz natural estão mais sujeitas à influência de flutuações ambientais (temperatura, irradiância e umidade), as quais são mais parecidas às condições do ambiente *ex vitro*. Esse fato pode possibilitar rustificação das plantas e, conseqüentemente, menor estresse no momento do transplântio para a casa de vegetação. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Jorge et al. (2000), que também verificaram aumento no número de folhas senescentes em plantas de mandioca micropropagadas com o incremento nos níveis de densidade de fluxo fótons fotossintéticos, ou PPFDs, entre 29 e 369 mmol.s⁻¹.m⁻².

Em geral, sugere-se que a fotossíntese em folhas formadas *in vitro*, em meio contendo sacarose, inicie um importante papel, por contribuir para a emissão e a expansão foliar de novas folhas *in vitro*, bem como durante o posterior desenvolvimento *ex vitro* (Yué et al., 1993). No entanto, apesar de as folhas formadas *in vitro* mostrarem função nutritiva transitória, o subsequente crescimento *ex vitro* pode ser suportado somente pelas folhas desenvolvidas após o transplântio para as condições *ex vitro* (Grout & Millam, 1985).

TABELA 1. Número de folhas senescentes (NF'SEN), em diferentes cultivares de bananeira sob a influência do ambiente de cultivo (Natural e Artificial) e concentrações de sacarose (15 e 30 g.L⁻¹), após 45 dias de enraizamento *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Sacarose (g.L ⁻¹)	Ambiente		Média	Cultivar		Média
	Natural	Artificial		Caipira	Pacovan	
15	1,9 Aa	0,4 Ba	1,2 a	1,2 Aa	1,2 Aa	1,2 a
30	1,4 Ab	0,6 Ba	1,0 a	0,7 Bb	1,3 Aa	1,0 a
Médias	1,7 A	0,5 B		0,9 B	1,2 A	
CV (%)						20,57

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Para a altura da parte aérea, maiores médias para a cultivar Caipira foram obtidas em ambiente artificial com 15 ou 30 g.L⁻¹ de sacarose, enquanto que, para a 'Pacovan', o cultivo em ambiente artificial e a concentração de 15 g.L⁻¹ promoveram resultados significativamente superiores (Tabela 2). A ocorrência de plantas de menor altura já era esperada no tratamento sob luz natural (casa de vegetação), uma vez que as brotações utilizadas neste trabalho foram obtidas de ambiente com níveis de irradiância inferiores àqueles verificados durante o período de cultivo sob ambiente natural. Esse fato, possivelmente, favoreceu a senescência de folhas e, conseqüentemente, o maior estresse das plantas oriundas de condições de baixa luminosidade. Por outro lado, brotações submetidas ao ambiente artificial não aparentaram apresentar

estresse ambiental, como a senescência das folhas advindas da fase de multiplicação, pois continuaram sob o mesmo nível de irradiância, favorecendo, assim, seu crescimento.

TABELA 2. Altura da parte aérea e massa seca total, em diferentes cultivares de bananeira sob a influência do ambiente de cultivo (Natural e Artificial) e concentrações de sacarose (15 e 30 g.L⁻¹), após 45 dias de enraizamento *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Cultivar	Ambiente		Média	Sacarose		Média
	Natural	Artificial		15	30	
Altura da parte aérea (cm)						
Caipira	4,2 Ba	6,6 Aa	5,4 a	5,3 Ab	5,5 Aa	5,4 a
Pacovan	3,7 Bb	6,8 Aa	5,3 a	5,8 Aa	4,8 Bb	5,3 a
Médias	4,0 B	6,7 A		5,5 A	5,1 B	
CV (%)						9,48
Massa seca total (g)						
Caipira	0,11 Aa	0,10 Ab	0,10 b	0,10 Aa	0,11 Ab	0,10 b
Pacovan	0,12 Ba	0,15 Aa	0,13 a	0,11 Ba	0,16 Aa	0,13 a
Médias	0,11 A	0,13 A		0,11 B	0,13 A	
CV (%)						21,13

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Outra possível razão para o reduzido crescimento das plantas em ambiente de luz natural pode ser atribuída às baixas temperaturas (16°C e 20°C) observadas nesta condição de cultivo. De acordo com Robinson (2003), a bananeira é uma espécie frutífera tropical, para a qual a temperatura ótima para emergência foliar é de cerca de 31°C e a temperatura global média para o ótimo crescimento (assimilação) e o desenvolvimento (emergência foliar) é de, aproximadamente, 27°C. Adicionalmente, a ocorrência de temperatura de 24°C pode promover decréscimo na taxa de emergência foliar de plantas *in vitro*, reduzindo a eficiência fotossintética (Thinguyen & Kozai, 2001).

Resultados contrários foram reportados por Rocha (2005), segundo o qual nenhum efeito significativo do ambiente de cultivo (artificial ou natural) foi

constatado quanto à altura da parte aérea (CPA). Este resultado é, possivelmente, atribuído às condições ambientais em que o trabalho de Rocha (2005) foi conduzido (Cruz das Almas-BA), pois, naquela localidade, as temperaturas médias são mais elevadas do que em Lavras (MG) e, sendo a bananeira de clima tropical, se desenvolve bem em temperaturas superiores às verificadas durante a realização deste trabalho (Robinson, 2003).

Quanto à massa seca total, nenhum efeito significativo do ambiente de cultivo e sacarose foi notado para a cultivar Caipira, diferentemente da cultivar Pacovan, para qual o ambiente artificial com 30 g.L⁻¹ proporcionou resultados superiores (Tabela 2). Esta ausência de diferenças observada para MS total na ‘Caipira’ demonstra que, embora as brotações crescidas em ambiente de luz natural tenham apresentado plantas com menor altura da parte aérea, possivelmente ocorreu menor acúmulo de água nos tecidos submetidos a esta condição, já que a massa seca representa o crescimento efetivo de quaisquer órgãos vegetais.

Efeitos semelhantes do ambiente de cultivo foram também verificados por Rocha (2005), em que o meio de enraizamento, acrescido com 30 g.L⁻¹ de sacarose, na condição de luz natural e artificial, possibilitou os maiores valores para a variável massa seca total (MS'T), com 0,46 g e artificial 0,31 g. Couceiro et al. (2001), estudando os efeitos da sacarose no enraizamento *in vitro* da bananeira cv. Maçã (AAB), verificaram que plantas cultivadas em meio contendo concentrações mais baixas de sacarose (20 e 40 g.L⁻¹) apresentaram maior conteúdo de água em seus tecidos e, portanto, apresentaram maior massa fresca. Já Navarro et al. (1994), trabalhando a bananeira ‘Grande Naine’ (AAA), observaram que, após 30 dias de cultivo *in vitro*, o rendimento de massa seca sob alta intensidade luminosa (240 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) foi 2,3 vezes superior ao tratamento controle (30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Efeitos positivos da adição exógena de sacarose e do aumento na intensidade luminosa foram anteriormente reportados por Marchal et al. (1992), com a banana 'Grande Naine' (AAA). Estes autores demonstraram que o aumento da intensidade luminosa, de 45 para 340 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, com 40 g.L^{-1} de sacarose, promoveu ganho de massa fresca (1,89 e 3,87 g) e seca (0,12 e 0,24 g) das plantas, além de causar redução quanto à altura da parte aérea (3,33 e 2,88 cm). Posteriormente, também com a cultivar Grande Naine, Folliot & Marchal (1992), avaliando a influência do aumento nos níveis de sacarose (40, 70, 100 e 130 g.L^{-1}) na fase de enraizamento, evidenciaram tendência de redução na massa fresca com o incremento de sacarose, sendo este efeito mais pronunciado na concentração de 130 g.L^{-1} . No entanto, estes autores notaram, ainda, que a massa seca da parte aérea e total das plantas teve incremento até 130 g.L^{-1} e 100 g.L^{-1} , respectivamente. Já em relação à massa seca de raízes, houve decréscimo após 100 g.L^{-1} , além de não haver emissão de raízes nos primeiros 15 dias de cultivo.

Estudando as respostas de plantas de morangueiro cultivadas em distintas concentrações de sacarose na fase de enraizamento *in vitro*, Calvete et al. (2002) verificaram que, ao incorporarem 15 g.L^{-1} de sacarose ao meio de cultivo [potencial osmótico = -0,112 MPa, segundo George (1996)], além de as plantas apresentarem energia suficiente para sustentar seu crescimento na aclimatização, também tiveram maior acúmulo de massa fresca aérea. Entretanto, aquelas que cresceram em meio com 45 g.L^{-1} [potencial osmótico = -0,300 MPa, segundo George (1996)] acumularam maior massa seca em seus tecidos. Já plantas desenvolvidas em meio com 60 g.L^{-1} de sacarose [potencial osmótico = -0,461 MPa, segundo George (1996)] apresentaram inibição do desenvolvimento da parte aérea. Além disso, os autores constataram haver boa relação de dependência entre conteúdo de água e concentração de sacarose no meio, tendo sido observada diminuição na porcentagem de água nos tecidos para cada grama de sacarose adicionada ao meio de enraizamento, correspondendo a

um decréscimo de 3,12 % de água nos tecidos das raízes e de 1,84 % na parte aérea.

Aspectos como qualidade espectral, intensidade e duração do período luminoso podem influenciar diretamente a taxa e a duração da divisão celular, a velocidade do crescimento celular, a acumulação de pigmentos e a diferenciação dos plastídios, assim como o tamanho final das células das plantas *in vitro* (Kozai et al., 1997; Souza et al., 1997). Nesse mesmo sentido, Sedin (2001) afirma que o aumento da radiação luminosa, geralmente, incrementa a atividade fotossintética, a produção de hidratos de carbono e o teor de matéria seca.

Em geral, na medida em que se eleva a concentração de sacarose do meio de cultivo, se pode inferir que há maior concentração de carboidratos (ou de reservas) no tecido foliar, promovendo às folhas maior capacidade de permanecer mais tempo na planta.

Em relação ao número de raízes, melhores respostas para a cultivar Pacovan foram observadas quando as brotações foram cultivadas em meio acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose em ambiente artificial. Por outro lado, nenhum efeito significativo do ambiente de cultivo e concentração de sacarose foi verificado para a 'Caipira' (Tabela 3).

O desenvolvimento de um sistema radicular mais forte e vigoroso foi obtido em brotações de bananeira 'Grande Naine' submetidas à luz natural, comparadas às observadas em cultivo sob sala de crescimento convencional (Kodym & Zapata-Arias, 1999).

TABELA 3. Número de raízes em diferentes cultivares de bananeira sob a influência do ambiente de cultivo (Natural e Artificial) e concentrações de sacarose (15 e 30 g.L⁻¹), após 45 dias de enraizamento *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Sacarose (g.L ⁻¹)	Ambiente		Média
	Natural	Artificial	
15	8,1 Aa	8,8 Ab	8,4 b
30	8,3 Ba	12,5 Aa	10,4 a
Média	8,2 B	10,6 A	

Cultivar	Ambiente		Média
	Natural	Artificial	
Caipira	10,2 Aa	11,2 Aa	10,7 a
Pacovan	6,2 Bb	10,0 Ab	8,1 b
Média	8,2 B	10,6 A	

Cultivar	Sacarose (g.L ⁻¹)		Média
	15	30	
Caipira	10,2 Aa	11,2 Aa	10,7 a
Pacovan	6,6 Bb	9,5 Ab	8,1 b
Média	8,4 B	10,4 A	
CV (%)	12,43		

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Efeitos benéficos do cultivo *in vitro* em condições de luz natural (estufa) foram também reportados por Talavera et al. (2005), em plantas de *Cocos nucifera* L. De acordo com estes autores, ao final da fase *in vitro*, plantas crescendo em estufa ou sala de crescimento modificada (com luz natural) tiveram maior taxa fotossintética do que aquelas cultivadas em sala de crescimento convencional. Em termos de crescimento, as condições de estufa foram ligeiramente superiores quanto ao acúmulo de massa fresca e seca das plantas, assim como para número de folhas.

Aclimatização

Para a fase de aclimatização das plantas, observou-se interação, entre os três fatores estudados, para o NF'EXP, NR, APA e DP (Tabela 5). Já em relação ao CR e massa seca das plantas (MS'PA, MS'R e MS'T), houve interação significativa somente entre A x S, A x C e C x S (Tabela 6).

Ao final de 30 dias, a sobrevivência das plantas em casa de vegetação foi de 100% quando estas se desenvolveram sob ambiente natural em detrimento da condição artificial na fase de enraizamento *in vitro*, independente da concentração de sacarose e cultivar estudados. Já em plantas provenientes do ambiente artificial, a sobrevivência variou de 72,0% a 100%, com maiores perdas em plantas cultivadas em meio acrescido de 15 g.L⁻¹ de sacarose (Tabela 4).

TABELA 4. Percentual de sobrevivência de cultivares de bananeira sob a influência do ambiente de cultivo (natural e artificial) e concentrações de sacarose (15 e 30 g.L⁻¹), após 30 dias de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Ambiente	Caipira		Média	Pacovan		Média
	15	30		15	30	
Natural	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Artificial	72,0	93,7	82,9	83,3	100,0	91,7
Média	86,0	96,9		91,7	100,0	

Dados obtidos pela razão entre o número de plantas mortas e ou não desenvolvidas e o número total de plantas transferidas para as condições *ex vitro*, não tendo sido analisados estatisticamente.

Resultados semelhantes foram observados por Folliot & Marchal (1992) que, avaliando a influência da sacarose (40, 70, 100 e 130 g.L⁻¹) na fase de enraizamento, não tiveram dificuldades na aclimatização de plantas micropropagadas da cv. Grande Naine, em qualquer concentração avaliada, sendo as maiores médias de sobrevivência obtidas com 40 g.L⁻¹ (85 %). Ainda segundo os mesmos, plantas cultivadas na presença de 130 g.L⁻¹ de sacarose

mostraram amarelecimento das folhas advindas do cultivo *in vitro*, além de redução do crescimento, após 1 mês de aclimatização.

Efeitos negativos da remoção parcial ou total da sacarose exógena do meio de cultivo sobre o posterior desenvolvimento *ex vitro* de plantas de *Cocos nucifera* L., *Arachis retusa* e *Ginseng brasileiro* cultivadas *in vitro* foram observados por Fuentes et al. (2005), Pacheco et al. (2006) e Skrebsky et al. (2004). De acordo com estes autores, a ausência ou a suplementação do meio nutritivo com baixas concentrações de sacarose (entre 6 a 15 g.L⁻¹) ou, ainda com alta concentração (75 g L⁻¹), promovem baixas percentagens de sobrevivência.

Segundo Fuentes et al. (2005), a baixa sobrevivência e o lento desenvolvimento de plantas de *Cocos nucifera* L. cultivadas sob a ausência ou baixo nível de sacarose é resultado da deficiente formação de esqueletos de carbono e de alocação de reservas das folhas formadas *in vitro* para o crescimento *ex vitro*. Já Skrebsky et al. (2004) não observaram diferenças com concentrações de 30, 45 e 60g L⁻¹ de sacarose, obtendo 100% de sobrevivência em plantas de *Ginseng brasileiro*. De modo semelhante, Pacheco et al. (2006) também obtiveram alta taxa de sobrevivência em plantas de *Arachis retusa* cultivadas em meio de MS contendo 1,5% e 3% de sacarose.

Em relação ao ambiente de cultivo, Rocha (2005) afirma que o cultivo *in vitro* de plantas submetidas à gradual intensificação da luminosidade, associado com a diminuição na concentração de sacarose nos meios de cultura, pode promover efeitos positivos na fase de aclimatização. Isso ocorre porque as plantas são induzidas a um metabolismo mais próximo da condição autotrófica, o que contribui para a redução de perdas após a transferência *ex vitro*, conforme observado neste trabalho.

Resultados obtidos por Talavera et al. (2005) também estão de acordo com os efeitos verificados com o uso da luz natural nas cultivares de bananeira

aqui estudadas. Segundo estes autores, após 8 semanas da transferência para condições *ex vitro*, plantas de *Cocos nucifera* cultivadas *in vitro* sob condições de estufa tiveram alto percentual de sobrevivência.

Quanto ao NF'EXP, as melhores respostas para a cultivar Caipira foram notadas em plantas provenientes de ambiente natural com 15 ou 30 g.L⁻¹ de sacarose. Já o ambiente artificial com 30 g.L⁻¹ promoveu os melhores resultados para a 'Pacovan', embora, no geral, não tenham sido verificadas diferenças entre as concentrações de sacarose (Tabela 5).

Possivelmente, a exposição das plantas a condições mais próximas ao ambiente *ex vitro*, na fase antecedente à sua transferência para condições de casa de vegetação, reduziu o estresse ocasionado logo nos primeiros dias após sua remoção dos frascos de cultivo, permitindo, dessa maneira, a rápida adaptação e emissão de novas folhas (transição), mais adaptadas às condições adversas. De acordo com Kodym & Zapata-Arias (1999), laboratórios de cultura de tecidos freqüentemente incrementam a intensidade luminosa durante a fase de enraizamento *in vitro*, no intuito de promover rustificação das plantas, já que, dessa forma, estas encontram condições menos estressantes no momento de sua transferência. Em estudo realizado com a cultivar Grande Naine, Navarro et al. (1994) verificaram que folhas expandidas emitidas durante a fase de enraizamento *in vitro*, em intensidades luminosas de 30 e 240 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, murcharam e se tornaram parcialmente necróticas, durante os primeiros 10-15 dias de aclimatização, ao mesmo tempo que novas folhas se desenvolveram.

Em relação ao NR, a cultivar Caipira não foi significativamente influenciada pelos fatores estudados, diferentemente da 'Pacovan', em que maior número de raízes foi obtido em plantas oriundas do ambiente artificial, com 30 g.L⁻¹ de sacarose (Tabela 5). Efeitos negativos sobre o desenvolvimento de raízes na fase de aclimatização foram verificados por Fuentes et al. (2005), em *Cocos nucifera* L. cultivada em meio desprovido ou contendo baixa

concentração de sacarose. Nesse mesmo sentido, George (1996) afirma ser fundamental a existência de uma fonte de energia e carboidrato para a formação de raízes em plantas micropropagadas, seja o fornecimento feito por meio de suplementação exógena de uma ou várias fontes de açúcar (em sistemas heterotróficos ou mixotróficos) ou pela fotossíntese (em condições autotróficas).

TABELA 5. Número de folhas expandidas (NF'EXP) e de raízes (NR), altura da parte aérea (APA) e diâmetro do pseudocaule (DP) de diferentes cultivares de bananeira sob a influência do ambiente de cultivo (Natural e Artificial) e concentrações de sacarose (15 e 30 g.L⁻¹), após 75 dias de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Ambiente	Caipira		Média	Pacovan		Média
	15	30		15	30	
Número de folhas expandidas						
Natural	4,4 Aa	4,8 Aa	4,6 a	5,1 Aa	4,3 Bb	4,6 a
Artificial	3,8 Ab	3,9 Ab	4,6 a	5,1 Aa	5,4 Aa	4,6 a
Média	4,6 A	4,6 A		4,6 A	4,6 A	
CV (%)						7,18
Número de raízes						
Natural	5,3 Aa	6,0 Aa	5,5 b	5,8 Aa	5,0 Bb	5,5 b
Artificial	5,5 Aa	6,1 Aa	6,0 a	5,9 Aa	6,7 Aa	6,0 a
Média	5,6 A	6,0 A		5,6 A	6,0 A	
CV (%)						11,43
Altura da parte aérea (cm)						
Natural	12,8 Ba	15,0 Aa	13,3 b	13,6 Aa	11,7 Bb	13,3 b
Artificial	12,5 Ba	14,9 Aa	14,1 a	13,5 Ba	15,5 Aa	14,1 a
Média	13,1 B	14,3 A		13,1 B	14,3 A	
CV (%)						8,07
Diâmetro do pseudocaule (cm)						
Natural	0,65 Ba	0,74 Aa	0,68 a	0,73 Aa	0,62 Bb	0,68 a
Artificial	0,61 Bb	0,67 Ab	0,69 a	0,72 Ba	0,76 Aa	0,69 a
Média	0,68 B	0,70 A		0,68 B	0,70 A	
CV (%)						3,24

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Para a APA e DP, na cultivar Caipira, nenhum efeito significativo do ambiente foi observado quanto APA, em ambas as concentrações de sacarose

avaliadas, enquanto que resultados significativos para DP foram verificados em plantas provenientes de luz natural. Já a 'Pacovan' teve influencia significativa do ambiente de cultivo na APA e DP, com melhores resultados em plantas enraizadas em ambiente artificial com 30 g.L⁻¹ de sacarose, embora resultados satisfatórios também tenham sido verificados na concentração de 15 g.L⁻¹, em ambos os ambientes de cultivo (Tabela 5).

Em relação ao CR, resultados significativamente superiores na cultivar Caipira foram observados em plantas submetidas a ambiente natural e cultivadas em 15 ou 30 g.L⁻¹ de sacarose. Para a cultivar Pacovan, as plantas provenientes do meio contendo 15 g.L⁻¹ de sacarose tiveram resposta superior, porém, nenhum efeito significativo do ambiente de cultivo foi observado (Tabela 6).

Quanto a MS'PA, MS'R e MS'T, nenhuma diferença significativa entre os ambientes de cultivo foi verificada em plantas cultivadas com 15 g.L⁻¹ de sacarose, porém, em meio acrescido de 30 g.L⁻¹, o ambiente de luz artificial possibilitou resultados significativamente superiores. Já em relação às cultivares, não houve diferenças significativas entre os ambientes de cultivo para a variável massa seca na 'Caipira', diferentemente do fator sacarose, em que resultados superiores foram obtidos com 30 g.L⁻¹ ($P < 0,05$). Por outro lado, a cultivar Pacovan foi significativamente influenciada pelo ambiente de cultivo, com melhores respostas para MS'PA, MS'R e MS'T, em plantas enraizadas sob ambiente artificial. Para as concentrações de sacarose, diferenças significativas foram observadas apenas para MS'PA (Tabela 6).

TABELA 6. Comprimento de raízes (CR), massa seca da parte aérea (MS'PA), de raízes (MS'R) e total (MS'T) em cultivares de bananeira sob a influência do ambiente de cultivo (natural e artificial) e concentrações de sacarose (15 e 30 g.L⁻¹), após 75 dias de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Sacarose (g.L ⁻¹)	CR (cm)			MS'PA (g)			MS'R (g)			MS'T (g)		
	Ambiente		Média	Ambiente		Média	Ambiente		Média	Ambiente		Média
	Natural	Artificial		Natural	Artificial		Natural	Artificial		Natural	Artificial	
15	17,7 Aa	16,2 Ba	16,9 a	0,33 Aa	0,36 Ab	0,35 a	0,27 Aa	0,24 Ab	0,26 b	0,61 Aa	0,60 Ab	0,60 b
30	15,5 Ab	15,9 Aa	15,7 b	0,31 Ba	0,46 Aa	0,38 a	0,27 Ba	0,33 Aa	0,30 a	0,57 Ba	0,79 Aa	0,68 a
Méd. Amb.	16,6 A	16,0 B		0,32 B	0,41 A		0,27 A	0,29 A		0,59 B	0,69 A	

Cultivar	Ambiente		Média									
	Natural	Artificial		Natural	Artificial		Natural	Artificial		Natural	Artificial	
Caipira	18,2 Aa	16,4 Ba	17,3 a	0,35 Aa	0,32 Ab	0,33 b	0,35 Aa	0,32 Aa	0,33 a	0,70 Aa	0,63 Ab	0,67 a
Pacovan	15,0 Ab	15,6 Ab	15,3 b	0,29 Bb	0,50 Aa	0,39 a	0,20 Bb	0,25 Ab	0,23 b	0,48 Bb	0,75 Aa	0,62 a
Média	16,6 A	16,0 B		0,32 B	0,41 A		0,27 A	0,29 A		0,59 B	0,69 A	

Cultivar	Sacarose (g.L ⁻¹)		Média	Sacarose (g.L ⁻¹)		Média.	Sacarose (g.L ⁻¹)		Média	Sacarose (g.L ⁻¹)		Média
	15	30		15	30		15	30		15	30	
	Caipira	17,3 Aa		17,4 Aa	17,3 a		0,27 Bb	0,40 Aa		0,33 b	0,27 Ba	
Pacovan	16,6 Aa	14,0 Bb	15,3 b	0,43 Aa	0,36 Ba	0,39 a	0,24 Aa	0,21 Ab	0,23 b	0,67 Aa	0,57 Ab	0,62 a
Média	16,9 A	15,7 B		0,35 A	0,38 A		0,26 B	0,30 A		0,60 B	0,68 A	
CV (%)	6,64			20,47			24,18					

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram reportados por Talavera et al. (2005), trabalhando com *Cocos nucifera*, em que plantas cultivadas *in vitro* tanto em condições de luz artificial quanto natural, apresentaram, ao final de 8 semanas de aclimatização, massa fresca e seca semelhantes. Em se tratando da suplementação exógena de sacarose, Couceiro et al. (2001) verificaram haver um decréscimo da massa seca de plantas de bananeira ‘Maçã’ (AAB) com o aumento da concentração de sacarose no meio de enraizamento *in vitro*, após 60 dias de aclimatização. Assim, estes autores concluíram ser a concentração de 20 g.L⁻¹ a que promove as melhores respostas para as características massa fresca e seca, o que foi atribuído ao fato de que a adição de elevadas concentrações de sacarose no meio de cultura promovam menor teor de clorofila nas folhas, resultando em menor capacidade fotossintética (Folliot & Marchal, 1992).

4 CONCLUSÕES

1. Com exceção da altura da parte aérea, o cultivo *in vitro* das brotações sob ambiente de luz natural e meio contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose proporciona as melhores respostas para a cultivar Caipira e sua subsequente aclimatização.
2. Para a cultivar Pacovan, o cultivo sob luz artificial sob 30 g.L⁻¹ de sacarose possibilita melhores resultados, embora a luz natural possa ser satisfatoriamente utilizada.
3. O enraizamento *in vitro* em ambiente de luz natural promove maior rusticificação das plantas micropropagadas de bananeira das cultivares Caipira e Pacovan, com 100% de sobrevivência *ex vitro*.
4. A luz natural, como alternativa às lâmpadas fluorescentes, pode ser utilizada para a produção de mudas de bananeira, contribuindo para a redução dos custos e das perdas na aclimatização.

5 AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
pelo apoio financeiro e concessão das bolsas de estudos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORGES, A. L.; SILVA, S. de O. e; CALDAS, R. C.; LEDO, C. A. da S. Teores foliares de nutrientes em genótipos de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 314-318, ago. 2006.
- CALVETE, E. O. **Concentração de sacarose *in vitro* e seleção de substratos para aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv campinas (*Fragaria ananassa* Duch.)**. 1998. 108 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 186-191, jun. 2002.
- COUCEIRO, M. A.; SIQUEIRA, D. L. de; PEREIRA, W. E.; NEVES, L. L. de M. Crescimento de explantes *in vitro* e de mudas de bananeira cv. ‘Maçã’ submetidas a doses de sacarose nas fases de enraizamento e aclimação. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, n. 280, p. 615-627, nov./dez. 2001.
- DONATO, S. L. R.; SILVA, S. de O. e; FILHO, O. A. L.; LIMA, M. B.; DOMINGUES, H.; ALVES, J. da S. Comportamento de variedades e híbridos de bananeira (*Musa spp.*) em dois ciclos de produção no Sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 139-144, abr. 2006.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4. 3**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.
- FOLLIOT, M.; MARCHAL, J. Croissance *in vitro* des bananiers: influence de la concentration en saccharose du milieu de culture sur le développement des plants du cultivar Petite naine. **Fruits**, Paris, v. 47, n. 6, p. 565-571, Nov./Dec. 1992.
- FUENTES, G.; TALAVERA, C.; OROPEZA, C.; DESJARDINS, Y.; SANTAMARÍA, J. M. Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 41, n. 1, p. 69-76, Jan./Feb. 2005.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361 p. Part 2: In Practice.

GROUT, B.; MILLAM, S. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. **Annals of Botany**, London, v. 55, n. 1, p. 129-131, Jan. 1985.

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

JORGE, M. A. B.; ROBERTSON, A. I.; MASHINGAIDZE, A. B.; KEOGH, E. How *in vitro* light affects growth and survival of *ex vitro* cassava. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 137, n. 3, p. 311-319, Dec. 2000.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 67-71, 2001.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 141-145, 1999.

KÖPPEN, W. **Climatología**: con un estudio de los climas de la tierra. Mexico: Fondo de Cultura Economica, 1948. 478 p.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; BYOUNG, R. J. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 49-56, 1997.

MARCHAL, J.; SENS, I.; TEISSON, C. Influence des sucres et de facteurs bioclimatiques sur la culture *in vitro* du bananier. **Fruits**, Paris, v. 47, n. 1, Jan./Feb. 1992.

LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento "in vitro" do porta-enxerto de pereira OH x F97. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 353-357, abr./jun, 2000.

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

NAVARRO, C.; TEISSON, C.; CÔTE, F.; GANRY, J. Effects of light intensity and CO₂ concentration on growth of banana plants (*Musa* AAA, cultivar 'Petite Naine') *in vitro* and subsequent growth following acclimatization. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 60, n. 1/2, p. 41-54, Dec. 1994.

PACHECO, G.; GAGLIARDI, R. F.; COGLIATTI, M. B.; MANHÃES, H. B.; CARNEIRO, L. A.; VALLS, J. F. M.; MANSUR, E. Influence of substrates and *in vitro* preconditioning treatments on *ex vitro* acclimatization of *Arachis retusa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 165-169, jan. 2006.

ROBINSON, J. C. **Bananas and plantains**. Wallingford: CAB International, 2003. v. 5, 238 p.

ROCHA, H. S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira "Prata Anã": alterações morfoanatômicas**. 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ROELS, S.; ESCALONA, M.; CEJAS, I.; NOCEDA, C.; RODRIGUEZ, R.; CANAL, M. J.; SANDOVAL, J.; DEBERGH, P. 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.

SENDIN, A. P. P. M. **Micropropagação de bananeira dos cultivares Maçã e Grande Naine visando a produção de mudas de baixo custo**. 2001. 72 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SILVA, S. de O. e; GASPAROTTO, L.; MATOS, A. P. de; CORDEIRO, Z. J. M.; FERREIRA, C. F.; RAMOS, M. M.; JESUS, O. N. de. **Programa de melhoramento de bananeira no Brasil – resultados recentes**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 36 p. (Documentos, 123).

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T; FERRÃO, G. da E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1471-1477, set./out. 2004.

SOUZA, A. S.; DANTAS, J. L. L.; SOUZA, F. V. D.; CORDEIRO, Z. J. M.; SILVA NETO, S. P. **A cultura da banana**: aspectos técnicos socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: EMBRAPA SPI; Cruz das Almas: EMBRAPA CNPMF, 1997. 585 p.

STANDAERT-DE-METSANAERE, R. E. A. Economic considerations. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 131-140.

TALAVERA, C.; CONTRERAS, F.; ESPADAS, F.; FUENTES, G.; SANTAMARÍA, J. M. Cultivating *in vitro* coconut palms (*Cocos nucifera*) under glasshouse conditions with natural light, improves *in vitro* photosynthesis nursery survival and growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 83, n. 3, p. 287-292, Dec. 2005.

THINGUYEN, Q.; KOZAI, T. Growth of *in vitro* banana (*Musa* spp.) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **In vitro Cellular Development Biology – Plant**, Wallingford, v. 37, n. 6, p. 824-829, Nov./Dec. 2001.

WEBER, O. B.; MONTENEGRO, A. A. T.; SILVA, I. M. N. e; SOARES, I.; CRISÓSTOMO, L. A. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 154-157, abr. 2006.

VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 62, n. 4, p. 323-328, Oct. 1985.

YUÉ, D.; GOSSELIN, A.; DESJARDINS, Y. Re-examination of the photosynthetic capacity of *in vitro*-cultured strawberry plantlets. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 118, n. 3, p. 419-424, May 1993.

ARTIGO 3

**CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS DE
PLANTAS MICROPROPAGADAS DE BANANEIRA,
INFLUENCIADAS POR ALTERAÇÕES NO AMBIENTE DE
CULTIVO**

(Preparado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Botânica)

**Frederico Henrique da Silva Costa; Jonny Everson Scherwinski Pereira;
Moacir Pasqual; Evaristo Mauro de Castro**

RESUMO

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE BANANEIRA, INFLUENCIADAS POR ALTERAÇÕES NO AMBIENTE DE CULTIVO

A micropropagação sob ambiente heterotrófico, atualmente o principal método de propagação e de certificação genética e fitossanitária de mudas de bananeira, tem sido extensivamente reportada, por induzir a desordens anatômicas e fisiológicas nas plantas cultivadas. Desse modo, a realização de pesquisas que melhor contribuam para a qualidade das plantas micropropagadas e permita maior compreensão dos fatores inerentes ao ambiente de cultivo *in vitro* é necessária. Objetivou-se estudar o comportamento fisiológico, anatômico e a sobrevivência *ex vitro* de plantas micropropagadas de bananeira sob os efeitos de alterações no ambiente de cultivo. Para o enraizamento *in vitro*, brotações axilares, da cultivar Caipira, provenientes da fase de multiplicação, foram cultivadas em meio MS, adicionado de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 1 mg.L⁻¹ de ANA e 6 g.L⁻¹ de ágar (Merse®). Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2x2, com duas concentrações de sacarose (15 e 30 g.L⁻¹) e dois ambientes de cultivo (natural, em casa de vegetação e artificial, em sala de crescimento). Ao final de 45 dias, as plantas foram avaliadas quanto à sobrevivência *ex vitro* e submetidas às análises quanto aos teores de clorofila a, b e total, conteúdo relativo de água nos tecidos e estudos anatômicos. Observou-se que o enraizamento *in vitro* em ambiente de luz natural promove rustificação nas plantas micropropagadas de bananeira, cv. Caipira, com 100% de sobrevivência e que melhorias nas características fisiológicas e anatômicas avaliadas são obtidas, embora maior degradação do pigmento de clorofila a e total seja obtida nesta condição.

Palavras-chave: *Musa* spp., carboidrato, luz natural, enraizamento *in vitro*, clorofila, morfologia.

ABSTRACT

PHYSIOLOGIC AND ANATOMICAL CHARACTERISTICS OF BANANA MICROPROPAGATED PLANTS INFLUENCED BY ALTERATIONS IN THE ATMOSPHERE OF CULTIVATION

The micropropagation under heterotrophic conditions, actually the main methodology of banana plants certification, has been extensively reported for inducing anatomical and physiologic disorders in these plants. In this way, the accomplishment of researches that contributes to the quality of the micropropagated plants, allow adequate understanding of inherent factors involving in the atmosphere of cultivation *in vitro* is necessary. This work objectified to study the physiologic and anatomical behavior and the survival of banana plants micropropagated under effects of alterations in the atmosphere of cultivation. For *in vitro* rooting, axillary shoots of Caipira cultivar from the multiplication phase, were cultivated in MS medium, added with 30 g.L⁻¹ sucrose, 1 mg.L⁻¹ NAA and 6 g.L⁻¹ agar (Merse®). The treatments were disposed in a 2x2 factorial model, with two sucrose concentrations (15 and 30 g.L⁻¹) and two atmospheres of cultivation (natural, at greenhouse and artificial, in growth room). After 45 days, it were evaluated the ex vitro plant survival being the plants submitted to analyses of *a*, *b* and *total* chlorophyll, relative water content in the tissues, besides anatomical studies. It was observed that the *in vitro* rooting in atmosphere of natural light promotes rusticity of the micropropagated banana plants of Caipira cultivar, with 100% of survival and that improvements in the physiologic and anatomical characteristics are obtained, although degradation of *a* and *total* chlorophyll pigment is observed in this condition.

Keywords: *Musa* spp., carbohydrate, natural light, rooting *in vitro*, chlorophyll, morphology.

1 INTRODUÇÃO

A obtenção clonal massal de plantas utilizando técnicas de cultura de tecidos, também conhecida como micropropagação, é um método de propagação vegetativa amplamente difundido e estudado, com aplicações práticas e comerciais comprovadas (Altman & Loberant, 1998; Erig & Schuch, 2005). Em bananeira, o emprego desta ferramenta tem possibilitado a rápida difusão e validação de genótipos recentemente lançados pelos programas de melhoramento genético. Isso porque a maioria das cultivares de bananas e plátanos amplamente cultivadas se caracterizam por serem triplóides e parcialmente ou completamente estéreis (Crouch et al., 1998) e pelo fato de a obtenção de mudas por meio do desenvolvimento de gemas vegetativas em condições de campo possibilitar, apenas, entre 3 a 10 perfilhos por matriz/ano (Vuylsteke & De Langhe, 1985).

No entanto, apesar da importância das técnicas *in vitro* na produção de mudas com certificação genética e fitossanitária, existem dificuldades e pouco entendimento em se obter elevadas taxas de sobrevivência em algumas espécies durante a fase de aclimatização, o que tem sido intrinsecamente associado à capacidade das plantas em superar as amplas variações ambientais após a transferência *ex vitro*. Entre os principais fatores comumente reportados como responsáveis pelos elevados índices de mortalidade estão a excessiva transpiração dos órgãos aéreos (Gangopadhyay et al., 2002), principalmente as folhas, em razão da deficiente funcionalidade estomática (Capellades et al., 1990; Santamaria & Kerstiens, 1994) e a inadequada absorção de água pelas raízes (Romano & Martins-Loução, 2003).

Algumas estratégias já foram estudadas e adotadas, entre as quais estão as reduções nos níveis exógenos de carboidratos e da umidade relativa no

interior dos frascos (Mohammed & Vidaver, 1990), variações nos níveis de irradiância (Deccetti 2004; Navarro et al., 1994, Thinguyen & Kozai, 2001), uso da luz natural (Kodym & Zapata-Arias, 1999, Rocha, 2005; Talavera et al., 2005), enriquecimento com CO₂ (Navarro et al., 1994; Shim et al., 2003; Thinguyen & Kozai, 2001) e aumento das trocas gasosas nos recipientes de cultivo (Braga, 2006; Deccetti, 2004). Destes, a luz é considerada um dos mais importantes, por influenciar decisivamente no desenvolvimento vegetal pela fotoestimulação da biossíntese de diversos compostos necessários ao crescimento vegetal (Larcher, 2000), além de poder induzir alterações, em sua maioria benéficas, na anatomia foliar, contribuindo para a melhor adaptação das plantas ao ambiente externo (Whatley & Whatley, 1982). De acordo com Smith et al. (1997) e Lee et al. (2000), as alterações na estrutura foliar podem afetar as plantas de três maneiras: i) pela densidade estomática, forma e espessura do mesofilo foliar, afetando também a resistência a trocas gasosas e a assimilação fotossintética; ii) pelo conteúdo e distribuição dos pigmentos, influenciando a eficiência da captação da luz pelas folhas e, conseqüentemente, a fotossíntese e iii) a resistência foliar, reduzindo a susceptibilidade das plantas a danos bióticos e ou abióticos.

Sendo assim, embora diversos trabalhos já tenham sido conduzidos na tentativa de elucidar os mecanismos que determinam a sobrevivência das plantas cultivadas *in vitro* na aclimatização, são relativamente poucas as espécies estudadas, havendo, portanto, a necessidade de pesquisas a respeito desse processo, assim como de alternativas que promovam melhor qualidade e redução das perdas em plantas micropropagadas (Deccetti, 2004).

Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar diferenças fisiológicas e anatômicas de plantas micropropagadas de bananeira em diferentes condições de cultivo durante a fase de enraizamento *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Anexos do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, região Sul do estado de Minas Gerais, a 918 m de altitude, latitude 21°14'S e longitude 45°00'GRW. Segundo a classificação climática de Köppen (1948), o clima regional é do tipo Cwa com características Cwb, apresentando duas estações definidas: seca, com temperaturas mais baixas de abril a setembro, e chuvosa, com temperaturas mais elevadas, de outubro a março. Os experimentos foram conduzidos entre os meses de março e julho de 2006.

Material vegetal

Consistiu de brotações axilares de bananeira, com 2 a 3 cm de altura e 1 a 2 folhas expandidas, provenientes do estabelecimento e multiplicação *in vitro* de ápices caulinares de plantas matrizes da cultivar Caipira (AAA). Para a obtenção dos explantes, utilizou-se o meio básico de MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 5 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), sendo os subcultivos realizados a cada 35 dias e mantidos em sala de crescimento, sob temperatura de 25 ± 2°C, irradiância de 42 W.m⁻² e fotoperíodo de 16 horas.

Enraizamento *in vitro* e descrição dos tratamentos

Na fase de enraizamento, o meio empregado teve a mesma constituição básica acima referida, sendo desprovido de BAP, porém, suplementado com 1 mg.L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético). Ambos os meios utilizados para a obtenção e o enraizamento das brotações foram solidificados com 6.g.L⁻¹ de ágar (Merse®) e tiveram o pH ajustado para 5,8±0,1, antes da adição do agente

geleificante, sendo, em seguida, autoclavados por 20 minutos, a 120°C e 1 atm. Para as culturas, utilizaram-se frascos de 250 mL contendo 40 mL de meio e quatro brotações por parcela, sendo os recipientes selados com parafilme transparente.

Os tratamentos foram constituídos de concentrações de sacarose (15 e 30 g.L⁻¹) e dois ambientes de cultivo (casa de vegetação, ambiente natural e sala de crescimento, ambiente artificial).

Caracterização do ambiente de cultivo

Ambiente artificial: sala de crescimento com iluminação artificial, fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares do tipo luz do dia especial (Osram 20 W), com irradiância média de 42 W.m⁻², fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C.

Ambiente natural: casa de vegetação coberta por filme de polietileno transparente com tratamento contra raios ultravioletas (150 microns) e sombreamento de 70% (Sombrence®), apresentando os seguintes parâmetros ambientais: temperaturas máximas, mínimas e médias de 26°C/32°C, 16°C /16°C e 20°C/23°C e níveis de irradiância, máximos, mínimos e médios, de 93,95 W.m⁻²/199,69 W.m⁻², 11,13 W.m⁻²/10,66 W.m⁻² e 49,38 W.m⁻²/99,43W.m⁻², referentes a dias nublados e claros típicos do período de experimentação.

Dados referentes à radiação solar diurna, incidente na altura dos frascos na sala de crescimento e casa de vegetação, foram obtidos por sensores de radiação (LI-200SA, Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Li-cor.Neb), a cada meia hora, durante 11 horas (das 7:00 às 18:00 horas). Para o ambiente de sala de crescimento, foi feita apenas uma medida da radiação, durante 6 horas, visto se tratar de ambiente controlado. Para a coleta de dados referentes às temperaturas mínimas, médias e máximas semanais, empregou-se um termo-higrógrafo.

Fase de aclimatização

Inicialmente, as plantas foram removidas dos frascos de cultivo e tiveram suas raízes lavadas em água corrente, sendo, em seguida, transferidas para tubetes de 0,3 L, mantidas em casa de vegetação e sistema de nebulização intermitente. O substrato utilizado foi composto pela mistura de terra de subsuperfície (abaixo de 40 cm):Plantmax Hortaliças HT[®]:casca de arroz carbonizada (1:1:1 v/v), acrescido de 50.g L⁻¹ de húmus e 20 g.L⁻¹ de super simples. Decorridos 30 dias da transferência, a sobrevivência das plantas foi avaliada.

Concentração de clorofila

Para a determinação dos teores de clorofila, foram tomadas, ao acaso, cinco plantas por tratamento, sendo as amostras (cada uma de 50 mg) coletadas da primeira folha completamente expandida (região mediana do limbo foliar). A quantificação dos teores de clorofilas a, b e total seguiu metodologia descrita por Arnon (1949), após a obtenção dos dados de absorvância, com base nas leituras em espectrofotômetro a 663 e 645 nm, respectivamente, para clorofilas a e b. Para os cálculos de mg de clorofila por grama de matéria fresca do tecido foliar (mg.g⁻¹ de massa fresca), foram utilizadas as seguintes equações: Clorofila a = $(12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}) \times V/1000W$; Clorofila b = $(22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}) \times V/1000W$; Clorofila total = $(20,2 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}) \times V/1000W$ (Castro et al., 2005). Sendo A=absorvância dos extratos no comprimento de onda determinado; V= volume final do extrato clorofila-acetona e W= matéria fresca, em gramas, do material vegetal utilizado.

Conteúdo relativo de água (RCW)

Ao término do enraizamento, plantas obtidas nos diferentes tratamentos foram retiradas dos respectivos recipientes e submetidas, em condições de

laboratório, à umidade relativa de aproximadamente 63%. Em intervalos de 10 minutos, durante 240 minutos, seis plantas de cada tratamento foram pesadas para determinação do conteúdo relativo de água dos tecidos. Posteriormente, a massa seca das plantas também foi determinada por secagem em estufa, a 50°C, até obtenção de peso constante. O conteúdo relativo de água (RCW) para cada tempo foi estimado pela seguinte equação: $RCW (\%) = [(FW_t - DW) / (FW_s - DW)] \times 100$, sendo FW_t a massa fresca ao tempo t, FW_s a massa fresca inicial (tempo 0) e DW a massa seca (Romano & Martins-Loução, 2003).

Características anatômicas

As avaliações anatômicas foram realizados no Laboratório de Anatomia do Departamento de Biologia da UFLA. Para tanto, utilizaram-se cinco folhas (segunda folha expandida, direção ápice-base) coletadas de cinco plantas de cada tratamento, as quais foram previamente fixadas em FAA 70 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico) (Johansen, 1940), por 72 horas e, posteriormente conservadas em álcool etílico 70%, até a realização dos cortes. As avaliações foram feitas com base em observações de microscopia de luz de seções transversais e paradérmicas foliares obtidas em micrótomo de mesa manual e à mão livre, com auxílio de lâmina de aço inox (Gillette®).

A clarificação das seções transversais foi realizada em solução de hipoclorito de sódio a 50% e, em seguida, elas foram submetidas à lavagem em água destilada e coradas com azul de astra-safranina, seguindo metodologia descrita por Kraus & Arduin (1997), com modificações. Posteriormente, as seções foram montadas em glicerina a 50%. Com auxílio de microscópio Ken-a-vision 2100, equipado com uma ocular micrométrica e objetiva de 40X, foram efetuadas medições das espessuras das epidermes das faces adaxial e abaxial, dos parênquimas paliçádico e esponjoso e das hipodermes inferior e superior,

sendo efetuadas duas medições em cada folha, na região do feixe lateral (após o terceiro feixe), totalizando 10 repetições para cada tratamento.

Os cortes paradérmicos foram realizados no terço médio foliar, em ambas as faces das folhas. A clarificação e a montagem das lâminas foram igualmente efetuadas como descrito para as seções transversais, exceto a coloração, que foi com safranina 1%. Posteriormente, a densidade estomática (n° de estômatos por mm^2) foi avaliada, utilizando-se, para isso, microscópio Olympus CBB (objetiva de 40X), com o auxílio de uma câmara clara, segundo metodologia descrita por Labouriau et al. (1961). As avaliações ocorreram em quatro campos da região mediana de seis folhas provenientes de seis plantas distintas, perfazendo um total de 24 campos por tratamento.

Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado nos experimentos referentes aos teores de clorofila e análises anatômicas foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2x2, sendo duas concentrações de sacarose (15 e 30 g.L^{-1}) e dois ambientes de cultivo (natural e artificial), totalizando 4 tratamentos. Para as medições dos tecidos e diâmetro dos estômatos, foram utilizadas 10 repetições. Já na contagem dos estômatos, 12 repetições foram empregadas, sendo cada uma representada pela média de duas observações. Quanto ao ensaio envolvendo o conteúdo relativo de água, este foi instalado em parcelas subdivididas no tempo, em DIC, com seis repetições por tratamento.

Os dados obtidos foram, inicialmente, submetidos às análises de variâncias individuais (correspondente a cada ambiente de cultivo), realizando-se em seguida o teste de homogeneidade de variâncias e a análise conjunta dos ambientes. Para isso, o programa estatístico Sisvar 4.3 (Ferreira, 2000) foi utilizado, sendo as médias comparadas pelo Teste F, a 5% de probabilidade. Dados referentes à sobrevivência das plantas foram obtidos por simples

observação visual e expressos pela razão entre o número de plantas desenvolvidas e o número total de plantas transferidas para as condições *ex vitro*, não tendo sido analisados estatisticamente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sobrevivência *ex vitro*

Ao final de 30 dias em casa de vegetação, foi observado 100% de sobrevivência das plantas provenientes do ambiente natural, independente das concentrações de sacarose estudadas. Por outro lado, foram verificadas perdas em plantas cultivadas em ambiente de luz artificial, com 86,0% e 96,9% de sobrevivência para 15 e 30 g.L⁻¹ de carboidrato, respectivamente (Tabela 1). Possivelmente, a exposição das brotações a maiores amplitudes de irradiância e temperatura promoveu rustificação das plantas obtidas, visto que as condições de casa de vegetação são mais parecidas àquelas nas quais as plantas foram aclimatizadas, favorecendo, assim, menor transpiração e desenvolvimento dos tecidos fotossintetizantes.

TABELA 1. Percentual de sobrevivência de plantas micropropagadas de bananeira sob a influência do ambiente de cultivo (natural e artificial) e concentrações de sacarose (15 e 30 g.L⁻¹), após 30 dias de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Ambiente	Sacarose (g.L ⁻¹)		Média
	15	30	
Natural	100,0	100,0	100,0
Artificial	72,0	93,7	82,9
Média	86,0	96,9	

Dados obtidos pela razão entre o número de plantas mortas e ou não desenvolvidas e o número total de plantas transferidas para as condições *ex vitro*, não tendo sido analisados estatisticamente.

Resultados semelhantes foram relatados por Talavera et al. (2005), segundo os quais plantas de *Cocos nucifera* cultivadas *in vitro*, sob condições de estufa, demonstraram alto percentual de sobrevivência. Já em relação à sacarose, estes autores verificaram baixa sobrevivência e lento desenvolvimento de plantas

cultivadas sob a ausência ou baixo nível deste carboidrato, o que foi atribuído à reduzida ou a falta de formação de esqueletos de carbono e alocação de reservas suficientes nas folhas formadas *in vitro* para o crescimento *ex vitro*. Por outro lado, sucesso na aclimatização de plantas micropropagadas de bananeira foi obtido por Folliot & Marchal (1992), utilizando 40, 70, 100 e 130 g.L⁻¹ de sacarose, na fase de enraizamento, para cv. Grande Naine.

Teores de clorofilas

Interação entre os fatores estudados (ambientes e sacarose) foi observada apenas quanto aos teores de clorofila *a* e *total*. Já em relação à clorofila *b* e à razão *a/b*, nenhuma influência significativa foi verificada (Tabelas 2 e 3).

Para clorofila *a* e *total*, efeito significativo do ambiente de cultivo em relação às concentrações de sacarose foi verificado apenas em meio contendo 30 g.L⁻¹, com resultados superiores em plantas enraizadas em ambiente de luz artificial, com teores de 1,24 e 1,67 mg.g⁻¹ de massa fresca, respectivamente. Contudo, nenhuma diferença significativa entre as concentrações de sacarose foi observada, em ambos os ambientes estudados (Tabela 2). Estes resultados podem ser atribuídos ao fato de as plantas mantidas em sala de crescimento estarem expostas a uma menor irradiância do que a do ambiente de casa de vegetação, reduzindo a ocorrência de processos fotooxidativos nas plantas. Segundo Taiz & Zeiger (2004), a fotooxidação é um processo irreversível e envolve diretamente os pigmentos que, ao absorverem luz, ficam muito tempo excitados e interagem com o O₂, produzindo radicais livres, como superóxido (O₂⁻), podendo destruir estes pigmentos.

Nesse sentido, os processos de síntese e degradação (foto-oxidação) de clorofilas estão diretamente associados à intensidade luminosa, havendo, sob radiações intensas, pronunciada ocorrência do processo degradativo, enquanto, sob condições de sombreamento, as concentrações foliares de clorofilas tendem

a aumentar (Alvarenga et al., 1998, Atroch et al., 2001; Brand, 1997). De acordo com Amâncio et al. (1999) e Almeida et al. (2005), o maior teor de clorofila total nas folhas de plantas submetidas à baixa irradiância é uma resposta observada com frequência, uma vez que, nesta condição, a planta disponibiliza mais assimilados no complexo proteína-clorofila do aparelho fotossintético para otimizar a captação de luz. Além disso, a redução no teor de clorofilas (por unidade de massa e ou por unidade de área) em níveis mais elevados de irradiância é amplamente relatada na literatura (Alvarenga et al., 2003; Atroch et al., 2001; Deccetti, 2004; Kitajima & Hogan, 2003; Lee et al., 2000; Lima Junior et al., 2005).

TABELA 2. Teor de clorofila *a* e clorofila *total* (mg.g⁻¹ de massa fresca), em plantas micropropagadas de banana cv. Caipira (AAA), em função do ambiente de cultivo (natural e artificial) e concentração de sacarose (15 e 30 g L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Sacarose (g L ⁻¹)	Clorofila <i>a</i>		Média	Clorofila <i>total</i>		Média
	Natural	Artificial		Natural	Artificial	
15	1,05 Aa	1,12 Aa	1,08 a	1,42 Aa	1,50 Aa	1,46 a
30	0,96 Ba	1,24 Aa	1,10 a	1,34 Ba	1,67 Aa	1,50 a
Média	1,01 B	1,18 A		1,38 B	1,59 A	
CV(%)	8,48			8,54		

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na coluna e maiúscula na linha, diferem entre si, pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

Acrescenta-se, ainda, que embora várias pesquisas reportem teores de clorofilas, por unidade de massa fresca, mais elevados em folhas sombreadas do que aquelas expostas a maiores intensidades de luz (Lei & Lechowicz, 1998; Sarracino et al., 1992), questiona-se o fato de alguns autores não levarem em consideração diferenças entre as proporções de clorofilas.

Quanto ao teor de clorofila *b* e razão *a/b*, nenhum efeito significativo dos fatores, isolado ou em associação, foi verificado (Tabela 3). Em se tratando dos teores de clorofila *b*, Almeida et al. (2005) afirmam que, de maneira geral, este pigmento possui maior proporção relativa em ambiente sombreado, o que está associado ao fato de sua degradação ser mais lenta que a clorofila *a* (Engel & Poggiani, 1991). Em seu estudo com *Annona glabra* L. sob condições de enraizamento *in vitro*, Deccetti (2004) não verificou efeitos entre os níveis de irradiância (50, 150 e 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) sobre os teores de clorofilas, embora uma tendência de redução no teor de clorofila *total* tenha sido observada sob alta irradiância (300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Ainda segundo mesma autora, a clorofila *a* e *b* foi menos afetada pelo aumento no nível de irradiância.

TABELA 3. Teor de clorofila *b* e razão clorofila *a/b* (mg.g^{-1} de massa fresca), em plantas micropropagadas de banana cv. Caipira (AAA), em função do ambiente de cultivo (natural e artificial) e concentração de sacarose (15 e 30 g L^{-1}). UFLA, Lavras, MG, 2007.

	Ambiente		Sacarose (g.L^{-1})	
	Natural	Artificial	15	30
Clorofila <i>b</i>				
	0,37	0,41	0,38	0,40
CV(%)	11,38			
Razão <i>a/b</i>				
	2,71	2,88	2,86	2,74
CV(%)	8,68			

Resultados discordantes foram observados por Lee et al. (2000) que, estudando os efeitos da quantidade e qualidade da luz sobre plantas de duas espécies florestais nativas do Sudeste da Ásia, verificaram redução nas concentrações de clorofila e nas taxas de clorofila *a/b*, pela exposição à alta PFD (densidade de fluxo de fótons), em ambas as espécies estudadas.

De acordo com Critchley (1999), a relação clorofila *a/b* está relacionada diretamente com a capacidade das plantas em maximizar a captura de luz em

condições de maior sombreamento, assim como também por haver maior teor de clorofila *b* em detrimento da clorofila *a* (Engel & Poggiani, 1991). Assim, o aumento da quantidade de clorofila *b* em relação à clorofila *a* estaria relacionada a uma maior proporção do fotossistema II, que é mais rico em clorofila *b* que *a*, em relação ao fotossistema I (Critchley, 1999, Nakazono et al., 2001), o que favorece a capacidade adaptativa das plantas a ambientes com pouca radiação.

Características anatômicas

Para a maioria das características avaliadas os fatores influenciaram de forma isolada (Tabela 4), enquanto que interação significativa entre ambiente x sacarose foi observada somente para hipoderme da face adaxial (HIP/AD) e densidade estomática da face abaxial (DE/AB) (Tabela 5).

Em relação à concentração de sacarose, diferenças somente foram observadas para a espessura da epiderme da face adaxial (EP/AD) e do limbo foliar (LIMBO), com resultados significativamente superiores em plantas enraizadas em meio suplementado com 15 g.L⁻¹. Entre os ambientes de cultivo, foi verificado espessamento de ambos os parênquimas, paliçádico e esponjoso, em plantas mantidas sob ambiente de luz natural, o qual foi significativamente superior ao ambiente artificial, diferentemente do observado para EP/AD, HIP/AB e EP/AB, em que plantas enraizadas em ambiente artificial tiveram espessamento significativamente superior (Tabela 4).

TABELA 4. Espessura da epiderme da face adaxial (EP/AD), dos parênquimas paliçádico e esponjoso (P.PAL e P.ESP), da hipoderme e epiderme da face abaxial (HIP/AB e EP/AB), densidade estomática da face adaxial (DE/AD) e espessura total do limbo foliar (LIMBO), em plantas micropropagadas de banana cv. Caipira (AAA), em função do ambiente de cultivo (natural e artificial) e concentração de sacarose (15 e 30 g L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2007.

	EP/ AD	P.PAL	P.ESP	HIP/ AB	EP/ AB	DE/ AD	LIMBO
Sac. (g.L⁻¹)							
15	20,5 a	58,1 a	76,7 a	47,7 a	13,7 a	32,2 a	278,6 a
30	16,7 b	60,4 a	72,6 a	49,1 a	13,3 a	34,6 a	266,5 b
Ambiente							
Nat	17,8 b	67,3 a	82,4 a	46,6 b	11,9 b	35,6 a	272,7 a
Art	19,4 a	51,1 b	67,0 b	50,2 a	15,1 a	31,3 a	272,4 a
CV (%)	12,47	13,11	15,50	11,24	17,73	27,40	6,45

Médias seguidas por letras distintas na vertical, dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Estudando a anatomia foliar de plantas de bananeira, cultivadas *in vitro* e *ex vitro*, Sandoval et al. (1994) não observaram diferenciação do mesofilo em parênquima paliçádico e esponjoso, nas plantas mantidas em sala de crescimento sob iluminação artificial de 80 mmol.m⁻².s⁻¹ e 27 °C. De acordo com Alquini et al. (2006), os parênquimas, paliçádico e esponjoso, são parênquimas clorofilianos que possuem como característica principal 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.

Quanto à espessura do limbo foliar, resultado discordante foi reportado por Deccetti (2004) e Lima Junior et al. (2005), segundo os quais maior espessura ocorreu em plantas jovens de *Cupania vernalis* e vitroplantas de *Annona glabra* cultivadas sob sol pleno e sob 300 µmol.m⁻².s⁻¹. No entanto, o

maior espessamento do limbo observado por Lima Junior et al. (2005) foi, em grande, parte favorecido por uma maior espessura do parênquima paliçádico e das epidermes das faces abaxial e adaxial, já que nenhuma diferença significativa foi observada para a espessura do parênquima esponjoso. Ainda segundo estes autores, as condições de maior sombreamento (70%) favoreceram a presença de maiores espaços intercelulares no mesofilo em detrimento do cultivo a pleno sol.

Efeito positivo da elevação no nível de radiação sobre o espessamento do mesofilo e a contribuição significativa do parênquima paliçádico neste espessamento foram também observados por Hanba et al. (2002), em espécies de *Acer*. Já estudo realizado por Deccetti (2004) mostrou que plantas de *Annona glabra* enraizadas *in vitro* sob $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ tiveram aumentos significativos de espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso. Ainda de acordo com este autor, a diferenciação pronunciada dos parênquimas pode ser determinante na otimização do processo de fotossíntese e potencialmente benéfico na sobrevivência *ex vitro*.

Para a HIP/AD, maior espessamento ($P < 0,05$) foi verificado em plantas submetidas ao ambiente de luz artificial, em ambas as concentrações de sacarose estudadas (Tabela 5). Corroboram assim, os resultados reportados por Rocha (2005), segundo o qual maior espessura das hipodermes abaxial e adaxial em plantas micropropagadas de bananeira ‘Prata-Anã’ foi obtida sob condições de luz artificial.

Em relação aos estômatos, estes são do tipo tetracítico e estão presentes em ambas as faces da epiderme, adaxial e abaxial, com maior frequência, porém, na face abaxial, características essas que classificam a bananeira como uma espécie anfi-hipoestomática, conforme relatado por Sandoval et al. (1994). De acordo com Alquini et al. (2006), o tipo tetracítico é evidente em numerosas famílias de monocotiledôneas, o qual é envolvido por quatro células

subsidiárias, duas delas paralelas às células-guarda, sendo o par restante polar e freqüentemente menor.

Para a densidade estomática, maior número de estômatos por mm^{-2} foi observado em plantas submetidas ao ambiente natural, muito embora diferenças significativas entre os ambientes tenham sido observadas apenas para a concentração de 30 g.L^{-1} . Contudo, a densidade estomática média observada na face abaxial, em plantas sob ambiente natural, foi de $162,6$ estômatos por mm^{-2} . Já em relação à densidade estomática da face adaxial, nenhum efeito significativo dos fatores estudados foi verificado (Tabela 5). A alta densidade estomática observada em plantas de bananeira cultivadas *in vitro* é, freqüentemente, observada em outras espécies e tem sido associada, principalmente, à elevada umidade relativa do ar no interior dos recipientes de cultivo (Khan et al., 2003, Sciutti & Morini, 1995).

TABELA 5. Espessura da hipoderme da face adaxial (HIP/AD) e densidade estomática da face abaxial (DE/AB), em plantas micropropagadas de banana cv. Caipira (AAA), em função do ambiente de cultivo (artificial e natural) e concentração de sacarose (15 e 30 g L^{-1}). UFLA, após 45 dias de enraizamento *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Sacarose (g.L^{-1})	HIP/AD (μm)		Média	DE/AB		Média
	Natural	Artificial		Natural	Artificial	
15	44,1 Ba	79,7 Aa	61,9 a	158,1 Aa	150,7 Aa	154,4 a
30	49,5 Ba	59,7 Ab	54,6 b	167,2 Aa	131,1 Bb	149,2 a
Média	46,8 B	69,7 A		162,6 A	140,9 B	
CV (%)		11,97			12,43	

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, dentro de cada variável, diferem entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram obtidos por Rocha (2005), para a cultivar Prata-Anã, em que explantes em fase de enraizamento apresentaram maiores densidades estomáticas da face abaxial nos ambientes artificial, com 15 g.L^{-1} e natural, com 15 ou 30 g.L^{-1} de sacarose. No entanto, o autor ressalta que a

análise da densidade estomática, pura e simples, não é um bom parâmetro para se avaliar a adaptabilidade anatômica das espécies à aclimatização.

Já Lima Junior et al. (2005) verificaram aumento no número de estômatos por área, número de células e índice estomático em plantas de *C. vernalis* cultivadas a pleno sol e 30% de sombreamento. Efeito semelhante da alta irradiância foi observado por Deccetti (2004), em plantas de *Annona glabra*, durante a fase de enraizamento *in vitro*. De acordo Castro (2002) e Kundu & Tigerstedt (1998), o incremento na densidade estomática pode permitir que a planta eleve a condutância de gases, evitando que a fotossíntese seja limitada sob diferentes condições de ambiente. Nesse mesmo sentido, alguns trabalhos têm demonstrado correlações positivas entre número de estômatos e taxa fotossintética (Lima Junior et al. 2005). Contudo, existem ainda alguns autores que afirmam que o número de estômatos por folha permanece praticamente inalterável em relação aos diferentes ambientes em que as espécies são submetidas.

De modo geral, informações a respeito das contribuições da estrutura foliar para a fotossíntese e o crescimento das plantas (Smith et al. 1997) podem contribuir para um melhor entendimento ou, mesmo, permitir a elucidação de lacunas acerca das diferenças nas taxas de crescimento de plantas (Lambers & Poorter, 1992). Adicionalmente, as alterações que ocorrem na estrutura interna das folhas, induzidas por modificações nos níveis de irradiância, constituem aspectos determinantes na capacidade de aclimatação das espécies submetidas a condições ambientais distintas (Hanba et al. 2002, Schluter et al. 2003).

Conteúdo relativo de água (RCW)

Os resultados para o conteúdo relativo de água das plantas foram significativamente influenciados pelos três fatores estudados (ambiente x sacarose x tempo). Verificou-se que plantas cultivadas em ambiente artificial

perderam mais água (menor RCW) com o tempo de exposição do que aquelas cultivadas sob luz natural, sendo esta perda mais acentuada na concentração de 30 g.L⁻¹ de sacarose (Figura 1). Estes resultados são confirmados quando se consideram as médias referentes ao ambiente de cultivo e sacarose, com 82,6% e 78,1%, para os ambientes natural e artificial, respectivamente. Entre as concentrações de sacarose, observou-se que o uso de 15 g.L⁻¹ possibilitou maior conteúdo relativo de água (Tabela 6), possivelmente devido ao maior espessamento apresentado pela epiderme da face abaxial nesta condição (Tabela 3). Resultado semelhante foi reportado por Deccetti (2004), em tecidos foliares de *Annona glabra* L., em que menor perda de água foi observada em plantas cultivadas *in vitro* sob elevada irradiância (300 µmol.m⁻².s⁻¹) em detrimento de níveis menores de irradiância.

TABELA 6. Conteúdo relativo de água (CRW) (%) em plantas micropropagadas de banana cv. Caipira (AAA), em função do ambiente de cultivo (natural e artificial) e concentração de sacarose (15 e 30 g L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2007.

Sacarose (g L ⁻¹)	Ambiente de cultivo		Média
	Natural	Artificial	
15	83,0 Aa	80,6 Aa	81,8 a
30	82,3 Aa	75,5 Bb	78,9 b
Média	82,6 A	78,1 B	
CV₁ (%)		15,18	
CV₂ (%)		1,37	

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, dentro de cada variável avaliada, diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo teste F.

Adicionalmente, a menor perda de água (maior RCW), verificada em plantas provenientes de luz natural, pode ser atribuída à ocorrência de flutuações na umidade relativa e temperatura no interior dos frascos de cultivo, durante o período de cultivo, favorecendo melhor mecanismo estomático (abertura e fechamento) e produção de cera epicuticular, além de tornar a plantas mais

rústicas. Além disso, verificou-se que as células da hipoderme de plantas enraizadas sob luz natural apresentavam-se mais espessadas, contribuindo para evitar a excessiva perda de água.

Embora a umidade relativa e a temperatura no interior dos recipientes não tenham sido mensuradas, estudo conduzido por Silva (2006) com abacaxizeiro, também no município de Lavras e sob condições semelhantes de cultivo, irradiância e temperatura, mostrou que a umidade relativa e a temperatura no interior dos frascos, sob ambiente de luz natural, variaram de 58% a 95% e 10°C a 40°C, respectivamente, enquanto que, sob ambiente artificial, foram de 96% a 98% e 23°C a 27°C.

Nesse sentido, de acordo com Sciutti & Morini (1995), a elevada umidade relativa dentro dos recipientes de cultivo *in vitro* é o principal fator que conduz a alterações nas estruturas e no funcionamento dos tecidos. Adicionalmente, o aumento na intensidade luminosa e ou a redução na umidade relativa durante o cultivo *in vitro* têm resultado em modificações anatômicas semelhantes às aquelas observadas durante a aclimatização em casa de vegetação, como aumento na deposição de cerosidade epicuticular, redução no tamanho e frequência dos estômatos (Capellades et al. 1990), assim como também redução na perda de turgor e melhoria do aparelho estomático das plantas, após sua transferência para o solo.

Sciutti & Morini (1995) afirmam que plantas de *Prunus cerasifera* enraizadas sob 100% de UR perderam significativamente maiores quantidades de água em comparação às plantas submetidas a UR de 70% e 80%. Além disso, plantas cultivadas sob 80% e 70% de UR tiveram, visivelmente, cerosidade mais densa (filamentos superiores a 0,8 µm) sobre as folhas. Já plantas cultivadas sob 100% de UR mostraram estômatos menos abertos, células epidérmicas com sintomas típicos de estresse e que entraram em colapso após 30 minutos, em condições de câmara de crescimento.

Maior perda de água em tecidos foliares de plantas cultivadas *in vitro* foi também observada por Romano & Martins-Loução (2003), durante a aclimatização de carvalho. De acordo com seus resultados, acentuada perda de água foi verificada em folhas desenvolvidas ainda durante a fase de enraizamento *in vitro*, comparadas às folhas desenvolvidas na fase de aclimatização (folhas de transição), com perda em torno de 53% nos primeiros 30 minutos, em condições de 50% de umidade relativa do ar e temperatura de 21 ± 2 °C. Já folhas de transição tiveram perda de apenas 14%. Em adição, observou-se ainda, que, ao final do período de desidratação, folhas oriundas do cultivo *in vitro* apresentaram estômatos abertos e colapso das células-guarda, fato não verificado em folhas de plantas aclimatizadas, pois estas se encontravam com os estômatos fechados.

Sandoval *et al.* (1994) verificaram que plantas de bananeira ‘Grande Naine’ (AAA), cultivadas heterotroficamente *in vitro* sob $80 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, apresentavam cutícula fina, pequena deposição de cera e hipoderme extensa, com muito estômatos apresentando ostíolos parcialmente ou completamente fechados, indicando pouca ou nenhuma funcionalidade.

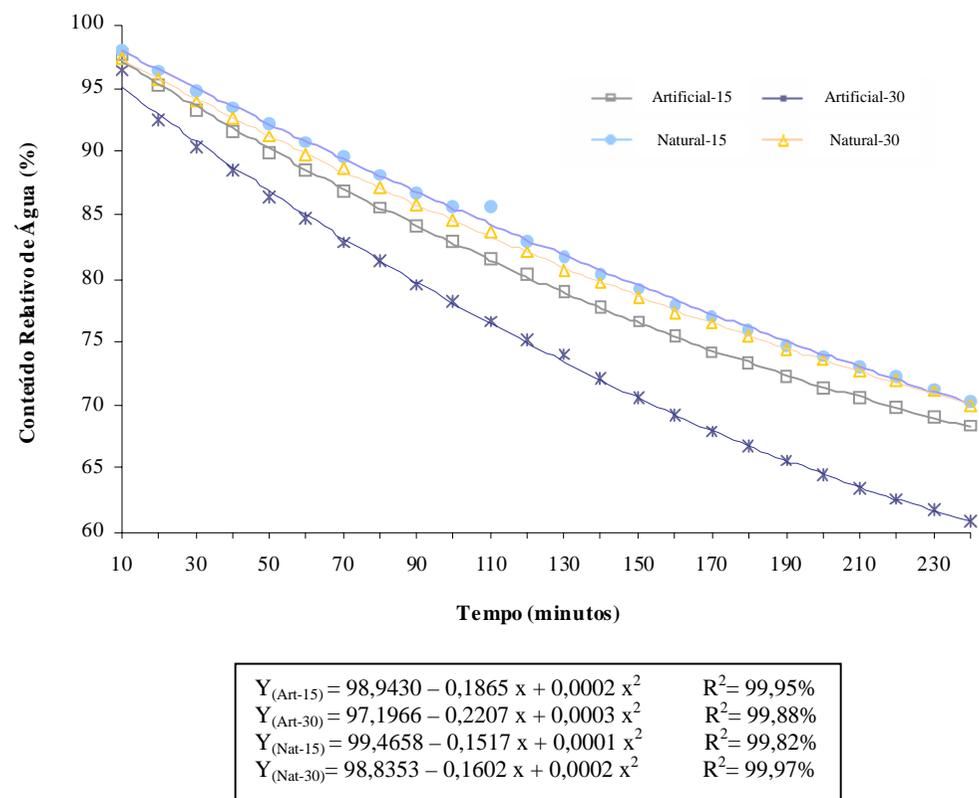


FIGURA 1. Conteúdo relativo de água em plantas micropropagadas de banana cv. Caipira (AAA), em resposta ao ambiente de cultivo (natural e artificial) e concentração de sacarose (15 e 30 g L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2007.

4 CONCLUSÕES

1. A utilização da luz natural, na fase de enraizamento *in vitro*, promove rustificação nas plantas micropropagadas de bananeira, cv. Caipira, com 100% de sobrevivência.
2. Melhorias nas características fisiológicas e anatômicas avaliadas são obtidas plantas enraizadas em ambiente de luz natural, embora com maior degradação do pigmento de clorofila *a* e *total*.

5 AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
pelo apoio financeiro e concessão das bolsas de estudos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. M. Z.; SOARES, A. M.; CASTRO, E. M. de; VIEIRA, C. V.; GAJEGO, E. B. Alterações morfológicas e alocação de biomassa em plantas jovens de espécies florestais sob diferentes condições de sombreamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 62-68, jan./fev. 2005.

ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOERGER, M. R. T.; COSTA, C. G.; BARROS, C. F. Epiderme In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 87-108.

ALTMAN, A.; LOBERANT, B. Micropropagation: clonal plant propagation *in vitro*. In: ALTMAN, A. (Ed.) **Agricultural Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 19-56.

ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; GAVILANES, M. L.; BLANK, A. F.; CAMDESI, A. A. Desenvolvimento de mudas de Guarea [*Guarea guidonea* (L.) Sleumer]. **Daphine**, Belo Horizonte, v. 8, n. 3, p. 22-26, jul. 1998.

ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; LIMA JUNIOR, E. C.; MAGALHÃES, M. M. Effects of different light levels on the initial growth and photosynthesis of *Croton urucurana* Baill. In southeastern Brazil. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 53-57, jan./fev. 2003.

AMÂNCIO, S.; REBORDÃO, J. P.; CHAVES, M. M. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: photosynthetic competence and carbon allocation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 58, n. 1, p. 31-37, 1999.

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

ATROCH, E. M. A. C.; SOARES, A. M.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M. Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de biomassa e características anatômicas de plantas jovens de *Bauhinia forficata* Link. Submetidas a diferentes condições de sombreamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 4, p. 853-862, maio/jun. 2001.

BRAGA, F. T. **Ambiente de cultivo na propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Rage): características anatômicas e fisiológicas.** 2006. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BRAND, M. H. Shade influences plant growth, leaf color and chlorophyll content of *Kalmia latifolia* L. cultivars. **Hort Science**, Alexandria, v. 32, n. 2, p. 206-208, Apr. 1997.

CAPELLADES, M.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosamultiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141-145, Jan. 1990.

CASTRO, E. M. **Alterações anatômicas, fisiológicas e fitoquímicas em *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento.** 2002. 221 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; MELO, H. C.; SOARES, A. M.; ALVARENGA, A. A.; LIMA JÚNIOR, E. C. Aspectos anatômicos e fisiológicos de plantas de guaco submetidas a fotoperíodos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 846-850, jul./Set 2005.

CRITCHLEY, C. Molecular adaptation to irradiance: the dual functionality of photosystem II. In: SINGHAL, G. S. et al. (Ed.) **Concepts in photobiology: photosynthesis and photomorphogenesis.** New Delhi: Narosa publishing House, 1999. p. 573-587.

CROUCH, J. H.; VUYLSTEKE, D.; ORTIZ, R. Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa* spp.). **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 1998.

DECETTI, S. F. C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L.** 2004. 93 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.

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

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4. 3**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA;DEX, 2000. Software.

FOLLIOT, M.; MARCHAL, J. Croissance *in vitro* des bananiers: influence de la concentration en saccharose du milieu de culture sur le développement des plants du cultivar Petite naine. **Fruits**, Paris, v. 47, n. 6, p. 565-571, Nov./Dec. 1992.

GANGOPADHYAY, G.; DAS, S.; MITRA, S. K.; PODDAR, R.; MODAK, B. K.; MUKHERJEE, K. K. Enhanced rate of multiplication and rooting through the use of coir in aseptic liquid culture media. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 68, n. 3, p. 301-310, Mar. 2002.

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.

JOHANSEN, B. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523 p.

KHAN, S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, O. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia plantarum**, Dordrecht, v. 46, n. 2, p. 161-166, 2003.

KITAJIMA, K.; HOGAN, K. P. Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 857-865, June 2003.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine') **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Dordrecht, v. 55, n. 2, p. 141-14, 1999.

KÖPPEN, W. **Climatología**: con un estudio de los climas de la tierra. Mexico: Fondo de Cultura Economica, 1948. 478 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia**

vegetal. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.

KUNDU, S. K.; TIGERSTEDT, P. M. A. Variation in net photosynthesis, stomatal characteristics, leaf area and whole plant phytomass production among ten provenances of neem (*Azadirachta indica*). **Tree Physiology**, Victoria, v. 19, n. 1, p. 47-52, Jan. 1998.

LABOURIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADOLABOURIAU, M. L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 237-257, jun. 1961.

LAMBERS, H.; POORTER, H. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. **Advances in Ecological Research**, New York, v. 23, p. 187-261, 1992.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531 p.

LEE, D. W.; OBERBAUER, S. F.; JOHNSON, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S. K. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian *hopea* (Dipterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 87, n. 4, p. 447-455, Apr. 2000.

LEI, T. T.; LECHOWICZ, M. J. Diverse responses of maple saplings to forest light regimes. **Annals of Botany**, London, v. 82, n. 1, p. 9-19, July 1998.

LIMA JUNIOR, E. de C.; ALVARENGA, A. A. de; CASTRO, E. M. de; VIEIRA, C. V.; OLIVEIRA, H. M. de. Trocas gasosas, características das folhas e crescimento de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1092-1097, set./oct. 2005.

MOHAMMED, G. H.; VIDAVER, W. E. The influence of acclimatization treatment and plantlet morphology on early greenhouse-performance of tissue-cultured Douglas fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 21, n. 2, p. 111-117, May 1990.

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

NAKAZONO, E. M. et al. Crescimento inicial de *Euterpe edulis* Mart. em diferentes regimes de luz. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 173-179, abr./jun. 2001.

NAVARRO, C.; TEISSON, C.; CÔTE, F.; GANRY, J. Effects of light intensity and CO₂ concentration on growth of banana plants (*Musa* AAA, cultivar 'Petite Naine') *in vitro* and subsequent growth following acclimatization. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 60, n. 1/2, p. 41-54, Dec. 1994.

ROCHA, H. S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira "Prata Anã": alterações morfoanatômicas**. 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Lavras, MG.

ROMANO, A.; MARTINS-LOUÇÃO, M. A. Water Loss and Morphological Modifications in Leaves during Acclimatization of Cork Oak Micropropagated Plantlets. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 616, p. 439-442, 2003.

SANDOVAL, J. A.; MÜLLER, L. E.; WEBERLING, F. Foliar morphology and anatomy of *Musa* cv. Grande Naine (AAA) plants grown *in vitro* and during hardening as compared to field-grown plants. **Fruits**, Paris, v. 49, n. 1, p. 37-46, Jan./Feb. 1994.

SANTAMARIA, J. M.; KERSTIENS, G. The lack of control of water loss in micropropagated plants is not related to poor cuticle development. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 91, n. 2, p. 191-195, June 1994.

SARRACINO, J. H.; MERRITT, R.; CHIN, C. K. Morphological and physiological characteristics of *Leea coccinea rubra* in response to light flux. **Hortscience**, Alexandria, v. 27, n. 5, p. 400-403, May 1992.

SCHLUTER, U.; MUSHAK, M.; BERGER, D.; ALTMANN, T. 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.

SCIUTTI, R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 10, n. 2, p. 221-228, Mar. 1995.

SHIM, S. W.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. In vitro and ex vitro growth of grapevine rootstock "5BB" as influenced by number of air exchanges and the

presence or absence of sucrose in culture media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 1, p. 57-62, 2003.

SILVA, A. B. da. **Biorreatores e luz natural na micropropagação do abacaxizeiro**. 2006. 132 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SMITH, W. K.; VOGELMANN, T. C.; DELUCIA, E. H.; BELL, D. T.; SHEPHERD, K. A. Leaf form and photosynthesis. **BioScience**, Washington, v. 47, n. 11, p. 785-793, Dec. 1997.

TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre : Artmed, 2004. 693 p.

TALAVERA, C.; CONTRERAS, F.; ESPADAS, F.; FUENTES, G.; SANTAMARÍA, J. M. Cultivating *in vitro* coconut palms (*Cocos nucifera*) under glasshouse conditions with natural light, improves *in vitro* photosynthesis nursery survival and growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 83, n. 3, p. 287-292, Dec. 2005.

THINGUYEN, Q.; KOZAI, T. Growth of *in vitro* banana (*Musa* spp.) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **In vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 37, n. 6, p. 824-829, Nov./Dec. 2001.

VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 62, p. 323-328, 1985.

WHATLEY, F. H.; WHATLEY, F. R. **A Luz e a vida das plantas**. São Paulo: EPU-EDUSP, 1982. 101 p. (Temas de Biologia, 30).

ARTIGO 4

**ALTERAÇÕES ANATÔMICAS EM PLANTAS DE BANANEIRA CV.
JAPIRA (AAAB) CULTIVADAS *IN VITRO* E DURANTE A
ACLIMATIZAÇÃO**

(De acordo com as normas da Revista Ceres)

**Frederico Henrique da Silva Costa; Jonny Everson Schervinski Pereira;
Evaristo Mauro de Castro; Moacir Pasqual; Cynthia de Oliveira**

RESUMO

ALTERAÇÕES ANATÔMICAS EM PLANTAS DE BANANEIRA CV. JAPIRA (AAAB) CULTIVADAS *IN VITRO* E DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO

A realização de pesquisas a respeito das alterações anatômicas decorrentes do cultivo *in vitro* e subsequente aclimatização é preponderante para melhor entendimento e elucidação de lacunas existentes sobre as diferenças nas taxas de crescimento de plantas micropropagadas, bem como para o desenvolvimento de técnicas mais eficientes e otimização do processo de aclimatização. Dessa forma, objetivou-se, com este trabalho, estudar as alterações na anatomia foliar e identificar a existência de conexão vascular das raízes em plantas micropropagadas de bananeira cultivadas *in vitro* e durante a aclimatização. Para tanto, brotações axilares da cultivar Japira, provenientes da multiplicação *in vitro*, foram enraizadas em meio MS, adicionado de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 1 mg.L⁻¹ de ANA e 6 g.L⁻¹ de ágar e mantidas à temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 42 W.m⁻², durante 35 dias. Posteriormente, as plantas foram submetidas a diferentes períodos de aclimatização (0, 21, 42, 63, 84 e 120 dias) e avaliadas quanto à anatomia, por meio de seções transversais e paradérmicas de folhas, bem como quanto à existência de conexão vascular das raízes nos diferentes tratamentos de aclimatização. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC). Verificou-se que plantas micropropagadas de bananeira são anfi-hipoestomática, com estômatos do tipo tetracítico e organização do mesófilo foliar dorsiventral ou bifacial. A aclimatização de plantas micropropagadas de bananeira cv. Japira é obtida a partir de 63 dias, em casa de vegetação, sendo os parênquimas clorofilianos, hipoderme, densidade e forma dos estômatos as características mais influenciadas nesta fase. Plantas *in vitro* e aclimatizadas apresentam conexão vascular entre as raízes e a parte aérea.

Palavras-chave: *Musa* spp., cultivo *in vitro*, anatomia, endurecimento *ex vitro*.

ABSTRACT

ANATOMICAL ALTERATIONS IN PLANTS OF BANANA JAPIRA (AAAB) CULTIVATED *IN VITRO* AND DURING ACCLIMATIZATION

The accomplishment of researches regarding the current anatomical alterations on *in vitro* cultivation and subsequent acclimatization is preponderant for better understanding and elucidation of problems on the growth of micropropagated plants, as well as for the development of more efficient techniques of acclimatization. The work objectified to study alterations in the anatomy of leaves and to identify vascular connection of roots in micropropagated plants of banana cultivar (AAAB) from *in vitro* multiplication phase, were rooted in MS medium whitin 30 g.L⁻¹ sucrose, 1 mg.L⁻¹ NAA and 6 g.L⁻¹ agar and kept to 25 ± 2°C temperature, 16 hours photoperiod and 42 W.m⁻² luminous intensity for 35 days. After this, the plants were submitted to different acclimatization periods (0, 21, 42, 63, 84 and 120 days) and evaluated with relationship to the anatomy, by means of transverse and paradermic sections of leaves, as well as with relationship to the existence of vascular connection of the roots in the different acclimatization treatments. The experimental was allocated in a completely randomized design. It was verified that micropropagated plants of banana are amphipostomatic with tetracitic stomata and presenting organization of the mesophyll cells as dorsiventral or bifacial structure. The acclimatization of micropropagated banana plants, cv. Japira is obtained starting from 63 days, at greenhouse being the chlorophyllian parenchyma, hypodermis, density and forms of the stomata the characteristics more influenced in this phase. *In vitro* and acclimatized plants present vascular connection between roots and aerial parts.

Keywords: *Musa* spp., *in vitro* cultivation, anatomy, *ex vitro* hardening

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de ápices caulinares e meristemas utilizando técnicas de cultura de tecidos constitui a base da propagação clonal massal de bananas e plátanos e que tem apresentado expressivo crescimento e aceitação nos últimos 30 anos, com a adoção em diversos países (Gübbük & Pekmezci, 2004). Apesar de suas vantagens, as plantas cultivadas *in vitro* apresentam certas características morfoanatômicas e fisiológicas intrínsecas ao ambiente de cultivo, tais como reduzida deposição de cera epicuticular, cutícula e epiderme pouco espessa, reduzida diferenciação do mesofilo, abundantes espaços intercelulares, feixes vasculares rudimentares, conexão vascular entre as raízes e parte aérea deficiente ou inexistente e deficiente mecanismo estomático (Acuña, 1995; Capellades et al., 1990; Donnely et al., 1985; Romano & Martins-Loução, 2003; Sandoval et al., 1994; Santamaria & Kerstiens, 1994).

Todas estas alterações têm sido consideradas como resultado de complexas e peculiares condições do ambiente *in vitro*, que incluem reduzida intensidade luminosa, condições assépticas, presença de uma fonte exógena de carbono prontamente disponível, baixa disponibilidade de CO₂ e alta concentração de etileno, alta umidade relativa e reduzidas trocas gasosas com o ambiente (Arigita et al., 2002; Kodym & Zapata-Arias, 1999; Preece & Sutter, 1991).

Entretanto, embora essas modificações perdurem até os primeiros dias da transferência das plantas para as condições *ex vitro*, as novas folhas desenvolvidas durante a aclimatização terão características de transição, sendo, portanto, mais adaptadas e eficientes nos processos concernentes ao desenvolvimento vegetal. Além disso, após serem transferidas para as condições de campo, normalmente, todas as alterações induzidas durante o cultivo *in vitro*

desaparecem completamente (Sandoval et al., 1994). Dessa maneira, uma fase de aclimatização, logo após a retirada das plantas dos recipientes de cultivo é necessária e vantajosa, uma vez que irá possibilitar alterações fisiológicas e estruturais nas plantas micropropagadas, que são primordiais para a melhor adaptação destas ao novo ambiente *ex vitro* (Marin, 2003).

Outro aspecto importante no processo de micropropagação está relacionado à funcionalidade das raízes desenvolvidas *in vitro*, o que é pouco entendido e estudado, inexistindo, até o presente momento, estudos com bananeiras micropropagadas. Nesse sentido, Apter et al. (1993) afirmam que algumas plantas micropropagadas podem desenvolver raízes funcionais durante o cultivo *in vitro* ou, mesmo, com pouca ou nenhuma funcionalidade, sendo, muitas vezes, considerado um fator chave a ocorrência elevada de perdas na aclimatização. Em adição, pesquisas têm mostrado haver benefícios das raízes desenvolvidas *in vitro* no estabelecimento de plantas *ex vitro* (Díaz-Pérez et al., 1995; Bosa et al., 2003; Gribaudo et al., 1995).

Nesse contexto, estudos acerca das modificações que ocorrem na anatomia e morfologia foliar em plantas micropropagadas, após sua exposição às condições *ex vitro*, têm contribuído significativamente para o desenvolvimento de técnicas mais eficientes de aclimatização (Gonçalves et al., 2000; Rohr et al., 2003; Soares, 2003).

Objetivou-se estudar as alterações na anatomia foliar e identificar a existência de conexão vascular das raízes em plantas micropropagadas de bananeira cultivadas *in vitro* e durante a aclimatização.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Anexos do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, região Sul do estado de Minas Gerais. Segundo a classificação climática de Köppen (1948), o clima regional é do tipo Cwa com características Cwb, apresentando duas estações definidas: seca, com temperaturas mais baixas de abril a setembro, e chuvosa, com temperaturas mais elevadas, de outubro a março. O experimento foi conduzido entre os meses de abril e agosto de 2006.

Material vegetal e condições de cultivo

O material vegetal consistiu de plantas micropropagadas de bananeira da cultivar Japira (AAAB), um híbrido resistente às principais doenças que acometem a cultura da banana. Para a obtenção dos explantes, ápices caulinares da referida cultivar foram inicialmente estabelecidos *in vitro*, multiplicados e, em seguida, as brotações axilares obtidas foram enraizadas e alongadas em meio básico de MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionado de 1 mg.L^{-1} de ANA (ácido naftalenoacético) e 6 g.L^{-1} de ágar. O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do agente geleificante, sendo, em seguida, autoclavado por 20 minutos, a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1 atm.

O cultivo foi feito em frascos de 250 mL contendo 40 mL de meio e quatro brotações cada, sendo os recipientes selados com filme transparente e, em seguida, mantidos em sala de crescimento à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 42 W.m^{-2} , fornecida por meio lâmpadas fluorescentes tubulares do tipo luz do dia especial (Osram 20W), permanecendo nestas condições por 35 dias.

Fase de aclimatização e descrição dos tratamentos

A aclimatização foi realizada em tubetes de 0,3 L, sob condições de casa de vegetação, coberta com filme de polietileno transparente (150 microns) e com tratamento contra raios ultravioleta, sombreamento de 70% (Sombrence®) e sistema de irrigação por nebulização intermitente. As plantas foram, inicialmente, removidas dos frascos de cultivo e tiveram suas raízes lavadas em água corrente. Em seguida, foram transferidas para tubetes preenchidos com substrato composto pela mistura de terra de subsolo (abaixo de 40 cm):Plantmax Hortaliças HT®:casca de arroz carbonizada (1:1:1 v/v), acrescido de 50.g L⁻¹ de húmus e 20 g.L⁻¹ de super simples.

Os tratamentos foram constituídos por plantas sob diferentes períodos de aclimatização (0, 21, 42, 63, 84 e 120 dias após a transferência *ex vitro*).

Avaliações anatômicas

Foram realizadas no Laboratório de Anatomia vegetal do Departamento de Biologia da UFLA, utilizando-se cinco plantas coletadas ao acaso, em cada período de aclimatização, as quais foram previamente fixadas em FAA 70 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico) (Johansen, 1940), por 72 horas e, posteriormente, conservadas em álcool etílico 70%, até a realização dos cortes. As avaliações foram feitas com base em observações de microscopia de luz de seções transversais (folha e raiz) e paradérmicas foliares, obtidas em micrótomo de mesa manual e à mão livre, com auxílio de lâmina de aço inox (Gillette®).

A clarificação das seções transversais foi realizada em solução de hipoclorito de sódio a 50%. Em seguida, foram submetidas à lavagem em água destilada e coradas com azul de astra-safranina, seguindo metodologia descrita por Kraus & Arduin (1997), com modificações. Posteriormente, as seções foram montadas em glicerina a 50%. Com auxílio de microscópio Ken-a-vision 2100,

equipado com ocular micrométrica e objetiva de 40X, foram efetuadas medições das espessuras das epidermes das faces adaxial e abaxial, dos parênquimas paliádico e esponjoso e das hipodermes inferior e superior, sendo efetuadas três medições em cada folha, na região do feixe lateral (após o terceiro feixe), totalizando 15 repetições para cada tratamento. A espessura da nervura do feixe central foliar (saliência) foi ainda mensurada.

Os cortes paradérmicos foram realizados no terço médio foliar, em ambas as faces das folhas; a clarificação e a montagem das lâminas foram igualmente efetuadas como descrito para as seções transversais, exceto a coloração, que foi feita com safranina 1%. Nessas seções, as variáveis analisadas foram: densidade estomática (nº de estômatos por mm²) e diâmetros polar e equatorial dos estômatos. A contagem de estômatos foi realizada em microscópio Olympus CBB (objetiva de 40X), com auxílio de câmara clara, segundo metodologia descrita por Labouriau *et al.* (1961), em quatro campos da região mediana de 5 folhas provenientes de 5 plantas distintas, num total de 20 campos/repetições por tratamento. Já para os diâmetros polar e equatorial, foram efetuadas 20 medições (quatro por folha ou corte de 5 plantas distintas), num total de 20 repetições, utilizando microscópio Ken-a-vision 2100, equipado com uma Ocular Micrométrica.

Para o estudo de conexão vascular entre as raízes e a parte aérea, empregaram-se segmentos transversais de raízes obtidos na região compreendida entre o rizoma, as raízes e o pseudocaule. A clarificação, a coloração e a montagem das lâminas semi-permanentes seguiram a mesma metodologia empregada nos cortes transversais de folha.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se

o programa estatístico Sisvar 4.3 (Ferreira, 2000), sendo as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As observações realizadas nas seções transversais de folhas de bananeira micropropagadas mostraram efeitos significativos do período de aclimatização no espessamento e na organização dos tecidos, assim como também alterações na forma e nas frequências dos estômatos.

De acordo com os resultados, as folhas de bananeira, cv. Japira, apresentaram organização do tipo dorsiventral ou bifacial, uma vez que o parênquima paliçádico encontra-se localizado em um lado (voltado para a epiderme adaxial), imediatamente abaixo da hipoderme superior e o esponjoso, no outro (voltado para a epiderme abaxial). Além disso, as células do parênquima paliçádico são de formas alongadas típicas, dispostas como barras em fileiras, enquanto o parênquima esponjoso não possui células bem definidas (Figura 1).

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

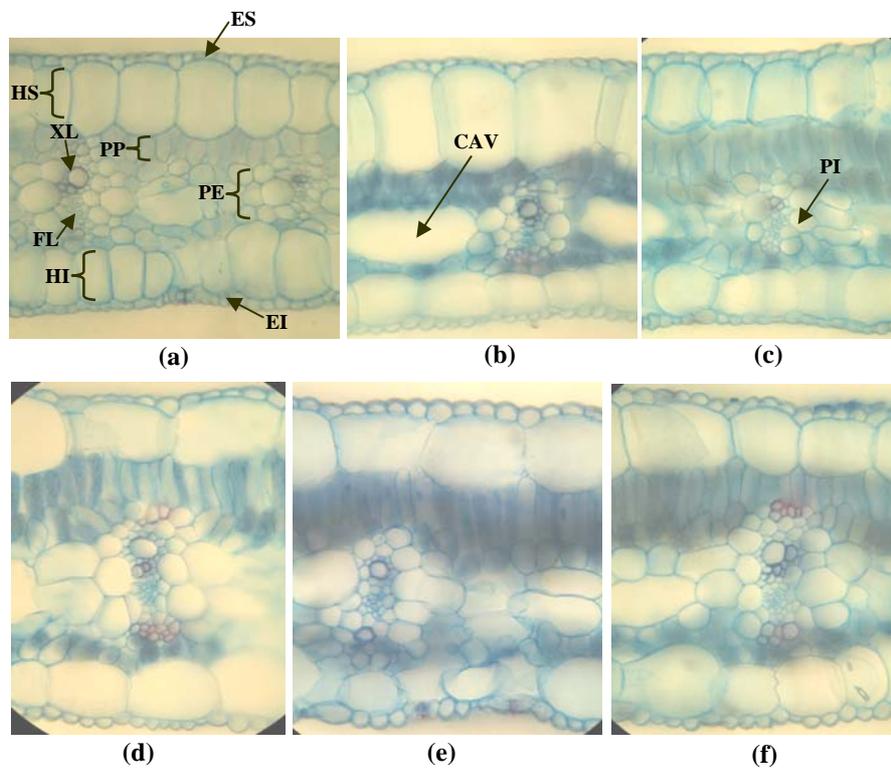


FIGURA 1. Fotomicrografias de seções transversais, retiradas na região da lâmina foliar após o terceiro feixe vascular, de plantas micropropagadas de bananeira, cv. Japira, em diferentes períodos de aclimatização (Objetiva de 40X com 2 reduções). (a – f, plantas aos 0, 21, 42, 63, 84 e 120 dias). HS-hipoderme superior/face adaxial; HI-hipoderme inferior/face abaxial; ES-epiderme superior/face adaxial; EI-epiderme superior/face adaxial; CAV-cavidade de ar; PI-parênquima incolor. UFLA, Lavras, MG, 2007.

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

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

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

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

Quanto aos parênquimas paliçádico e esponjoso, verificou-se tendência de incremento da espessura com o tempo de aclimatização, tendo a menor e a maior espessuras sido observadas em plantas *in vitro* (39,0 e 65,3 µm) e aclimatizadas por 84 dias (96,5 e 108,0 µm) (Tabela 1). Além disso, melhorias quanto à estrutura dos tecidos do mesofilo e dos feixes vasculares com o aumento do período de desenvolvimento vegetativo *ex vitro* foram também observadas, havendo acentuada diferença entre as plantas aos 0 dia (*in vitro*) e aquelas aclimatizadas por período superior a 42 dias (Figura 1).

Comportamento semelhante ao verificado para o espessamento dos parênquimas foi notado para a espessura da saliência (nervura central) (Tabela 1). A ocorrência de células paliçádicas mais alongadas constitui um padrão clássico de resposta e de adaptação das plantas à alta intensidade de luz (Lee et al., 2000) e evidencia a plasticidade adaptativa da planta ao novo ambiente.

De acordo com Alquini et al. (2006), os parênquimas paliçádico e esponjoso possuem como 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 completa diferenciação do mesofilo em folhas de plantas cultivadas *in vitro* pode promover um reduzido potencial fotossintético (Wetzstein & Sommer, 1982).

Espessamento dos parênquimas paliçádico e esponjoso com o período de aclimatização foi reportado por Pereira (2004), em espécies micropropagadas pertencentes ao gênero *Uncaria*. Estes resultados concordam com os de Romano & Martins-Loução (2003), segundo os quais, maior diferenciação do mesofilo em folhas de *Quercus suber* L. foi verificada naquelas desenvolvidas após a transferência das plantas para o substrato, as quais apresentaram estrutura foliar característica de plantas de sol, com pequenos espaços intercelulares, alta densidade de células paliçádicas, com 2 ou 3 camadas. Adicionalmente, os autores observaram incremento no desenvolvimento dos tecidos vasculares com o período de aclimatização.

Para a hipoderme, verificou-se que, em relação à face adaxial, houve incremento da espessura deste tecido até os 42 dias de aclimatização, período em que foi registrado o maior espessamento ($P < 0,05$). Períodos superiores a este mostraram tendência de redução no espessamento e nenhuma diferença significativa foi observada. Já em relação à hipoderme abaxial, espessamento significativo ocorreu em plantas aclimatizadas por 63 e 84 dias, tendo as folhas *in vitro* apresentado a menor espessura ($P < 0,05$) (Tabela 1).

Acrescenta-se, ainda, que, de modo geral, as análises anatômicas revelaram que supostas folhas de transição (21 dias) e aquelas oriundas de plantas aos 42 dias tiveram pouca ou nenhuma diferença, quando comparadas às plantas *in vitro*, como observado para os parênquimas clorofilianos e hipoderme adaxial (Tabela 1). Romano & Martins-Loução (2003) também observaram que algumas características verificadas em folhas *in vitro* persistiram nas primeiras folhas desenvolvidas *ex vitro*, as folhas de transição.

Em estudo realizado com plantas micropropagadas de bananeira submetidas a $80 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 27°C , em sala de crescimento, Sandoval et al. (1994) verificaram, como principais características, a presença de uma fina camada de cutícula, epiderme pouco espessa, com células algumas vezes irregulares em tamanho e sinuosas, hipoderme formada por extensas células perpendiculares às células epidérmicas, falta de diferenciação entre os parênquimas paliçádico e esponjoso e presença de feixes vasculares bastante rudimentares (com apenas alguns elementos de floema e vasos de xilema). Por outro lado, seções transversais foliares provenientes de plantas aos 90 dias de aclimatização mostraram parênquima paliçádico constituído de duas camadas de células, sendo uma camada acima formada de células alongadas e outra abaixo com células mais isodiamétricas. Além disso, um espessamento de esclerênquima ao redor dos feixes vasculares também foi verificado sob estas condições.

Em relação aos estômatos, estes são do tipo tetracítico (Figura 2c) e estão presentes em ambas as faces da epiderme, adaxial e abaxial (Figura 2a,b), porém, com maior frequência na face abaxial (Tabela 2; Figura 2a). Essas características classificam a bananeira como uma espécie anfi-hipoestomática e corroboram àquelas anteriormente reportadas por Rocha (2005) e Sandoval et al. (1994), para as cultivares Prata-Anã e Grande Naine. De acordo com Alquini et al. (2006), o tipo tetracítico é evidente em numerosas famílias de monocotiledôneas, o qual é envolvido por quatro células subsidiárias, duas delas paralelas às células-guarda, sendo o par restante polar e, frequentemente, menor.

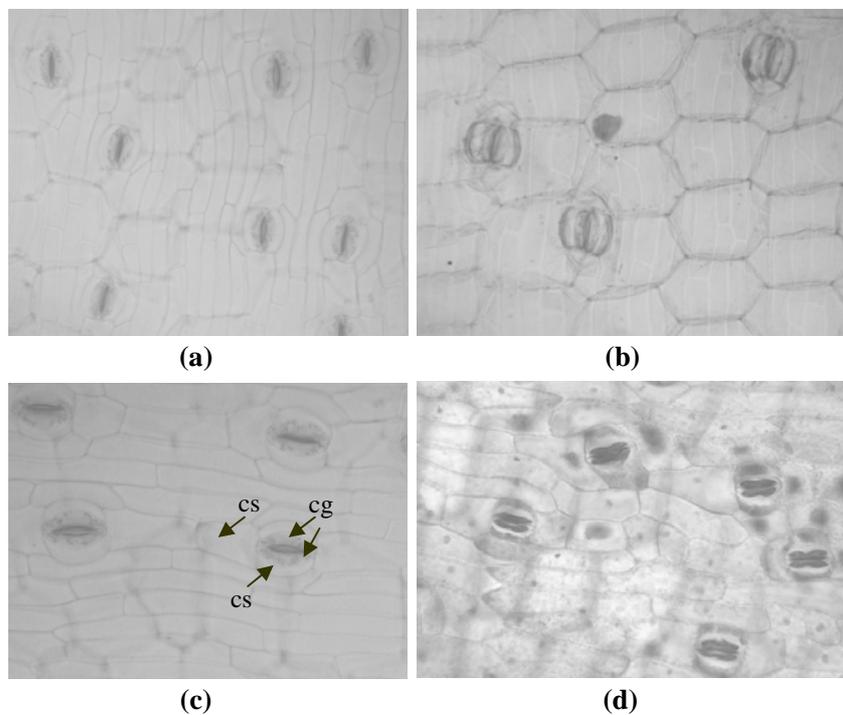


FIGURA 2. Fotomicrografias de seções paradérmicas de plantas micropropagadas de bananeira, cv. Japira, em diferentes períodos de aclimatização (Objetiva de 40X com 1 redução). **(a)** Face *abaxial* da epiderme aos 0 dias, evidenciando alta freqüência estomática; **(b)** face *adaxial* da epiderme aos 42 dias, mostrando menor freqüência estomática; **(c)** Detalhes do estômato tetracítico na face *abaxial* da epiderme em plantas *in vitro* (0 dias); **(d)** Epiderme da face *abaxial* aos 120 dias de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2007. (cs – células subsidiárias; cg – células guarda).

Quanto às características avaliadas, maior densidade estomática da face adaxial da epiderme (D.EST/AD) foi observada aos 0, 21 e 42 dias, os quais não diferiram entre si ($P < 0,05$), porém, foram significativamente superiores às plantas aclimatizadas por 63, 84 e 120 dias. Para a epiderme da face abaxial, maior número de estômatos por mm^{-2} (D.EST/AB) também foi observado nas

plantas *in vitro* ($P<0,05$). Por outro lado, os demais períodos foram significativamente semelhantes entre si (Tabela 2).

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

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

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

Resultado semelhante foi obtido por Pereira (2004) que verificou maior densidade estomática ($p<0,05$) em plantas de *Uncaria guianensis* e *U. tomentosa* a 0 dia de aclimatização (plantas *in vitro*), havendo, após este período, decréscimo na frequência estomática das plantas. Vários autores têm reportado a redução na densidade de estômatos com o incremento do período de aclimatização, sendo, inclusive, um processo bem característico dessa fase (Lee et al., 1985; 1988). De acordo com Braga (2006), este decréscimo no número de estômatos por mm^2 ocorre devido ao fato de as células da epiderme, bem como as dos demais tecidos foliares, apresentarem elevada taxa de crescimento e divisão durante o período de aclimatização.

Quanto ao tamanho dos estômatos, maior diâmetro polar (DP) ($P<0,05$), na face adaxial da epiderme, foi verificado em plantas com 21 e 120 dias de aclimatização (37,5 e 38,1), seguidas daquelas sob 63 dias. Para o diâmetro equatorial (DE), plantas aos 63 e 120 dias apresentaram a menor e a maior média

(18,3 e 21,4 μm) ($P<0,05$), enquanto que nenhuma diferença significativa foi observada entre os 0, 21, 42 e 84 dias de aclimatização. Assim, resultados significativamente superiores para relação DP/DE foram obtidos em plantas aclimatizadas por 21 e 63 dias, sendo os demais períodos significativamente iguais (Tabela 3).

Para a epiderme da face abaxial, maior DP foi observado aos 21, 42, 84 e 120 dias ($P<0,05$), tendo sido o menor DP em plantas a 0 dia de aclimatização (*in vitro*). Quanto ao DE, plantas aclimatizadas por 42, 63 e 120 dias tiveram as menores médias ($P<0,05$). Dessa forma, maior relação DP/DE foi notada aos 120 dias de aclimatização (Figura 2d), seguidos de 42, 21 e 63 dias (Tabela 3).

TABELA 3. Diâmetro polar e equatorial da epiderme das faces adaxial (DP/AD e DE/AD) e abaxial (DP/AB e DE/AB) e relação diâmetro polar e equatorial da epiderme das faces adaxial (DP/DE AD) e abaxial (DP/DE) de plantas micropropagadas de bananeira cv. Japira (AAAB) sob a influência do período de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Período (dias)	Epiderme adaxial			Epiderme abaxial		
	DP	DE	DP/DE	DP	DE	DP/DE
0	33,3 c	19,9 b	1,7 b	31,9 c	19,4 b	1,7 d
21	37,5 a	19,7 b	1,9 a	36,3 a	18,7 c	2,0 c
42	33,7 c	19,4 b	1,7 b	36,9 a	18,0 d	2,1 b
63	35,9 b	18,3 c	2,0 a	34,9 b	18,2 d	1,9 c
84	34,9 c	20,3 b	1,7 b	37,0 a	21,4 a	1,7 d
120	38,1 a	21,4 a	1,8 b	38,3 a	17,8 d	2,2 a
CV (%)	8,10	9,57	9,72	7,13	5,19	7,84

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

Redução no diâmetro equatorial dos estômatos com o tempo de aclimatização foi também reportado por Pereira (2004) em plantas de *Uncaria guianensis* e *U. tomentosa* micropropagadas. Já observações realizadas por Wetzstein & Sommer (1982), em folhas de *Liquidambar styraciflua* L.

desenvolvidas *in vivo*, revelaram estômatos deprimidos na superfície foliar e com células guarda elípticas, ao passo que folhas das plantas cultivadas *in vitro* apresentaram estômatos mais elevados, arredondados e com células subsidiárias elevadas.

Em trabalho realizado por Sandoval et al. (1994), com a cultivar de bananeira Grande Naine (AAA), plantas cultivadas *in vitro* tiveram diâmetro polar dos estômatos medindo cerca de 38 μm e DE de 15 μm . Adicionalmente, foi observado que muitos dos estômatos tiveram fechamento parcial ou total dos ostíolos quando as plantas foram retiradas dos frascos de cultivo, o que os autores atribuíram à reduzida funcionalidade ou sua ausência.

Estômatos pouco ou com nenhuma funcionalidade foram reportados também por Romano & Martins-Loução (2003), em plantas de *Quercus suber* L. (carvalho) micropropagadas. Segundo os autores, o colapso das células-guarda, assim como também a presença de estômatos abertos, foi observado ao final de 160 minutos de exposição das folhas às condições de $21\pm 2^\circ\text{C}$ e 50% de umidade relativa do ar. Em adição, verificou-se que estômatos oriundos de plantas *in vitro* não tiveram qualquer resposta ao tratamento de estresse hídrico, diferentemente dos estômatos provenientes de folhas com 1 e 6 meses de aclimatização, com reduzida e alta respostas, respectivamente.

Rocha (2005) afirma que a análise da densidade estomática não é um parâmetro confiável para a verificação da adaptabilidade anatômica durante o processo de aclimatização, porém, o formato das células guarda e a relação entre o diâmetro polar e equatorial dos estômatos podem representar uma forma segura de indicar a funcionalidade estomática. Isso porque quanto maior a relação diâmetro polar/equatorial, mais elipsóide será o formato do estômato, portanto, maior será sua funcionalidade. Estas afirmações são embasadas em relatos de Khan et al. (2002), segundo os quais a forma elíptica é característica

de estômatos funcionais e a forma arredondada está associada a estômatos que não apresentam funcionalidade normal.

De modo geral, interesses a respeito das contribuições da estrutura foliar para a fotossíntese e o crescimento das plantas (Smith *et al.*, 1997) podem contribuir para um melhor entendimento ou, mesmo, permitir a elucidação de antigas lacunas acerca das diferenças nas taxas de crescimento entre plantas (Lambers & Poorter, 1992). Adicionalmente, as alterações que ocorrem na estrutura interna das folhas constituem aspectos determinantes na capacidade de aclimação das espécies submetidas a condições ambientais distintas (Hanba *et al.*, 2002; Schluter *et al.*, 2003).

Em relação à funcionalidade das raízes, as observações anatômicas mostraram existência de conexão vascular entre as raízes e a parte aérea de plantas oriundas, tanto da fase de enraizamento *in vitro* quanto de plantas aclimatizadas. Estes resultados confirmam relatos de Apter *et al.* (1993), os quais afirmam que algumas plantas micropropagadas podem desenvolver raízes funcionais durante o cultivo *in vitro* ou, mesmo, com pouca ou nenhuma funcionalidade, sendo esta funcionalidade, muitas vezes, considerada fator chave para a ocorrência elevada de perdas na aclimatização. Acrescenta-se, ainda que pesquisas têm mostrado haver benefícios promovidos por raízes desenvolvidas *in vitro* ao estabelecimento de plantas *ex vitro* (Bosa *et al.*, 2003; Díaz-Pérez *et al.*, 1995; Gribaudo *et al.*, 1995).

4 CONCLUSÕES

1. A bananeira, é uma espécie anfi-hipoestomática, com estômatos do tipo tetracítico e organização do mesofilo foliar dorsiventral ou bifacial.
3. Os parênquimas clorofilianos, a hipoderme, a densidade e a forma dos estômatos são as características anatômicas mais influenciadas na aclimatização;
4. A aclimatização de plantas micropropagadas de bananeira cv. Japira, sob as condições deste trabalho, é obtida a partir de 63 dias em casa de vegetação.
5. Plantas *in vitro* e aclimatizadas apresentam conexão vascular entre as raízes e a parte aérea.

5 AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
pela concessão das bolsas de estudos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA, P. I. Micropropagación de banano a partir de ápices vegetativos. **Corbana**, v. 17, p. 9-12, 1995.
- ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOERGER, M. R. T.; COSTA, C. G.; BARROS, C. F. Epiderme In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 87-108.
- APTER, R. C.; DAVIES, F. T. Jr; McWILLIAMS, E. L. *In vitro* and *ex vitro* adventitious root formation in asian jasmine (*Trachelospermum asiaticum*) II. Physiological comparisons. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 118, n. 6, p. 906-909, Nov. 1993.
- ARIGITA, L.; GONZALEZ, A.; TAMÉS, R. S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, n. 1, p. 166-173, May 2002.
- BOSA, N.; CALVETE, E. O.; NIENOW, A. A.; SUZIN, M.; Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 207-210, abr./jun. 2003.
- BRAGA, F. T. **Ambiente de cultivo na propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Rage): características anatômicas e fisiológicas**. 2006. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CAPELLADES, M.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosamultiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141-145, Jan. 1990.
- DÍAZ-PÉREZ, J. C.; SHACKEL, K. A.; SUTTER, E. G. Effect of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 3, p. 435-440, May 1995.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E.; LEE, K. Y. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 4, n. 1, p. 43-50, 1985.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4. 3**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA;DEX, 2000. Software.

GONÇALVEZ, J. C.; DIOGO, G.; COELHO, M. T. Changes in leaf morphology and anatomy of *in vitro*-cultured chestnut plantlets during acclimatization. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 520, p. 183-193, 2000.

GRIBAUDO, I.; MORTE, M. A.; SCHUBERT, A. Use of gentian violet to differentiate *in vitro* and *ex vitro*-formed roots during acclimatization of grapevine. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 41, n. 2, p. 187-188, May 1995.

GÜBBÜK, H.; PEKMEZCI, M. In Vitro Propagation of Some New Banana Types (*Musa* spp.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, 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.

JOHANSEN, B. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523 p.

KHAN, P. S. S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. 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.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine') **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Dordrecht, v. 55, n. 2, p. 141-14, 1999.

KÖPPEN, W. **Climatología**: con un estudio de los climas de la tierra. Mexico: Fondo de Cultura Economica, 1948. 478 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia**

vegetal. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.

LABOURIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADOLABOURIAU, M. L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 237-257, jun. 1961.

LAMBERS, H.; H. POORTER. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. **Advances in Ecological Research**, New York, v. 23, p. 187-261, 1992.

LEE, H.; WETZSTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. **Plant Physiology**, Maryland, v. 78, n. 3, p. 637-641, 1985.

LEE, N.; WESZTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro*-and *in vivo* developed sweetgum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 1, p. 167-171, Jan. 1988.

LEE, D. W. et al. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast asian *Hopea* (Dipeterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 87, n. 4, p. 447-455, Apr. 2000.

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, p. 139-142, 2003.

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

PEREIRA, R. de C. A. **Anatomia foliar comparada de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. e *Uncaria tomentosa* (Willdenow Ex Roemerr & Schultes) como subsídio ao estudo de micropropagação *in vitro*.** 2004. 133 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation technology and applications.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 71-93.

ROCHA, H. S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira “Prata Añã”: alterações morfoanatômicas.** 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ROHR, R.; ILIEV, I.; SCALTSOYIANNES, A.; TSOULPHA, P.
Acclimatization of micropropagated forest trees. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 616, p. 59-69, 2003.

ROMANO, A.; MARTINS-LOUÇÃO, M. A. Water Loss and Morphological Modifications in Leaves during Acclimatization of Cork Oak Micropropagated Plantlets. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 616, p. 439-442, 2003.

SANDOVAL, J. A.; MÜLLER, L. E.; WEBERLING, F. Foliar morphology and anatomy of *Musa* cv. Grande Naine (AAA) plants grown *in vitro* and during hardening as compared to field-grown plants. **Fruits**, Paris, v. 49, n. 1, p. 37-46, Jan./Feb. 1994.

SANTAMARIA, J. M.; KERSTIENS, G. The lack of control of water loss in micropropagated plants is not related to poor cuticle development. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 91, n. 2, p. 191-195, June 1994.

SCHLUTER, U.; MUSCHAK, M.; BERGER, D.; ALTMAM, T. 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.

SMITH, W. K.; VOGELMANN, T. C.; DELUCIA, E. H.; BELL, D. T.; SHEPHERD, K. A. Leaf form and photosynthesis. **BioScience**, Washington, v. 47, n. 11, p. 785-793, Dec. 1997.

SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd subsp. Affins (DC.) T. D. Penn. J.** 2003. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 69, n. 10, p. 1579-1586, Oct. 1982.