

Anatomia foliar comparada de seis espécies de anonáceas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação.

Lenaldo Muniz de Oliveira¹; José Raniere Ferreira de Santana¹; Flávia Dionísio Pereira¹; Renato Paiva²; Rodrigo Kelson Silva Resende²; Evaristo Mauro de Castro²

¹Universidade Estadual de Feira de Santana, DCBIO, Campus universitário, km 03, Br 116, CEP 44031-460, Feira de Santana-BA, Brasil, Tel. (75) 3625 2300, lenaldo@uefs.br; raniere@uefs.br, flavia1808@hotmail.com;²Universidade Federal de Lavras, DBI, Cx. P. 37, CEP 37200-000, Lavras-MG, Brasil, Tel. (35) 3829 1367, renpaiva@ufla.br, rkelsonsr@yahoo.com.br, emcastro@ufla.br.

INTRODUÇÃO

A família *Annonaceae* é composta por 132 gêneros e cerca de 2.300 espécies, sendo a maioria encontrada ainda em estado silvestre. Nessa família muitas espécies são bastante promissoras, com grande potencial frutífero e medicinal. Contudo, a inserção dessas espécies em cultivos comerciais ou até mesmo sua utilização na recomposição de áreas degradadas tem sido limitada pela dificuldade de obtenção de mudas sadias e em grandes quantidades, devido à presença de dormência embrionária ou tegumentar de suas sementes e também pela dificuldade para propagação por via vegetativa, em virtude da falta de porta-enxertos compatíveis e do acúmulo de diversos tipos de vírus.

Nesse contexto, a propagação clonal, via cultivo *in vitro*, representa uma alternativa viável para multiplicação de anonáceas (Lemos e Blake, 1996; Nagori & Purohit, 2004), possibilitando a produção de grande número de plantas, com grande uniformidade e em curto espaço de tempo. Entretanto, a alta mortalidade de plantas durante a transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, em consequência de desordens anatômicas, morfológicas e fisiológicas no nível de células, tecidos e órgãos tem criado obstáculos para o uso dessa técnica na propagação de anonáceas (Rasai et al., 1995).

Essas desordens são consequências da alta umidade relativa dentro dos recipientes de cultivo, do baixo nível de irradiância nas salas de crescimento e altos níveis de reguladores de crescimento e sacarose no meio de cultivo (Majada et al., 2000). Diversas alterações na estrutura da folha de plantas mantidas *in vitro* têm sido reportadas, como o aumento no tamanho e densidade estomática (Hazarika, 2006), reduzido controle estomático (Khan et al., 2003), redução na quantidade de cera epicuticular (Pospíšilová et al., 1999) e reduzida espessura e diferenciação do mesofilo das folhas, com alta proporção de espaços intercelulares (Hazarika, 2006). Contudo, a intensidade dessas alterações é bastante variável em função da plasticidade adaptativa de cada espécie e sua quantificação é essencial para otimização das condições de cultivo para cada tipo de planta.

Assim, o objetivo desse trabalho foi quantificar as alterações nos estômatos e tecidos foliares de seis espécies de anonáceas, comparando-se plantas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas mantidas em casa de vegetação sob radiação fotossintética ativa de $150\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura ambiente das espécies *Annona glabra* L., *Annona cauliflora* Mart., *Annona coriacea* Mart., *Annona bahiensis* St.Hill., *Annona squamosa* L. e *Rollinia silvatica* St. Hill. foram utilizadas para condução desse trabalho. Segmentos nodais com 1,0cm de comprimento foram lavados com água e detergente neutro e imersos em álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos, sendo inoculados em meio WPM, solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com 3% de sacarose, $8,87\mu\text{M}$ de BAP e 250mg L^{-1} de benomyl. O ambiente na sala de crescimento foi mantido na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $45\text{-}56\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Após 60 dias de cultivo *in vitro* coletaram-se folhas completamente expandidas para análises anatômicas. Estas foram fixadas em FAA 70% (Formaldeído - ácido acético glacial - álcool etílico 70%) por 72 horas e conservados em álcool etílico 70°GL. As seções transversais foram clarificadas com hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada, coradas com azul de astra e safranina e montadas em glicerina 50%, quantificando-se a espessura da epiderme adaxial, parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e epiderme abaxial com auxílio de uma ocular micrométrica acoplada em microscópio de luz. Foram avaliadas cinco folhas oriundas de cinco brotações diferentes.

As lâminas com seções paradérmicas foram obtidas à mão livre e montadas com solução corante de safranina 1% em água glicerinada, quantificando-se a densidade e índice estomático, o diâmetro polar (DP) e equatorial (DE) dos estômatos e a relação entre os diâmetros polar e equatorial dos estômatos (DP/DE). A contagem do número de estômatos foi realizada com o auxílio de uma câmara clara em microscópio OLYMPUS CBB e o cálculo do índice estomático (IE) foi realizado por meio da fórmula de Cutter (1986). Foram avaliadas quatro folhas oriundas de quatro brotações diferentes, quantificando-se quatro campos do terço mediano de cada folha.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 6 (tipo de cultivo x espécies). Na análise estatística utilizou-se o programa SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999), comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. coriacea apresentou a menor plasticidade adaptativa ao cultivo *in vitro*, quanto à densidade estomática, índice estomático, diâmetro polar e equatorial dos estômatos (Tabela 1). Por outro lado, *A. bahiensis*, *A. glabra*, *A. squamosa* e *R. silvatica* apresentaram grande variação na densidade estomática, sendo significativamente maior nas plantas cultivadas *in vitro*. *A. bahiensis* foi à espécie mais afetada em relação à densidade estomática. O aumento na densidade estomática nas folhas das plantas cultivadas *in vitro*, comparado às folhas de plantas mantidas em casa de vegetação tem sido reportado em diversas espécies, estando associado, principalmente, à elevada umidade relativa no interior dos recipientes de cultivo (Khan et al., 2003).

A. bahiensis, *A. cauliflora*, *A. glabra* e *A. squamosa* demonstraram maior susceptibilidade a alterações estomáticas durante o cultivo *in vitro*, apresentando estômatos com menor diâmetro polar e menor relação entre o diâmetro polar e o diâmetro equatorial, tornando-os mais esféricos. O aumento na densidade estomática e na forma dos estômatos, com tendência a formas mais esféricas, sobretudo nas espécies *A. bahiensis*, *A. glabra*, *A. squamosa* e *R. silvatica* poderá afetar o potencial de perda de água das plantas durante sua transferência do ambiente *in vitro* para o ambiente natural. Segundo Khan et al. (2003), alterações na forma dos estômatos afeta diretamente a funcionalidade dos mesmos, sendo que a forma mais elíptica é característica de estômatos funcionais, enquanto que formas mais arredondadas é, frequentemente, associado a estômatos com baixa funcionalidade.

A condição *in vitro* afetou também a espessura dos tecidos foliares, principalmente a espessura das epidermes adaxial e abaxial (Tabela 2), sendo que praticamente todas as espécies estudadas apresentaram redução na espessura desses tecidos. Decetti (2004), trabalhando com níveis de irradiância durante o cultivo *in vitro* de *A. glabra*, verificou que a espessura da epiderme adaxial era o principal tecido afetado por níveis baixos de irradiância. *A. squamosa* apresentou a menor espessura da epiderme adaxial e abaxial e do parênquima paliçádico e esponjoso. Contudo, mesmo entre as plantas mantidas em casa de vegetação, essa espécie apresentou menor espessura nesses tecidos, demonstrando ser uma característica típica da própria espécie. Contrariamente, *A. cauliflora*, *A. glabra* e *R. silvatica* demonstraram maior plasticidade adaptativa à condição *in vitro*, expressando maior espessura da epiderme adaxial, abaxial e parênquima esponjoso. *A. cauliflora* e *A. glabra* apresentaram ainda maior espessura do parênquima paliçádico.

A capacidade de alterar a estrutura da folha em resposta ao tipo de ambiente, principalmente a condições de baixo nível de irradiância, tem sido comumente observada

em diversas espécies (Dimassi-Theriou & Basabalidis, 1997). Segundo Araus et al. (1986), alterações na espessura e diferenciação do mesofilo, sobretudo na proporção de espaços intercelulares, apresentam alta correlação com o potencial fotossintético das plantas e, para Chenevard et al. (1997), a reduzida capacidade fotossintética das plantas mantidas *in vitro* é um dos fatores que limitam a sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização à condição *ex vitro*.

Tabela 1 Densidade estomática, índice estomático, diâmetro equatorial dos estômatos (DE), diâmetro polar dos estômatos (DP) e relação DP/DE em folhas de *A. bahiensis*, *A. cauliflora*, *A. coriaceae*, *A. glabra*, *A. squamosa* e *R. silvatica* cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação (*ex vitro*).

Espécie	Tipo de cultivo	
	<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>
	Densidade estomática*	
<i>Annona bahiensis</i>	165,76 aB	440,30 aA
<i>Annona cauliflora</i>	187,56 aA	185,00 bA
<i>Annona coriaceae</i>	101,38 bA	101,34 cA
<i>Annona glabra</i>	168,68 aB	216,82 bA
<i>Annona squamosa</i>	111,00 bB	187,96 bA
<i>Rolinia silvatica</i>	96,96 bB	233,82 bA
	Índice estomático*	
<i>Annona bahiensis</i>	18,72 bA	20,62 bA
<i>Annona cauliflora</i>	24,14 aA	18,42 bB
<i>Annona coriaceae</i>	19,42 bA	19,42 bA
<i>Annona glabra</i>	20,20 bB	28,50 aA
<i>Annona squamosa</i>	17,68 bA	19,68 bA
<i>Rolinia silvatica</i>	10,28 cB	14,10 cA
	Diâmetro polar – DP (μm)*	
<i>Annona bahiensis</i>	36,18 bA	31,62 bcB
<i>Annona cauliflora</i>	33,78 bA	30,04 cB
<i>Annona coriaceae</i>	44,18 aA	43,58 aA
<i>Annona glabra</i>	36,68 bA	33,88 bB
<i>Annona squamosa</i>	37,20 bA	31,28 bcB
<i>Rolinia silvatica</i>	29,60 cA	28,98 cA
	Diâmetro equatorial – DE (μm)*	
<i>Annona bahiensis</i>	17,86 bB	20,40 bA
<i>Annona cauliflora</i>	16,26 bcA	18,70 bA
<i>Annona coriaceae</i>	22,84 aA	23,02 aA
<i>Annona glabra</i>	16,04 cA	16,82 cA
<i>Annona squamosa</i>	17,44 bcB	22,62 aA
<i>Rolinia silvatica</i>	13,94 dB	16,50 cA
	Relação DP/DE*	
<i>Annona bahiensis</i>	2,02 bcA	1,54 cdB
<i>Annona cauliflora</i>	2,08 abcA	1,59 cdB
<i>Annona coriaceae</i>	1,89 cA	1,89 abA
<i>Annona glabra</i>	2,28 aA	2,02 aB
<i>Annona squamosa</i>	2,13 abA	1,38 dB
<i>Rolinia silvatica</i>	2,12 abA	1,75 bcB

*As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas em cada coluna e maiúsculas em cada linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2 Espessura de epiderme adaxial, parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e epiderme abaxial de folhas de *A. bahiensis*, *A. cauliflora*, *A. coriaceae*, *A. glabra*, *A. squamosa* e *R. silvatica* cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação (*ex vitro*).

Espécie	Tipo de cultivo	
	<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>
	Epiderme adaxial (μm)*	
<i>Annona bahiensis</i>	33,17 c ^z A ^y	21,84 bB
<i>Annona cauliflora</i>	40,95 bA	26,11 abB
<i>Annona coriaceae</i>	62,40 a	-
<i>Annona glabra</i>	43,15 bA	25,44 abB
<i>Annona squamosa</i>	20,87 eA	15,44 cB
<i>Rolinia silvatica</i>	28,27 dA	28,02 aA
	Parênquima paliçádico (μm)*	
<i>Annona bahiensis</i>	36,50 dA	34,40 bA
<i>Annona cauliflora</i>	74,75 bA	37,20 abB
<i>Annona coriaceae</i>	87,65 a	-
<i>Annona glabra</i>	48,07 cA	40,32 aB
<i>Annona squamosa</i>	17,72 eB	24,56 cA
<i>Rolinia silvatica</i>	46,00 cA	33,27 bA
	Parênquima esponjoso (μm)*	
<i>Annona bahiensis</i>	78,42 bA	77,28 bA
<i>Annona cauliflora</i>	144,82 aA	96,72 aB
<i>Annona coriaceae</i>	141,90 a	-
<i>Annona glabra</i>	91,15 bA	82,71 abA
<i>Annona squamosa</i>	34,75 dA	26,16 cA
<i>Rolinia silvatica</i>	58,07 cB	90,24 abA
	Epiderme abaxial (μm)*	
<i>Annona bahiensis</i>	23,82 cA	17,60 abB
<i>Annona cauliflora</i>	33,72 bA	16,51 abB
<i>Annona coriaceae</i>	46,22 a	-
<i>Annona glabra</i>	25,27 cA	20,06 aB
<i>Annona squamosa</i>	17,42 dA	13,52 bB
<i>Rolinia silvatica</i>	26,02 cA	17,89 aB

*As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas em cada coluna e maiúsculas em cada linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Diante da grande variação nos parâmetros avaliados nas diferentes espécies de anonáceas estudadas nesse trabalho, verifica-se a necessidade de estudos mais detalhados sobre as condições de cultivo *in vitro* para cada espécie, sobretudo em relação ao nível de irradiância a ser utilizado, buscando-se uma redução na intensidade das alterações anatômicas e, conseqüentemente, elevação das taxas de sobrevivência das plantas obtidas.

CONCLUSÕES

O cultivo *in vitro* aumenta a densidade estomática e modifica o diâmetro e a forma dos estômatos de anonáceas, sendo as espécies *A. bahiensis*, *A. glabra*, *A. squamosa* e *R. silvatica* as mais susceptíveis. O ambiente *in vitro* reduz indistintamente a espessura das epidermes adaxial e abaxial de anonáceas. Existe grande variabilidade nas respostas adaptativas das espécies estudadas em relação ao cultivo *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUS, J. L.; ALEGRE, L.; TAPIA, L.; CALAFELL, R.; SERRET, M. D. Relationships between photosynthetic capacity and leaf structure in several shade plants. **American Journal of Botany**, Stanford, v. 73, n. 12, p. 1760-1770, Dec. 1986.
- CHENEVAR, D.; FROSSARD, J. S.; ALLEMAND, C. J. Carbohydrate reserves and CO₂ balance of hybrid walnut (*Juglans nigra* no. 23 x *juglans regia*) plantlets during acclimatization. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.68, p.207-217, 1997.
- CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**. 2. ed. São Paulo: Ed. Roca, 1986. 304 p.
- DECCEITI, S. F. C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L.** 2004. 93p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A. M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation in Kiwifruit cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, p. 127-134, 1997.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3 – Sistema de análises estatísticas**. Lavras, 1999.
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v.108, p.105–120. 2006.
- KHAN, S. V. et al. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, v.46, n.2, p.161-166, 2003.
- LEMONS, E. E. P.; BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 3, p. 395-403, 1996.
- MAJADA, J.P.; TADEO, F.; FAL, M.A.; TAMÉS-SÁNCHEZ, R. Impact of cultured vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.63, p.207-214, 2000.
- NAGORI, R.; PUROHIT, S. D. *In vitro* plantlet regeneration in *Annona squamosa* L. through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 89-98, Jan. 2004.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLEČEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v.42, n.4, p.481-497, 1999.
- RASSAI, S.; GEORGE, A. P.; KANTHARAJAH, A. S. Tissue culture of *Annona* spp. (Cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.62, p.1-14, 1995.
- PALAVRAS-CHAVE: *Annonaceae*, *in vitro*, desordens anatômicas, estômatos.