

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

Leaf anatomy of six species of Annonacea cultivated *in vitro* and greenhouse

José Raniere Ferreira de Santana^{I*} Lenaldo Muniz de Oliveira^I Renato Paiva^{II}
Rodrigo Kelson Silva Resende^{II} Evaristo Mauro Castro^{II} Flávia Dionísio Pereira^I

- NOTA -

RESUMO

A micropropagação de anonáceas poderá contribuir para a obtenção de plantios mais homogêneos e a inserção de novas espécies em sistemas produtivos. Entretanto, plantas cultivadas *in vitro* frequentemente exibem alterações anatômicas e sua quantificação poderá auxiliar na obtenção de protocolos de cultivo mais eficientes. Realizou-se neste trabalho o estudo comparativo da anatomia foliar de seis espécies de anonáceas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação. *Annona coriacea* foi a única espécie que não apresentou variação na densidade e na dimensão dos estômatos quando cultivada *in vitro*, enquanto que, *Annona bahiensis*, *Annona glabra*, *Annona squamosa* e *Rolinia silvatica* apresentaram aumento na densidade estomática e na redução na espessura das epidermes foliares nesse tipo de cultivo.

Palavras-chave: Annonaceae, micropropagação, desordens anatômicas, estômatos.

ABSTRACT

Micropropagation of Annonaceae can produce homogeneous plants and bring new species into commercial production. Plants cultivated *in vitro*, however, frequently demonstrate anatomical alterations, and the quantification of these changes should aid in determining more efficient culture protocols. The present work undertook a comparative study of the leaf anatomy of six species of Annonaceae cultivated *in vitro* and in greenhouses. *Annona coriacea* was the only species that did not show variations in the density or the dimensions of their stomata when cultivated *in vitro*, while *Annona bahiensis*, *Annona glabra*, *Annona squamosa*, and *Rolinia silvatica* demonstrated increases in leaf stomatal density and a reduction of the leaf epidermis under these conditions.

Key words: Annonaceae, micropropagation, anatomical abnormalities, stomata.

A família *Annonaceae* é composta por 120 gêneros e aproximadamente 2.000 espécies, sendo a maioria encontrada ainda em estado silvestre (FECHINE et al., 2002). Nessa família, muitas espécies são bastante promissoras, com grande potencial frutífero e medicinal. Contudo, a inserção de algumas espécies em cultivos comerciais ou até mesmo a recomposição de áreas degradadas tem sido limitada pela dificuldade de obtenção de mudas saudáveis e em grandes quantidades (HOFFMANN et al., 1996). Nesse contexto, a propagação clonal, via cultivo *in vitro*, representa uma alternativa viável para multiplicação de anonáceas (NAGORI & PUROHIT, 2004). Entretanto, a alta mortalidade de plantas durante a transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, em consequência de desordens anatômicas, tem criado obstáculos para o uso generalizado dessa técnica em plantas (BARBOZA et al., 2006).

Diversas alterações na estrutura da folha de plantas mantidas *in vitro* têm sido reportadas, como o aumento no tamanho na e densidade dos estômatos e a redução no controle estomático, na quantidade de cera epicuticular e na espessura do mesofilo, com alta proporção de espaços intercelulares (KHAN et al., 2003;

^IDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, BA, Brasil. *Endereço para correspondência: Rua Ouro Vermelho, s/n, condomínio Vila Borghesi, casa 11, Bairro Santa Mônica II, 44040-740, Feira de Santana, BA, Brasil. E-mail: raniere@uefs.br. *Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil.

HAZARIKA, 2006). Entretanto, a intensidade dessas alterações é bastante variável em função de características próprias de cada espécie e sua quantificação poderá auxiliar na melhoria das condições de cultivo para cada grupo de plantas. Neste trabalho são apresentados os resultados obtidos com seis espécies de anonáceas comparando-se a anatomia foliar de plantas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação.

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 aproximadamente 1,0cm de comprimento foram mantidos em água corrente por 20 minutos e lavados com detergente neutro e, em câmara de fluxo laminar, foram imersos em álcool 70% (v/v) por um minuto e hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 15 minutos e, finalmente, foram lavados em água destilada e autoclavada por cinco vezes. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150mm) contendo 10mL de meio WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com 3% de sacarose, $8,87\mu\text{M}$ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 250mg L^{-1} de benomyl. O ambiente na sala de crescimento foi mantido à temperatura de $25\pm 3^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $45\text{--}55\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Para análise anatômica, folhas completamente expandidas foram coletadas de plantas com três anos de idade, mantidas em casa de vegetação, e foram coletadas folhas de plantas com 60 dias de cultivo *in vitro*. Estas foram fixadas em FAA 70% (Formaldeído - ácido acético glacial - álcool etílico 70%) por 72 horas e foram conservadas em álcool etílico 70%GL. As seções transversais, obtidas com o auxílio de um micrótomo manual, 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. As lâminas com seções paradérmicas das faces abaxial e adaxial das folhas, obtidas à mão livre, foram montadas com solução corante de safranina 1% em água glicerinada, quantificando-se a densidade e o 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 cinco folhas oriundas de cinco brotações diferentes, quantificando-se quatro seções do terço mediano de cada folha. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 6 (ambiente x espécies). Para a análise estatística, utilizou-se o programa SISVAR 4.6 (FERREIRA, 2004), comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Entre as espécies estudadas, *A. coriacea* foi a única que não apresentou alterações na densidade estomática, no índice estomático e no diâmetro polar e equatorial dos estômatos durante o cultivo *in vitro* (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* (Tabela 1). Já *A. bahiensis*, *A. cauliflora*, *A. glabra* e *A. squamosa*, apresentaram durante o cultivo *in vitro* estômatos com menor diâmetro polar e menor relação entre o diâmetro polar e o diâmetro equatorial, tornando-os mais esféricos, quando comparados com plantas cultivadas em casa de vegetação. 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 a forma mais esférica é, freqüentemente, associada a estômatos com baixa funcionalidade.

O aumento na densidade estomática nas folhas das plantas cultivadas *in vitro*, comparado à folhas de plantas mantidas em ambiente natural, tem sido reportado em diversas espécies, estando associado, principalmente, à elevada umidade relativa no interior dos recipientes de cultivo e à reduzida intensidade de luz (KHAN et al., 2003). Para HAZARIKA (2006), a baixa intensidade de luz usada durante o cultivo *in vitro*, aliada ao acúmulo de etileno e à elevada concentração de sacarose no meio de cultura, é um dos principais responsáveis pela elevação na densidade de estômatos acompanhada da reduzida capacidade de fechamento dos ostíolos. Para esse autor, o reduzido controle estomático e a alta freqüência de estômatos têm sido consideradas as principais causas da rápida dissecação das plantas durante a fase de aclimatização.

A condição *in vitro* também afetou a espessura dos tecidos foliares, principalmente das epidermes adaxial e abaxial (Tabela 2), com redução em praticamente todas as espécies estudadas. Contudo, comparando-se as espécies durante o cultivo *in vitro* apenas, verifica-se que *A. cauliflora*, *A. glabra* e *R. silvatica* apresentaram maior espessura da epiderme adaxial, abaxial e parênquima esponjoso, enquanto que

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

| Espécie | -----Tipo de cultivo----- | | | |
|--|---------------------------------|------|--------------------|-----|
| | -----Ex vitro----- | | -----In vitro----- | |
| | -----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 não seguidas pelas mesmas letras minúsculas em cada coluna e maiúsculas em cada linha diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A. squamosa apresentou a menor espessura da epiderme adaxial e abaxial e do parênquima paliádico e esponjoso. O aumento na espessura dos parênquimas, sobretudo do parênquima esponjoso, com maior proporção de espaços intercelulares, tem sido relacionado a uma maior capacidade fotossintética das plantas (TOMA et al., 2004), o que poderá aumentar a taxa de sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização. Entretanto, essa maior proporção de espaços poderá contribuir para o início do processo

de hiper-hidricidade em plantas mantidas *in vitro* (PICOLI et al., 2001).

Em síntese, verifica-se que a densidade estomática, a forma dos estômatos e a espessura das epidermes são as características mais afetadas durante o cultivo *in vitro* de anonáceas. *A. bahiensis*, *A. glabra*, *A. squamosa* e *R. silvatica* são, entre as espécies estudadas, as mais susceptíveis a alterações na anatomia foliar durante o cultivo *in vitro*.

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

| Espécie | -----Tipo de cultivo----- | | | |
|---------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------|-----|
| | -----Ex vitro----- | | -----In vitro----- | |
| | -----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 não seguidas pelas mesmas letras minúsculas em cada coluna e maiúsculas em cada linha diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

REFERÊNCIAS

- BARBOZA, S.B.S.C. et al. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.185-194, 2006.
- CUTTER, E.G. **Anatomia vegetal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 1986. 304p.
- FECHINE, I. M. et al. Alcalóides de *Duguetia trunciflora* Maas (*Annonaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.12, p.17-19, 2002.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR - versão 4.6**. Lavras: DEX/UFLA, 2004. 32p.
- HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.108, p.105-120, 2006.
- HOFFMANN, A. et al. **Fruticultura comercial**: propagação de plantas frutíferas. Lavras: UFLA/FAEPE, 1996. 319p.
- KHAN, S.V. et al. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v.46, n.2, p.161-166, 2003.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v.30, p.421-427, 1980.
- 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, 2004.
- PICOLI, E.A.T. et al. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). **Plant Science**, Clare, v.160, p.857-868, 2001.
- TOMA, I. et al. Histo-anatomy and *in vitro* morphogenesis in *Hyssopus officinalis* L. **Acta Botanica Croatica**, Zagreb, v.63, n.1, p.59-68, 2004.