

Anatomia foliar de ipê-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.) – Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro* e *in vitro*

Leticia Caravita Abbade*, **Patrícia Duarte de Oliveira Paiva**, **Renato Paiva**, **Evaristo Mauro de Castro**, **Agda Rabelo Centofante** e **Cynthia de Oliveira**

*Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. *Autor para correspondência.*
E-mail: leticiabbade@yahoo.com.br

RESUMO. Este estudo teve como objetivo comparar a estrutura interna de folhas de ipê-branco cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. Para as avaliações anatômicas foram utilizadas folhas do primeiro nó de ramos, da base para o ápice, com 30 dias de cultivo *in vitro* e de plantas de campo. O estudo anatômico foi feito por meio das secções transversais e paradérmicas das folhas. As folhas apresentam epiderme uniestratificada e mesofilo dorsiventral. São hipostomáticas e apresentam tricomas em todas as faces. Folhas de plantas cultivadas *ex vitro*, quando comparadas com *in vitro*, tiveram espessura do limbo foliar, nervura central da epiderme adaxial e abaxial e os parênquimas palicádico e esponjoso maiores. Em folhas oriundas do cultivo *in vitro*, a cutícula e o esclerênquima são ausentes. Folhas de plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram menor número de estômatos e maior número de tricomas, quando comparadas com o cultivo *in vitro*. Os estômatos de folhas cultivadas *in vitro* são maiores que os de folhas *ex vitro*.

Palavras-chave: anatomia, folhas, estômatos, nervura central, *in vitro*, *ex vitro*.

ABSTRACT. *Ex vitro and in vitro leaf anatomy of *Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand. – Bignoniaceae.* Considering the importance of knowledge of anatomical structures in the protocol definition for the micropropagation of the ipê-branco, this study compared the *in vitro* and *ex vitro* internal structure of leaves. For anatomical evaluations, the first leaf *in vitro* with 30 days of growth and adult plants were used. The anatomical study of leaves was based on microscope examination from cross-sectional and paradermic sections from the leaf blade. The leaf structures from plants *ex vitro* show uniseriate skin, and mesophyll with dorsiventral organization. They are hipostomatics and trichome is present in all faces. Leaves *ex vitro* was thicker than culture *in vitro* in limb, central nervure, epidermis and palisade and spongy parenchyma. In leaves *in vitro*, cuticle and sclerenchyma are absent. Leaves of *ex vitro* presented minor numbers of stomata and greater number of trichomes when compared with culture *in vitro*. Stomata of *in vitro* are larger than stomata *ex vitro*.

Key words: anatomy, leaves, stomata, central nervure, *in vitro*, *ex vitro*.

Introdução

Espécies lenhosas propagadas *in vitro* são frequentemente afetadas por vários fatores do meio de cultura, que podem ocasionar degeneração metabólica e morfológica. A compreensão apropriada da estrutura básica de uma planta ou órgão é essencial e indispensável para se chegar a um conhecimento adaptativo do vegetal (CASTRO, 2002). Diferentes condições ambientais influenciam diretamente a sua anatomia (LIMA, 2004). Alterações na morfologia foliar podem influenciar processos metabólicos e fisiológicos, associados, principalmente, à fotossíntese e transpiração. Muitas dessas evidências indicam que o estado da água e a fase gasosa durante os

vários estágios da cultura de tecidos são a chave dos fatores envolvidos na desorganização morfológica de plantas cultivadas *in vitro* (FIDELIS et al., 2000).

As desordens anatômicas são menos significativas em caule e raízes, porém sua manifestação nas folhas afeta os dois principais processos realizados por estas, isto é, a fotossíntese e as trocas gasosas (DEBERG; MAENE, 1984).

A anatomia foliar em plantas micropropagadas é de grande importância para estudos comparativos do desenvolvimento de seus tecidos e estruturas adaptativas, como espessura de cutícula, disposição de células, dimensão e número de estômatos, entre outros. Esses estudos podem servir de base para

pesquisas relacionadas ao desenvolvimento durante a aclimatização, a qual se caracteriza por uma elevada mortalidade, muitas vezes, inviabilizando a micropropagação de algumas espécies (MARTINOTTO, 2004).

De acordo com Preece e Compton (1991), a elevada umidade relativa e a baixa irradiação no ambiente *in vitro* são os principais fatores que atuam na indução de alterações e funcionalidade de órgãos e tecidos, levando-os à incapacidade de controlar as perdas de água quando submetidos a condições adversas, como a aclimatização.

As plantas crescidas *in vitro* podem apresentar características peculiares como: abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido e reduzida capacidade de sustentação (esclerênquima e colênquima), estômatos não-funcionais, baixa atividade autotrófica e outros tipos de desordens (CAMPOSTRINI; OTONI, 1996).

Em estudos histológicos de órgãos vegetativos de plantas propagadas *in vitro* foi verificado que eles apresentavam estruturas pouco diferenciadas se comparados com plantas cultivadas em casa-de-vegetação ou ambiente natural (FIDELIS et al., 2000; SANTOS, 2001; SOARES, 2003).

Considerando a importância do conhecimento da anatomia para a definição de um protocolo de micropropagação para o ipê-branco, este estudo teve como objetivo comparar a estrutura interna de folhas desta espécie, oriundas de plântulas cultivadas *ex vitro* e *in vitro*.

Material e métodos

Para as avaliações anatômicas, foram utilizadas folhas coletadas do primeiro nó de ramos, da base para o ápice, de plântulas mantidas *in vitro* e de uma árvore adulta de campo (*ex vitro*) localizada próximo à Portaria do *campus* da Universidade Federal de Lavras (UFLA), situada a 855 m de altitude, 21°13'51.91"S de latitude e 44°59'41.01"W GRW de longitude.

As folhas de plântulas cultivadas *in vitro* foram oriundas de sementes de ipê-branco inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 50% de concentração de sais, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 1 g L⁻¹ de GA₃ e 0,6 g L⁻¹ de ágar em tubo de ensaio, mantidas por 30 dias em sala de crescimento, em condições controladas de temperatura 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16h e irradiação de 35 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria.

Os materiais vegetais *ex vitro* e *in vitro* foram fixados em FAA (0,5% de formaldeído, 0,5% de ácido acético e 90% de álcool 70°GL) por 72h e,

posteriormente, conservados em álcool 70°GL. O estudo anatômico das folhas se baseou no exame microscópico de seções paradérmicas abaxiais e adaxiais e seções transversais do limbo foliar.

Para a avaliação dos tecidos foliares (espessura da nervura central, limbo foliar, epiderme adaxial e abaxial e dos parênquimas paliçádico e esponjoso), foram realizados cortes transversais na região mediana das folhas obtidos em micrótomo, clarificados em solução de hipoclorito de sódio (1%) por 10 min. e submetidos à coloração de azul de astra (95%)/safranina (5%), baseada na metodologia adaptada de Kraus e Arduin (1997). As lâminas foram montadas em glicerina 50%.

Para os estudos relativos à caracterização dos estômatos (número médio por mm², diâmetro polar e equatorial, densidade estomática e densidade dos tricomas), foram realizados cortes paradérmicos na região mediana das folhas, na epiderme das faces abaxial e adaxial, manualmente com auxílio de lâmina de aço, clarificados em solução de hipoclorito de sódio (1%), por 5 min., e submetidos à coloração de Azul de Toluidina. As lâminas foram montadas em glicerina 50%.

A partir das seções paradérmicas e transversais, com o auxílio de ocular micrométrica, foram efetuadas as medições. As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se microscópio Ken-a-Vision TT18 e câmera digital Canon PowerShot A620. O software de Medição utilizado foi o Sigma Pro.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, constituído de 24 repetições nos cortes transversais e 48 repetições nos cortes paradérmicos, correspondentes a três folhas oriundas de ipê-branco. Os tratamentos foram representados por duas condições de cultivo (*ex vitro* e *in vitro*). Após a análise de variância, utilizou-se o teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, para a comparação das médias entre tratamentos.

Resultados e discussão

Foram observadas diferenças anatômicas entre os tecidos de folhas provenientes do cultivo *in vitro* e *ex vitro*. Essas diferenças também foram observadas por diversos autores que compararam as anatomias de folhas *in vitro* e *ex vitro* de outras espécies, como mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii*) (FIDELIS et al., 2000), ingá (*Inga vera*) (SOARES, 2003), *Annona glabra* (DECETTI, 2004), sangra d'água (*Croton urucurana*) (LIMA, 2004), candeia (*Eremanthus erythropappus*) (ROSAL, 2004), cagaita (*Eugenia dysenterica*) (MARTINOTTO, 2004), abacaxi (BARBOSA et al., 2006), entre outras.

As folhas de ipê-branco, cultivadas tanto *in vitro* como *ex vitro*, apresentaram organização dorsiventral. Esses resultados condizem com os de Metcalfe e Chalk (1957), em que todas as espécies de Bignoniaceae são dorsiventrais, sendo registrada estrutura isobilateral apenas no gênero *Kigelia*. Por outro lado, Souza e Oliveira (2004), estudando *Tabebuia avellaneda* e *T. chrysotricha*, encontraram dorsiventralidade apenas nos eófilos e isobilateralidade nos metafilos.

Seções transversais das lâminas foliares de todos os ambientes de cultivo demonstraram que tanto a epiderme da face adaxial quanto a epiderme da face abaxial apresentam-se uniestrafificadas. O parênquima paliçádico está voltado para a superfície adaxial e o parênquima esponjoso voltado para a superfície abaxial. Ocorre maior desenvolvimento de todas as folhas *ex vitro* e o parênquima paliçádico é pouco diferenciado. Nas folhas provenientes do cultivo *in vitro*, não se observou a presença de cutícula nas faces adaxial e abaxial, conforme se visualiza na Figura 1. Segundo Frágua (2003), a ausência de formação de ceras epicuticulares, aliada à alteração na composição química delas, é uma das características que possivelmente pode ser induzida pela condição *in vitro*, contribuindo para a dessecção das mudas após transferência para a casa-de-vegetação, causada pela excessiva perda de água.

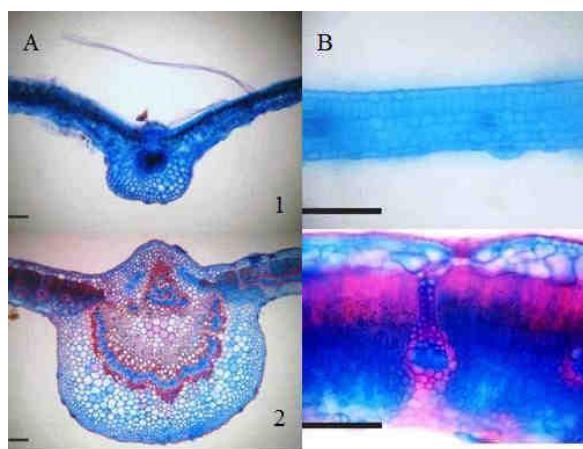


Figura 1. Fotomicrografias de seções transversais de folhas de ipê-branco cultivadas *in vitro* (1) e *ex vitro* (2), nervura central 10X (coluna A) e limbo foliar 40X (coluna B).

Uma das diferenças verificadas entre a região vascular da nervura central das folhas produzidas *in vitro* e *ex vitro* é o esclerênquima. Observa-se que fibras diferenciam-se sobre o floema nos feixes vasculares das folhas *ex vitro* e estão ausentes no cultivo *in vitro*. O esclerênquima é um tecido que fica próximo ao eixo vascular, responsável por dar maior sustentação às plantas. Soares (2003) também

observou essa característica ao comparar folhas de ingá (*Inga vera*) *in vitro* e *ex vitro* e afirma que a ausência dessa estrutura em folhas micropropagadas as torna menos resistentes e com aparência mais frágil.

As folhas de ipê-branco são hipostomáticas e apresentam tricomas estrelados em ambas as faces (Figura 2). Souza e Oliveira (2004) também encontraram estômatos somente na face abaxial nas espécies de *Tabebuia avellaneda* e *T. chrysotricha*. Tricomas tectores também são encontrados em *T. avellaneda*, apresentando-se com tamanho reduzido, extremidade afilada e são unicelulares. Em *T. chrysotricha*, os tricomas tectores são pluricelulares, alongados e ramificados (SOUZA; OLIVEIRA, 2004).

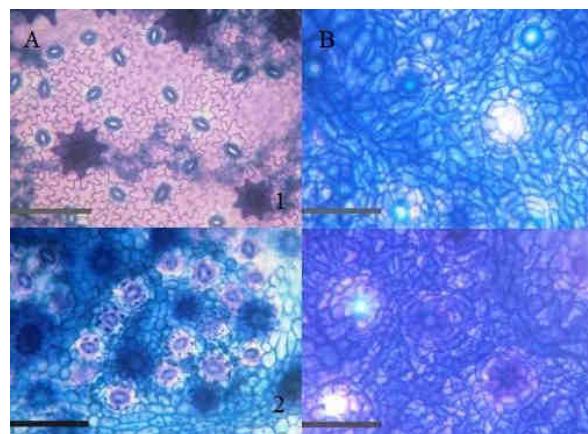


Figura 2. Fotomicrografias de seções paradérmicas de folhas de ipê-branco cultivadas *in vitro* (1) e *ex vitro* (2), da epiderme abaxial (A) e da epiderme adaxial (B).

As folhas *ex vitro*, provindas de plantas de campo, tiveram espessuras superiores às do cultivo *in vitro* quanto à espessura do limbo foliar, da nervura central, da epiderme adaxial e abaxial e dos parênquimas paliçádico e esponjoso (Tabela 1).

Tabela 1. Espessura média do limbo foliar e da nervura central de lâminas foliares de ipê-branco cultivado *ex vitro* e *in vitro* por 30 dias.

Tipo de Cultivo	Espessura (μm)	
	Limbo Foliar	Nervura Central
<i>Ex vitro</i>	177,44 a	951,55 a
<i>In vitro</i>	84,95 b	360,21 b

*Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

Trabalhos com cortes histológicos da nervura de folhas obtidas *in vitro* e *ex vitro* de cafeiro (SANTOS, 2001) e ingá (*Inga vera*) (SOARES, 2003) obtiveram resultados bastante semelhantes, com aumento do número de células do xilema em largura e espessura, em plantas oriundas do ambiente natural.

Plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram espessuras superiores às do cultivo *in vitro* em todos os tecidos. Resultados semelhantes também foram encontrados por Fidelis et al. (2000), Lima (2004) e Martinotto (2004) trabalhando, respectivamente, com mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii*), sangra d'água (*Croton urucurana*) e cagaita (*Eugenia dysenterica*), cultivadas em ambiente natural e *in vitro*.

No ambiente natural, a alta intensidade luminosa contribui para o espessamento foliar e a elongação do parênquima paliçádico (CASTRO, 2002). Folhas de plantas crescidas em ambientes ensolarados apresentam taxa fotossintética mais elevada e são menores, mais pesadas e mais espessas por unidade de área, em comparação com plantas crescidas à sombra (BOARDMAN, 1977; BJORKMAN, 1981). O aumento na espessura da folha, especialmente pelo alongamento ou adição de células paliçádicas, está relacionado à redução na resistência do mesofilo ao dióxido de carbono (NOBEL, 1977) e correlacionado com aumento de fatores potencialmente limitantes à fotossíntese, como a RuBisco, carregadores de elétrons ou condutância estomatal (BJORKMAN, 1981). Chazdon e Kaufman (1993), estudando duas espécies de *Piper*, observaram que a capacidade fotossintética estava correlacionada com a espessura do mesofilo.

Plantas mantidas *ex vitro* apresentaram menor número de estômatos e maior número de tricomas. O maior número de estômatos observados em plântulas cultivadas *in vitro*, provavelmente, foi provocado pelo ambiente do tubo, com alta umidade e temperatura amena. Esses resultados concordam com Martinotto (2004) que observou, em seu estudo com *E. dysenterica*, que a densidade estomática é maior em folhas de plântulas *in vitro* do que em folhas de campo. As condições ambientais que influenciam as trocas gasosas provocam alterações no desenvolvimento estomático; segundo Frágua (2003), a baixa luminosidade e a pequena troca gasosa do ambiente *in vitro* provocam aumento no número de estômatos, pois estes são menos funcionais que os estômatos *ex vitro*.

A densidade estomática das folhas de ipê-branco *in vitro* e *ex vitro* difere estatisticamente. No cultivo *in vitro*, onde a umidade era alta, ocorreu maior número de estômatos por área. Isso se deve ao fato de os estômatos serem os responsáveis pelas perdas de água nas plantas, diminuindo sua densidade nas plantas de ambiente natural, onde menor quantidade de estômatos diminui a perda de água e possibilita a sobrevivência em condições de estresse hídrico. O maior número de tricomas nas folhas *ex vitro* também contribui para diminuir o excesso de transpiração. Os estômatos de

folhas cultivadas *in vitro* são maiores em comparação com os estômatos de folhas *ex vitro*.

Conclusão

Folhas de plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram cutícula e esclerênquima que são ausentes nas folhas *in vitro*. Em comparação com as do cultivo *in vitro*, folhas *ex vitro* também apresentaram maior espessura quanto ao limbo foliar, à nervura central, à epiderme adaxial e abaxial e aos parênquimas paliçádico e esponjoso, além de menor número de estômatos e maior número de tricomas. Os estômatos de folhas cultivadas *in vitro* são maiores que os estômatos de folhas *ex vitro*.

Referências

- BARBOSA, S. B. S. C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; PORTES, T. A.; SOUZA, L. A. C. Anatomia foliar de plantas micropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 185-194, 2006.
- BJORKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O. L.; NOBEL P. S.; OSMOND C. B.; ZIEGLER, H. (Ed.). **Physiological plant ecology I: responses to physical environment**. Berlin: Springer-Verlag, 1981. p. 57-107.
- BOARDMAN, N. K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 28, p. 355-377, 1977.
- CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. Aclimatização de plantas: abordagens recentes. **ABCTP Notícias**, v. 25, p. 1-5, 1996.
- CASTRO, E. M. **Alterações anatômicas, fisiológicas e fitoquímicas em Mikania glomerata Sprengel (guaco) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento**. 2002. 221f. Tese (Doutorado em fitotecnia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.
- CHAZDON, R. L.; KAUFMAN, S. Plasticity of leaf anatomy of two rain forest shrubs in relation to photosynthetic light acclimation. **Functional Ecology**, v. 7, p. 385-394, 1993.
- DEBERG, P. C.; MAENE, L. J. Pathological and physiological problems related to *in vivo* culture of plant. **Parasitica**, v. 40, n. 1, p. 69-75, 1984.
- DECETTI, S. F. C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropagação de Annona glaba L.** 2004. 93f. Tese (Doutorado em fisiologia vegetal)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- FIDELIS, I.; CASTRO, E. M. C.; PINTO, J. E. B. P.; GAVILANES, M. L.; SANTIAGO, E. J. A. Características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* Trec. Desenvolvidas *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 2, p. 327-336, 2000.
- FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira Roxo de Valinhos em diferentes ambientes**. 2003. 110f. Dissertação (Mestrado)

- em Fitotecnia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Seropédica, 1997.
- LIMA, E. C. **Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de Sangra d'água (*Croton urucurana* Baill)**. 2004. 105f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- MARTINOTTO, C. **Cultivo in vitro e aspectos morfológicos de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.)**. 2004. 84f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons (leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses)**. Oxford: At the Clarendon Press, 1957. v. 2.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NOBEL, P. S. Internal leaf área and cellular CO₂ resistance: photosynthetic implication of variations with growth conditions and plant species. **Physiologia Plantarum**, v. 40, n. 2, p. 137-144, 1977.
- PREECE, F. E.; COMPTON, M. E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**: 17 – high-tech and micropropagation I. Berlin: Springer Verlag, 1991. p. 168-189.
- ROSAL, L. F. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish)**. 2004. 106f. Dissertação (Mestrado em fitotecnia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- SANTOS, C. G. **Micropropagação e caracterização bioquímico anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo in vitro do ingazeiro (*Inga vera* Willd, subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn.)**. 2003. 107f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- SOUZA, L. A.; OLIVEIRA, J. H. G. Morfologia e anatomia das plântulas de *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb e *T. chrysotricha* (Mart. ex Dc.) Standl. (Bignoniaceae) **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 217-226, 2004.

Received on April 6, 2008.

Accepted on October 7, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.