

Rustificação *in vitro* em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*¹

In vitro hardening in different environment and acclimatization of microplants of *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*

Alone Lima-Brito^{2*}, Mara Marcia Sampaio Albuquerque², Sheila Vitoria Resende³, Claudia Elena Carneiro² e José Raniere Ferreira Santana²

RESUMO - Neste estudo foi avaliada a influência da radiação fotossinteticamente ativa (RFA) e do fechamento do recipiente de cultivo na rustificação das plantas *in vitro* e na sobrevivência das mudas aclimatizadas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*, tendo em vista aumentar a taxa de sobrevivência durante a aclimatização. Os brotos micropropagados em meio MS ½ foram mantidos sob três RFAs: 60; 120 e 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após 40 dias da inoculação, o filme PVC utilizado para fechar os tubos foi substituído por três tipos de fechamento: PVC, tampa plástica e algodão. Aos 60 dias de cultivo, foram realizadas análises anatômicas, de perda de água e do crescimento das plantas. Para a aclimatização, parte das plantas foram transferidas para viveiro e cobertas com garrafas PET. As maiores taxas de crescimento e sobrevivência *in vitro* foram obtidas a 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de RFA. Os resultados de crescimento para a maioria dos parâmetros avaliados não diferiram entre PVC e tampa plástica, sendo significativamente superiores às médias obtidas no tratamento com algodão, independente da RFA. A espécie não demonstrou plasticidade fenotípica para os caracteres foliares avaliados. As maiores médias para porcentagem de sobrevivência na aclimatização foram obtidas nas plantas oriundas dos tratamentos com PVC (76.12%) e tampa (73.28%) sob RFA de 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estes resultados indicam que a micropropagação convencional é um método viável para a produção de mudas de *C. mucugensis* subsp. *mucugensis*.

Palavras-chave: Sempre-viva. Rustificação. Aeração. Luz.

ABSTRACT - The present study evaluated the influence of photon flux density and the type of culture vessel seal on the hardening of *in vitro* plants and on the survival of seedlings acclimatized of *C. mucugensis* subsp. *mucugensis*, in order to increase the survival during acclimatization. Micropropagated shoots were maintained under three different levels of photosynthetically active radiation (PAR): 60; 120 and 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Forty days after inoculation, the PVC that was used to close the tubes was exchanged for three different types of seals: PVC, caps and cotton. At 60 days of cultivation the plants were analyzed as anatomy, loss of water and growth. For acclimatization, some plants were transferred to green houses and covered with the top halves of PET bottles. The greatest *in vitro* growth and survival rates were obtained at light intensities of 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ of PAR. The results observed for all of the variables did not differ with the use of PVC or cap closures, but were significantly inferior when cotton closures were used, independent of the light regime. The species did not demonstrate phenotypic plasticity among the leaf characters examined. The best survival percentage results during acclimatization were obtained with the plants grown using PVC (76.12%) and caps (73.28%) under PAR intensities of 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. These results indicated that conventional micropropagation is a viable method for producing plantlets of *C. mucugensis* subsp. *mucugensis*.

Key words: Sempre-viva. Hardening. Aeration. Light.

DOI: 10.5935/1806-6690.20160018

* Autor para correspondência

¹Recebido para publicação em 27/06/2014; aprovado em 16/10/2015

Parte da Tese de Doutorado da primeira autora, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana/UEFS, pesquisa financiada pela FAPESB

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA, Brasil, lima_brito@yahoo.com.br, mara_fsa@hotmail.com, carneiro@uefs.br, jose.raniere@gmail.com

³Instituto de Botânica, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, Salvador-BA, Brasil, svresende@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Comanthera mucugensis Giul. subsp. *mucugensis*, sempre-viva de Mucugê, é uma herbácea ornamental endêmica do município de Mucugê na Chapada Diamantina na Bahia (CERQUEIRA; FUNCH; BORBA, 2008). A ameaça de extinção a que esta espécie está exposta e a significativa importância para o comércio de flores secas ornamentais do Brasil e do exterior justifica o investimento em estudos que estabeleçam metodologias para a sua propagação e conservação.

A micropropagação tem sido indicada como uma alternativa viável para a produção de mudas desta espécie (LIMA-BRITO *et al.*, 2011) e de outras sempre-vivas, como *Syngonanthus elegantulus* (PEGO; PAIVA; PAIVA, 2013) e *Syngonanthus elegans* (PEGO; PAIVA; PAIVA, 2014). Esta técnica envolve quatro etapas: estabelecimento da cultura *in vitro*, multiplicação, enraizamento dos brotos e aclimatização das mudas (GRATAPPAGLIA; MACHADO, 1998).

A aclimatização representa para algumas espécies um fator limitante na produção, em decorrência dos altos índices de mortalidade, baixa taxa de crescimento e desuniformidade das mudas micropropagadas (HAZARIKA, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010; ROCHA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2011).

O déficit hídrico resultante da elevada transpiração das plantas durante a transferência para a condição *ex vitro*, é uma das principais causas da mortalidade das mudas na etapa de aclimatização (BARBOZA *et al.*, 2006). Essa baixa regulação da perda de água ocorre porque, em geral, as plantas *in vitro* possuem estômatos pouco funcionais, além de reduzido espessamento da cutícula e da parede das células epidérmicas, pequeno desenvolvimento do mesófilo foliar, com muitos espaços intercelulares e ausência ou reduzido número de tricomas na epiderme (HAZARIKA, 2006; KHAN *et al.*, 2003).

Em adição a regulação hídrica, a transição do metabolismo heterotrófico para autotrófico desempenha papel fundamental na etapa de aclimatização. A atividade fotossintética das plantas *in vitro* é limitada principalmente pela reduzida intensidade luminosa, baixa concentração de CO₂ no recipiente de cultivo e presença de sacarose no meio de cultura que é, em geral, a única ou principal fonte de carbono para o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro* (DECETTI *et al.*, 2008).

Assim, a transferência do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* requer alterações nas plantas micropropagadas, a fim de reduzir o estresse causado pelas diferenças entre as condições ambientais (BARBOZA *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2013). Em geral, essas alterações são induzidas em uma fase denominada rustificação, que

consiste na exposição gradual das plantas às condições externas ao ambiente de cultivo, e pode ocorrer *in vitro* e/ou durante o período de aclimatização (BATAGIN *et al.*, 2009). Entre os procedimentos que induzem tais alterações *in vitro*, destacam-se o aumento na intensidade luminosa, a aeração das culturas e a redução ou eliminação da sacarose do meio de cultura (BADR *et al.*, 2011; ERIG; SCHUCH, 2005; SILVA *et al.*, 2014).

Após a retirada das culturas da condição *in vitro*, a manutenção de temperaturas amenas, alta umidade relativa do ar e a redução da incidência direta de luz sobre as plantas favorecem a sua adaptação à condição *ex vitro*, evitando o estresse (MACIEL; SILVA; PASQUAL, 2000).

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da RFA e do fechamento do recipiente de cultivo na rustificação *in vitro* e na aclimatização das plantas de *C. mucugensis* subsp. *mucugensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

No experimento foram utilizados, como explantes, brotos com aproximadamente 20 mm de comprimento, obtidos por organogênese direta em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração salina (MS ½).

Os brotos foram inoculados em meio MS ½, contendo 7 gL⁻¹ de ágar, 15 gL⁻¹ de sacarose e 4,9 µM de AIB. O pH do meio foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem (121 °C por 15 minutos). Todos os procedimentos de inoculação *in vitro* foram feitos em câmara de fluxo laminar horizontal.

Os recipientes utilizados foram tubos de ensaio (25 x 150 mm), fechados com película de polivinilcloreto (PVC). Após 40 dias da inoculação, o PVC foi trocado por três tipos de fechamento dos tubos: PVC, tampa plástica e tampão de algodão.

As culturas foram mantidas na sala de crescimento a 25 ± 3 °C, fotoperíodo de 16 horas, sob três radiações fotossinteticamente ativas (RFA): 60; 120 e 300 µmol m⁻² s⁻¹. A iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria e a RFA foi ajustada em função do número de lâmpadas nas estantes. As medidas da irradiância de fótons foram realizadas com um IRGA (LCi/ADC).

Aos 60 dias de cultivo foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas; e dez plantas de cada tratamento foram submetidas à análise da perda de água e do crescimento.

Para verificar a perda de água avaliou-se a matéria fresca da planta no momento da retirada do recipiente de

cultivo e após 30; 60; 90 e 120 minutos de exposição às condições ambientais, com base na metodologia de Mills e Tal (2004).

Para análise do crescimento das plantas avaliou-se a porcentagem de enraizamento, o número de raízes, o comprimento da maior raiz, o número de folhas verdes e senescentes, o comprimento da maior folha e a matéria seca das plantas.

As análises histológicas foram realizadas em quatro plantas de cada tratamento, das quais foram retiradas as primeiras folhas totalmente expandidas. A região mediana de cada folha foi seccionada transversalmente à mão livre, com auxílio de lâmina de barbear, sendo utilizadas duas secções por folha, em um total de oito amostras por tratamento. Utilizou-se como controle plantas desenvolvidas em condições naturais no Parque Municipal de Mucugê (12°59'83" S e 42°20'91" W).

As amostras foram clarificadas em hipoclorito de sódio 3% por 15 minutos, lavadas em água destilada e coradas com solução aquosa de 0,1% de safranina e 0,1% de astra azul (BUKATSCH, 1972). Os cortes foram observados e fotografados em microscópio Olympus mod. BX 40 acoplado a uma câmara digital Olympus 5.1 megapixel, mod. Camedia C5060.

Para as observações ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), foram utilizados segmentos de aproximadamente 0,5 cm² da região mediana das duas primeiras folhas, completamente expandidas, de quatro plantas de cada tratamento, em um total de oito amostras por tratamento.

As amostras foram fixadas em Karnovisk modificado e desidratadas em série etílica crescente, sendo em seguida secas ao ponto crítico CPD 030 (Balzers). Posteriormente, as amostras foram afixadas em fita dupla face de carbono e em suporte metálico, submetidas à metalização com ouro em "sputtering" SCD 050 (Balzers) e eletromicrografadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 1430 VP (Carl Zeiss do Brasil). Para a avaliação da densidade estomática, diâmetro polar (DP) e equatorial (DE) do estômato - para o cálculo da relação DP/DE - foram utilizados dois campos por amostra, sendo observados dezesseis campos por tratamento. A densidade estomática foi expressa em mm² (LABOURIAU; OLIVEIRA; SALGADO-LABORIAU, 1961).

As plantas foram transferidas para potes plásticos contendo 500 g de substrato composto de solo + areia + vermiculita (1:1:1) e cobertas com garrafas "PET" (2L), as quais foram destampadas aos 15 dias e retiradas aos 30 dias após a transferência. As plantas foram mantidas em viveiro, tipo telado com sombrite a 50% de luminosidade.

A irrigação foi feita diariamente e a porcentagem de sobrevivência das plantas foi determinada 90 dias após a transferência para a condição *ex vitro*.

O delineamento experimental da etapa *in vitro* foi inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 3 x 3 (fechamento x RFA), com dez repetições e quatro tubos por repetição (um explante por tubo). Na etapa de aclimatização utilizou-se o DIC em arranjo fatorial 3 x 2 (fechamento x RFA), com quatro repetições e cinco plantas por repetição.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR 4.3 (FERREIRA, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os tratamentos testados, a perda de água por transpiração foi maior nos primeiros 30 minutos de exposição ao ambiente, com um decréscimo nos períodos subsequentes (Tabela 1).

Não houve interação entre o tipo de fechamento e a RFA para a redução de matéria fresca das plantas ($p \leq 0,05$). Aos 30 minutos de exposição às condições ambientais, as maiores médias para esta variável foram obtidas nos tratamentos com PVC, em todas as RFAs testadas. Nos demais períodos as médias obtidas nos tratamentos com PVC e tampa não diferiram entre si, sendo significativamente superiores aos resultados observados para plantas mantidas em tubos fechados com algodão (Tabela 1).

Após 120 minutos de exposição ao ambiente, houve uma redução total da matéria fresca de, aproximadamente, 20% para as plantas dos tratamentos com PVC e tampa, o que representa uma perda de água 70% maior do que as plantas oriundas de tubos fechados com algodão (Tabela 1).

Em todos os períodos analisados, as médias obtidas para redução da matéria fresca das plantas expostas a 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram significativamente superiores a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, independente do tipo de fechamento utilizado (Tabela 1). Ao final dos quatro períodos de exposição às condições ambientais, as plantas submetidas a 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram uma redução total de 19,87% em relação a sua matéria fresca inicial, o que representa uma perda de água aproximadamente 33% maior que as plantas submetidas a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (13,46%).

O decréscimo da transpiração observado nas plantas de *C. mucugensis* subsp. *mucugensis*, em função do

Tabela 1 - Valores médios para redução da matéria fresca (%) de plantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* aos 30 minutos, entre 30 e 60, entre 60 e 90, entre 90 e 120 minutos, após exposição a condições ambientais, em função do tipo de fechamento do recipiente de cultivo e da radiação fotossintética ativa (RFA)

RFA ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	PVC	Tampa	Algodão	Média
	30 minutos			
60	8,78 Aa	6,66 Ab	2,51 Ac	5,98 A
120	8,03 ABa	5,30 ABb	1,80 ABc	5,04 AB
300	7,51 Ba	4,45 Bb	1,30 Bc	4,44 C
Média	8,11 a	5,47 b	1,87 c	
30 a 60 minutos				
60	6,54 Aa	6,55 Aa	2,33 Ab	5,14 A
120	5,95 Aba	5,30 Ba	1,78 ABb	4,35 B
300	5,45 Ba	4,21 Cb	1,06 Bc	3,57 C
Média	5,98 a	5,35 a	1,72 b	
60 a 90 minutos				
60	5,67 Ab	6,41 Aa	1,96 Ac	4,68 A
120	4,38 Bb	5,40 Ba	1,68 ABc	3,82 B
300	3,57 Ca	3,92 Ca	1,08 Bb	2,99 C
Média	4,54 a	5,24 a	1,57 b	
90 a 120 minutos				
60	4,56 Ab	5,84 Aa	1,83 Ac	4,07 A
120	3,82 Ba	4,38 Ba	1,05 ABb	3,08 B
300	2,98 Ca	3,54 Ca	0,84 Bb	2,46 C
Média	3,78 a	4,59 a	1,24 b	
Média Geral	22,41 a	20,65 a	6,40 b	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$)

aumento do período de exposição às condições ambientais, pode estar relacionado a ativação do controle estomático em resposta à demanda evaporativa do ambiente. Quando expostas à condição *ex vitro*, as plantas cultivadas em tubos fechados com algodão apresentaram uma menor perda de água em comparação às oriundas dos tubos vedados com PVC ou tampa, corroborando os resultados obtidos para *Orthophytum mucugense* por Bellintani *et al.* (2007). De acordo com os autores, a redução de aproximadamente 50% da transpiração obtida nos tratamentos com algodão em relação aos tratamentos com PVC, seria decorrente das alterações anatômicas de *Orthophytum mucugense*, em resposta ao aumento das trocas gasosas e redução da umidade nos recipientes de cultivo vedados com tampas permeáveis.

Em *C. mucugensis* subsp. *mucugensis*, a menor perda de água observada nos tratamentos utilizando algodão em comparação aos demais tipos de fechamento dos tubos, não está relacionada a alterações anatômicas,

uma vez que não foram encontradas diferenças para as características da epiderme e dos estômatos entre as plantas submetidas às diferentes condições de cultivo, o que é resultante da manutenção das características xeromórficas *in vitro* de *C. mucugensis* subsp. *mucugensis*. A reduzida transpiração pode ser atribuída ao déficit hídrico pré-existente das plantas cultivadas em tubos fechados com algodão. A permeabilidade do algodão às trocas gasosas permite a evaporação da água do meio de cultura, o que reduz o potencial hídrico do meio e, conseqüentemente, da planta.

As análises anatômicas realizadas demonstraram que as folhas de *C. mucugensis* subsp. *mucugensis* *in vitro* apresentam adaptações ambientais xeromórficas, tais como células epidérmicas com paredes espessadas; cutícula, mesófilo compacto, hipoderme, parênquima aquífero e estômatos distribuídos na face abaxial (Figura 1). O xeromorfismo é relatado para o gênero *Comanthera* como uma resposta adaptativa das plantas a ambientes secos, ventos

fortes e alta intensidade luminosa, próprios dos campos rupestres brasileiros, onde ocorrem as espécies deste gênero (SCATENA; VICHI; PARRA, 2004).

A manutenção das características xeromórficas em *C. mucugensis* subsp. *mucugensis* contradiz diversos trabalhos que descrevem a anatomia das plantas *in vitro*. Em geral, as plantas *in vitro* não possuem mecanismos contra a perda de água, em função de sua adaptação ao ambiente com elevada umidade e baixa irradiância de fótons (BELLINTANI *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2009; SANTANA *et al.*, 2008).

A similaridade anatômica observada nas plantas de *C. mucugensis* subsp. *mucugensis* submetidas às diferentes condições de cultivo *in vitro* e as plantas *in vivo* demonstra que esta espécie não possui plasticidade fenotípica para os caracteres foliares analisados, o que pode estar relacionado a reduzida variabilidade genética da espécie e ao seu endemismo restrito a condições de clima árido (CERQUEIRA; FUNCH; BORBA, 2008; PEREIRA; BORBA; GIULIETTI, 2007).

Os resultados observados para densidade estomática e relação DP/DE não diferiram entre os tratamentos analisados (Tabela 2). As médias obtidas para relação DP/DE (1,92 μm) estão relacionadas a forma elíptica apresentada pelos estômatos. Resultados similares foram obtidos para espécies do gênero *Cymbidium in vitro* (BOSA *et al.*, 2003). Diferente do observado em *C. mucugensis* subsp. *mucugensis*, a maioria das plantas cultivadas *in vitro* apresenta estômatos com formato esférico e uma baixa relação DP/DE, quando comparadas com plantas

Figura 1 - Secção transversal da folha de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*, cultivada em recipiente vedado com PVC à 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A. vista geral da folha, B. margem da folha com hipoderme, C. mesófilo com parênquima aquífero e clorofiliano. D. feixe vascular, E. epiderme adaxial, F. epiderme abaxial, G. cutícula ornamentada, H. estômato. be- bainha externa, bi- bainha interna, c- cutícula, cs- câmara subestomática, e- epiderme, eab- epiderme abaxial, ead- epiderme adaxial, es- estômato h- hipoderme, pa- parênquima aquífero, pc- parênquima clorofiliano. (barra: A. 0,5 mm; B-H 0,1 mm)

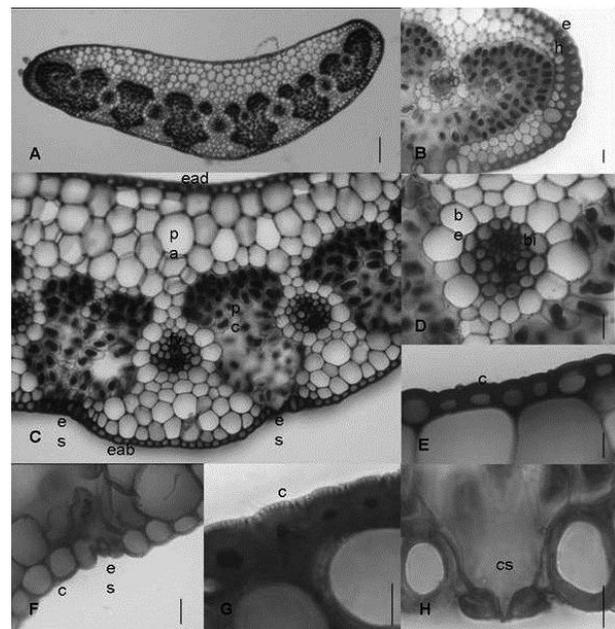


Tabela 2 - Valores médios para densidade estomática e relação DP/DE dos estômatos de plantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*, em função do tipo de fechamento do recipiente de cultivo e da radiação fossinteticamente ativa (RFA) durante a pré-aclimatização

RFA ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	PVC	Tampa	Algodão	Média Geral
Densidade estomática (nr/mm ²)				
60	55,85 Aa	56,06 Aa	56,50 Aa	56,14 A
120	56,10 Aa	55,85 Aa	56,25 Aa	56,07 A
300	55,80 Aa	56,00 Aa	55,00 Aa	55,60 A
Média Geral	55,92 a	55,97 a	55,91 a	
Relação DP/DE				
60	1,91 Aa	2,08 Aa	1,93 Aa	1,97 A
120	1,98 Aa	1,79 Aa	1,95 Aa	1,91 A
300	1,90 Aa	1,84 Aa	1,94 Aa	1,89 A
Média Geral	1,93 a	1,90 a	1,94 a	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

do ambiente natural (HAZARIKA, 2006). Em geral, os estômatos elípticos são funcionais e os esféricos possuem baixa funcionalidade (KHAN *et al.*, 2003).

Os estômatos, presentes apenas na face abaxial, apresentaram-se elípticos, fechados e dispostos em faixas contínuas paralelas ao maior eixo das folhas (Figura 2). A presença dos estômatos fechados em todas as amostras analisadas comprova o seu funcionamento e diverge dos resultados encontrados para diversas espécies vegetais cultivadas *in vitro*, que apresentaram estômatos abertos (BARBOZA *et al.*, 2006; ZOBAYED; ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2001).

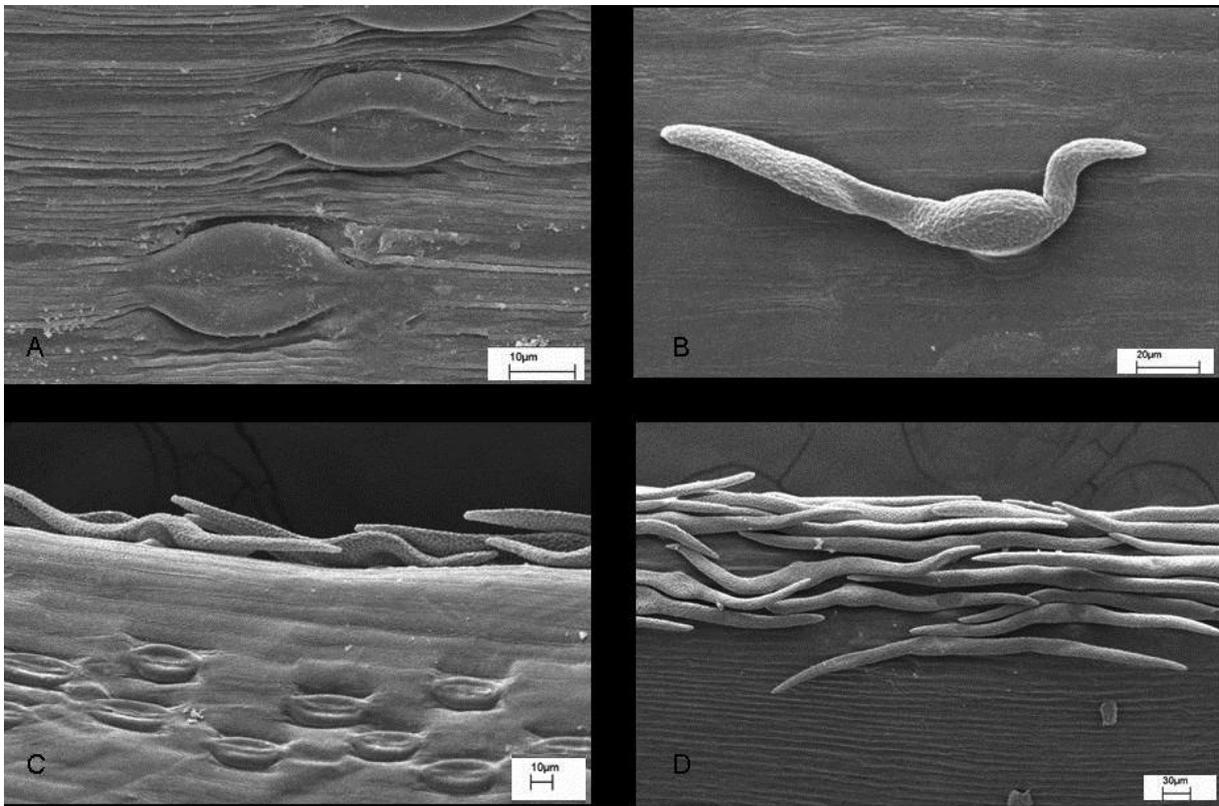
Estudos têm relatado a variação da densidade dos estômatos nas plantas *in vitro* em função de diferentes níveis de intensidade luminosa e sistemas de fechamento dos recipientes de cultivo (DECETTI *et al.*, 2008; ZOBAYED; ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2001). Entretanto, para *C. mucugensis* subsp. *mucugensis*, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para esta variável, o que deve estar relacionado a ausência de plasticidade fenotípica na espécie estudada. O valor médio para a densidade estomática, obtido em todos

os tratamentos, foi de aproximadamente 56 estômatos por mm^2 , média similar a obtida para plantas de *Ananas comosus* L. *in vitro* (54), e inferior a observada para a mesma espécie em casa de vegetação (62) por Barboza *et al.* (2006), que consideraram estes dados baixos para espécies xeromórficas.

Em todos os tratamentos *in vitro* observou-se a presença de tricomas malpighiáceos unicelulares, ramificados, com dois braços opostos (Figura 2B). Os tricomas distribuíam-se em maior quantidade na face abaxial das folhas, com uma grande concentração nas margens foliares (Figura 2C-D).

A ocorrência de tricomas malpighiáceos nas plantas pode representar uma adaptação à perda de água pelas folhas, por meio da regulação da temperatura pela reflexão da luz (LARCHER, 2000). No entanto, embora os tricomas observados em *C. mucugensis* subsp. *mucugensis* sejam relatados para outras herbáceas *in vitro*, sua função não pode ser atribuída às condições do ambiente de cultivo, que caracteriza-se pela baixa luminosidade e alta umidade no recipiente de cultivo (BARBOZA *et al.*, 2006; BATAGIN *et al.*, 2009).

Figura 2 - Eletromicrografia da folha de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*, cultivada em recipiente vedado com PVC à $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A. estômato; B. tricoma malpighiáceo; C. epiderme abaxial com estômatos em faixas paralelas e tricomas; D. epiderme adaxial sem estômatos e com tricomas nas margens



Os valores obtidos para as variáveis porcentagem de sobrevivência das plantas, comprimento da maior folha, matéria seca da planta e número de folhas verdes não diferiram entre os tipos de fechamentos PVC e tampa, sendo significativamente superiores às médias obtidas no tratamento com algodão, em todas as RFAs testadas (Tabela 3). Estes resultados podem ser atribuídos ao déficit hídrico das plantas, resultante da evaporação da água do meio de cultura no recipiente com maior aeração (algodão) em relação aos demais fechamentos testados. O déficit hídrico é um importante fator limitante do crescimento e desenvolvimento da planta, levando a modificações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, e consequentemente afetando a sua sobrevivência (GIROTTO *et al.*, 2012; HOMAYOUN; DALIRI; MEHRAB, 2011).

As maiores médias para taxas de sobrevivência e crescimento foram obtidas à 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, que diferiram significativamente de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, independente do tipo de fechamento, o que pode estar relacionado ao estresse foto oxidativo das plantas submetidas a alta intensidade luminosa. Para porcentagem de sobrevivência das plantas e comprimento da maior folha, não foram observadas diferenças significativas entre as médias obtidas nos tratamentos com 60 e 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 3).

A interação “tipo de fechamento x RFA” influenciou significativamente o número de folhas senescentes ($p \leq 0,05$). As menores médias para esta variável foram obtidas nos tratamentos com PVC a 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Comparando os tipos de fechamento para esta variável, observou-se que o uso de algodão

determinou médias significativamente superiores aos demais tratamentos nas plantas submetidas a 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (18,70) e 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (23,60). Nas plantas mantidas à 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não houve diferença significativa entre os tipos de fechamentos para número de folhas senescentes (Tabela 3). Entre as irradiâncias de fótons testadas, as menores médias para esta variável foram obtidas à 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e as maiores à 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 3).

As plantas apresentaram uma alta porcentagem de enraizamento, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 3). O comprimento da maior raiz não foi influenciado pelo tipo de fechamento, entretanto, o aumento da RFA influenciou negativamente esta variável. Não houve diferença significativa para o comprimento da maior raiz entre as médias observadas em 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (15,60mm) e 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (14,20mm), as quais foram significativamente superiores as obtidas a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4,90mm) (Tabela 3).

Em *C. mucugensis* subsp. *mucugensis*, as menores médias para comprimento da maior raiz, obtidas nas plantas submetidas a maior intensidade luminosa e aeração, bem como o reduzido número de raízes observados com o fechamento com algodão na maior irradiância de fótons testada, podem ser atribuídas ao déficit hídrico e/ou estresse foto oxidativo nestes tratamentos.

As médias observadas para número de raízes nas plantas submetidas a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram significativamente inferiores aos valores obtidos nas irradiâncias de fótons 60 e 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, os quais não diferiram entre si em todos os fechamentos (Tabela 3). Os valores obtidos no tratamento com algodão

Tabela 3 - Valores médios para porcentagem de sobrevivência das plantas, comprimento da maior folha, matéria seca da planta, número de folhas verdes e senescentes, porcentagem de enraizamento, comprimento da maior raiz e número de raízes por plantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* em função do tipo de fechamento do recipiente de cultivo e da radiação fotossinteticamente ativa (RFA) durante o período da pré-aclimatização

RFA ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	PVC	Tampa	Algodão	Média Geral
Sobrevivência das plantas (%)				
60	100,00 Aa	100,00 Aa	86,00 Ab	95,33 A
120	92,50 Aa	90,00 Aa	80,00 Ab	87,50 A
300	56,00 Ba	50,00 Ba	25,50 Bb	43,83 B
Média Geral	82,83 a	80,00 a	63,83 b	
Comprimento da maior folha (mm)				
60	24,80 Aa	22,60 Aa	18,00 Ab	21,80 A
120	23,50 Aa	21,70 Aa	17,80 Ab	21,00 A
300	10,50 Ba	10,60 Ba	4,50 Bb	8,53 B
Média Geral	19,60 a	18,30 a	13,43 b	

Continuação da Tabela 3

Matéria seca da planta (mg)				
60	67,87 Aa	65,26 Aa	53,70 Ab	62,28 A
120	55,36 Ba	54,41 Ba	42,54 Bb	50,77 B
300	31,17 Ca	34,20 Ca	19,70 Cb	28,36 C
Média Geral	51,47 a	51,29 a	38,65 b	
Número de folhas verdes				
60	29,00 Aa	28,35 Aa	18,75 Ab	25,37 A
120	22,75 Ba	21,75 Ba	14,45 Ab	19,65 B
300	15,83 Ca	14,10 Ca	6,45 Bb	12,13 C
Média Geral	22,53 a	21,40 a	13,22 b	
Número de folhas senescentes				
60	8,45 Cc	11,95 Bb	18,70 Ba	13,03 C
120	15,85 Bb	17,35 ABb	23,60 Aa	18,93 B
300	20,45 Aa	22,89 Aa	23,75 Aa	22,36 A
Média Geral	14,92 a	17,60 a	15,35 a	
Enraizamento (%)				
60	97,80 Aa	98,00 Aa	96,43 Aa	97,41 A
120	96,74 Aa	97,40 Aa	96,00 Aa	96,71 A
300	95,48 Aa	95,82 Aa	94,39 Aa	95,23 A
Média Geral	96,67 a	97,07 a	95,61 a	
Comprimento da maior raiz (mm)				
60	15,60 Aa	15,20 Aa	16,10 Aa	15,60 A
120	13,70 Aa	13,40 Aa	15,60 Aa	14,20 A
300	4,10 Ba	5,70 Ba	5,00 Ba	4,90 B
Média Geral	1,11 a	1,14 a	1,22 a	
Número de raízes por planta				
60	14,55 Aa	14,10 Aab	11,02 Ab	13,22 A
120	13,70 Aa	13,15 Aa	9,60 Ab	12,15 A
300	8,35 Ba	7,58 Ba	6,80 Ba	7,58 B
Média Geral	12,20 a	11,61 a	9,14 b	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

foram significativamente inferiores aos observados no tratamento com PVC sob 60 e 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de RFA. Nas plantas mantidas a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não houve diferença significativa entre os fechamentos para esta variável (Tabela 3). Estes resultados indicam que o enraizamento *in vitro* de *C. mucugensis* é obtido em condições convencionais de cultivo (tubos fechados com PVC e 60 de RFA $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A indução de raízes *in vitro* é um importante evento organogênico que irá garantir a sobrevivência das mudas durante a aclimatização.

Na etapa de aclimatização foram utilizadas, apenas, as plantas cultivadas sob RFA de 60 e 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em decorrência das reduzidas porcentagens de sobrevivência obtidas nos tratamentos submetidos a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de RFA. Aos 90 dias da aclimatização, as médias para porcentagem de sobrevivência das plantas oriundas dos tubos fechados com PVC (70,32%) e tampa (66,73%) foram significativamente superiores ao tratamento com tampão de algodão (38,69%), independente da intensidade luminosa (Tabela 4). Comparando-se as

Tabela 4 - Valores médios para sobrevivência das plantas aclimatizadas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*, 90 dias após transferência para a condição *ex vitro*, em função do tipo de fechamento do recipiente de cultivo e da radiação fotossinteticamente ativa (RFA) durante o período de pré-aclimatização

RFA ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	PVC	Tampa	Algodão	Média Geral
	% de sobrevivência das plantas			
60	76,12 Aa	73,28 Aa	42,35 Ab	63,92 A
120	64,53 Ba	60,19 Ba	35,04 Bb	53,25 B
Média Geral	70,32 a	66,73 a	38,69 b	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste F a 5% de probabilidade

RFAs, os resultados obtidos a $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram significativamente superiores a $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nos três tipos de fechamento testados (Tabela 4).

O efeito negativo do aumento da irradiância de fótons sobre a perda de água, sobrevivência, desenvolvimento da parte aérea e comprimento e número de raízes em *C. mucugensis* subsp. *mucugensis* durante a pré-aclimatização, pode estar relacionado ao estresse foto oxidativo tendo em vista que os brotos foram oriundos de um menor nível de RFA ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Resultados semelhantes foram observados para *Musa* spp (COSTA *et al.*, 2009).

As porcentagens de sobrevivência das plantas aclimatizadas, oriundas do cultivo heterotrófico *in vitro* com tampa (76,12%) e PVC (73,28%) sob $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sugerem que *C. mucugensis* subsp. *mucugensis* não necessita de tratamentos de rustificação *in vitro* e que a mudança de metabolismo heterotrófico para autotrófico não é um fator limitante para a aclimatização desta espécie (Tabela 4).

Estes resultados podem estar relacionados as características xeromórficas mantidas pelas folhas e a funcionalidade dos estômatos, o que impediu a perda de água durante a aclimatização. Além disso, a aclimatização pode ter sido favorecida pela utilização de garrafas PET, as quais permitiram a manutenção de alta umidade relativa no microambiente, reduzindo o risco de déficit hídrico das plantas.

CONCLUSÕES

1. O aumento da intensidade luminosa e da aeração das culturas afetou negativamente o crescimento *in vitro* e a sobrevivência das plantas durante a aclimatização;
2. *C. mucugensis* subsp. *mucugensis* não possui plasticidade fenotípica para os caracteres foliares analisados

em função dos tipos de fechamento e intensidade luminosa testados, mantendo as características foliares xeromórficas apresentadas no ambiente natural;

3. As plantas micropropagadas de *C. mucugensis* subsp. *mucugensis* podem ser transferidas para a condição *ex vitro* sem passar por uma fase de rustificação *in vitro*;
4. O sucesso na etapa de aclimatização indica que a micropropagação é um método viável para a produção de mudas de *C. mucugensis* subsp. *mucugensis*.

REFERÊNCIAS

- BADR, A. *et al.* Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, p. 13-24, 2011.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, p. 255-255, 1972.
- BARBOZA, S. B. S. C. *et al.* Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 185-194, 2006.
- BATAGIN, K. D. *et al.* Alterações morfológicas foliares em abacaxizeiro cv IAC “Gomo-de-mel” micropropagados e aclimatizados em diferentes condições de luminosidade. **Acta Botânica Brasílica**, v. 23, n. 1, p. 85-92, 2009.
- BELLINTANI M. C. *et al.* Efeito da ventilação *in vitro* na aclimatização de plantas micropropagadas de *Orthopytum mucugense* Wand e Conceição. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1098-1100, 2007.
- BOSA, N. *et al.* Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 207-210, 2003.
- CERQUEIRA, C. O.; FUNCH, L. S.; BORBA, E. L. Fenologia de *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* e *S. curralensis* Moldenke (Eriocaulaceae), nos municípios de Mucugê e Morro do Chapéu, Chapada Diamantina, BA,

- Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 22, n. 4, p. 962-969, 2008.
- COSTA, F. H. da S. *et al.* Crescimento e anatomia foliar de bananeiras submetidas a diferentes condições de cultivo *in vitro*. **Bragantia**, v. 68, n. 2, p. 303-311, 2009.
- DECCETTI, S. F. C. *et al.* Effect of the culture environment on stomatal features, epidermal cells and water loss of micropropagated *Annona glabra* L. plants. **Scientia Horticulturae**, v. 117, p. 341-344, 2008.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.
- FERREIRA, D. F.; **SISVAR versão 4.3**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2003.
- GIROTTI, L. *et al.* Tolerância à seca de genótipos de trigo utilizando agentes indutores de estresse no processo de seleção. **Revista Ceres**, v. 59, n.2, p. 192-199, 2012.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998. v.1, p. 43-76.
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006.
- HOMAYOUN, P. H.; DALIRI, M. S.; MEHRABI, P. Study os PEG stress effects on wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivares al germination stage. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 9, n. 1, p. 71-74, 2011.
- KHAN, P. S. 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.
- LABOURIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABOURIAU M. L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Toledo I: comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 33, n. 2, p. 237-257, 1961.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RIMA Artes e Textos, 2000. 531 p.
- LIMA-BRITO, A. *et al.* *In vitro* morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. mucugensis. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 502-510, 2011.
- MACIEL, A. L. R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Aclimação de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl) obtidas *in vitro*: efeitos do substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 9-12, 2000.
- MILLS, D.; TAL, M. The effect of ventilation on *in vitro* response of seedlings of the cultivated tomato na its wild salt - tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt stress. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 209-216, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OLIVEIRA, Y. *et al.* Pré-aclimatização *in Vitro* de abacaxi-ornamental. **Ciência e Agrotecnologia**, Edição Especial, v. 34, p. 1647-1653, 2010. Edição especial.
- PEGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Micropropagation of *Syngonanthus elegantulus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.37, n.1, p. 32-39, 2013.
- PEGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Micropropagation protocol for *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland: an ornamental species. **Acta Scientiarum**, v.36, n.2, p. 347-353, 2014.
- PEREIRA, A. C. S.; BORBA, E. L.; GIULIETTI, A. M. Genetic and morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae) from the Chapada Diamantina, Brazil: implications for conservation and taxonomy. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 153, p. 401-416, 2007
- ROCHA, M. A. C. *et al.* Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 769-774, 2008.
- SANTANA, J. R. F. *et al.* Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L. II. Anatomia foliar antes da aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 640-644, 2008.
- SCATENA, V. L.; VICHI, D. V.; PARRA, L. R. Anatomia de escapos, folhas e brácteas de *Comanthera* sect. *Eulepis* (Bong. ex Koern.) Ruhland (Eriocaulaceae). **Acta Botânica Brasílica**, v. 18, n. 4, p. 825-837, 2004.
- SILVA, A. B. *et al.* Efeito da luz e do sistema de ventilação natural em abacaxizeiro (Bromeliaceae) micropropagado. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 2, p. 380-386, 2014.
- SILVA, A. L. L. *et al.* Pré-aclimatização e aclimatização em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna* Sm. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, n. 2, p. 179-184, 2011.
- SILVEIRA, D. G. *et al.* Aspectos morfofisiológicos na pré-aclimatização *in vitro* e aclimatização de plantas de caroá. **Revista Ciência Agrônoma**, v. 44, n. 3, p. 544-553, 2013.
- ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. **Plant Science**, v. 161, p. 537- 548, 2001.