

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E  
BIOQUÍMICA DE *Laelia purpurata* 'carnea'  
MICROPROPAGADA EM DIFERENTES  
AMBIENTES**

**JESSÉ MARQUES DA SILVA JÚNIOR**

**2009**

**JESSÉ MARQUES DA SILVA JÚNIOR**

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E  
BIOQUÍMICA DE *Laelia purpurata* ‘carnea’  
MICROPROPAGADA EM DIFERENTES  
AMBIENTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador  
Prof. Evaristo Mauro de Castro

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2009

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

Silva Júnior, Jessé Marques da.

Caracterização anatômica e bioquímica de *Laelia purpurata*  
'carnea' micropropagada em diferentes ambientes / Jessé Marques  
da Silva Júnior. – Lavras : UFLA, 2009.

109 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Evaristo Mauro de Castro.

Bibliografia.

1. Irradiância. 2. Cultivo *in vitro*. 3. Planta ornamental. 4.  
Anatomia vegetal. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 584.150416

JESSÉ MARQUES DA SILVA JÚNIOR

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E  
BIOQUÍMICA DE *Laelia purpurata* ‘carnea’  
MICROPROPAGADA EM DIFERENTES  
AMBIENTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 16 de dezembro de 2009

Prof. Dr. Moacir Pasqual

UFLA

Dr. Edvan Alves Chagas

Embrapa-Roraima

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

UFLA

Dra. Leila Aparecida Salles Pio

UFLA

Profa Dra. Adriana Tiemi Nakamura (suplente)

UFLA

Prof. Evaristo Mauro de Castro  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

## **DEDICO**

*A minha esposa, Thaísa e filha, Maria Eduarda,  
pelo apoio, compreensão, paciência e felicidade de ser  
Pai.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida, pois tenho certeza absoluta de que a força que nos move, que nos impulsiona e nos dá a certeza de onde queremos chegar vem DELE.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

À Fapemig, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Dr. Evaristo Mauro de Castro, que acreditou em mim e, com seus conselhos, contribuiu de forma decisiva para meu desenvolvimento profissional. OBRIGADO DE CORAÇÃO!!!!

Ao Professor Moacir Pasqual, pela coorientação e convivência agradável.

Aos membros da banca examinadora: professor Moacir Pasqual, Dr. Edvan Alves Chagas, Dra. Leila Salles Pio, professora Suzan Kelly Vilela Bertolucci e Dra. Aparecida Gomes de Araújo, por analisar o manuscrito para as devidas correções.

A Vera Guerra (Didi) que, sem dúvida, foi uma mãe, que me recebeu de braços abertos e me adotou como filho. Meu eterno carinho.

Ao Márcio Guerra e Ângela, meus sinceros agradecimentos por todos esses anos de convivência em harmonia, pela confiança e paciência.

A todos os integrantes da Família Guerra (Patrícia, Rodrigo, Matheus, Héilton, Débora, Arilda e José Carlos) que, sem dúvida, foram meu porto seguro nas horas difíceis, porém, nas horas de descontração, era realmente a turma da bagunça.

Aos amigos da UFLA e do Laboratório de Anatomia Vegetal e Cultura de Tecidos (DAG), pela ajuda necessária ao bom desenvolvimento dos experimentos.

*Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis,  
as pedras do caminho se tornam montanhas  
os fracassos se transformam em golpes fatais,  
Mas, se você tiver grandes sonhos...  
seus erros produzirão crescimento,  
seus desafios produzirão oportunidades,  
seus medos produzirão coragem.*

***POR ISSO NUNCA DESISTA DOS SEUS SONHOS.***

***AUGUSTO CURY***

(Trecho do livro “Nunca desista de seus sonhos”)

## **BIOGRAFIA**

JESSÉ MARQUES DA SILVA JÚNIOR, filho de Roeslene de Lima Marques da Silva e Jessé Marques da Silva, nasceu em 24 de fevereiro de 1982, em Maceió, Alagoas. Coursou o ensino fundamental no Colégio Estefânia Teixeira Barbosa até 1994 e, do ano seguinte até 2000, estudou no Colégio de Santa Teresinha, onde concluiu o ensino médio. Em março de 2001, iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), concluindo-o em 23 de fevereiro de 2006. Durante esse período foi bolsista de iniciação científica (PIBIC) pelo CNPq, sob a orientação dos professores Antônio Valeriano Pereira dos Santos (PhD), Eurico Eduardo Pinto Lemos (PhD), Cícero Eduardo Ramalho Neto (PhD) e Dra. Edna Peixoto da Rocha Amorim, onde desenvolveu projetos de pesquisa no setor de Fitotecnia e Fitossanidade (FIT) na área de biotecnologia vegetal e controle de doenças em plantas. Em março de 2006, iniciou o mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras (UFLA), concluindo-o em 6 de agosto de 2007, sob a orientação do professor Renato Paiva, PhD. Neste mesmo ano iniciou o doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal na UFLA, concluindo-o em 16 de dezembro de 2009, sob a orientação do professor Dr. Evaristo Mauro de Castro.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMO GERAL.....	iii
GENERAL ABSTRACT.....	iv
1 Introdução Geral.....	1
2 Referencial Teórico.....	2
2.1 As orquídeas ( <i>Laelia purpurata</i> ‘carnea’).....	2
2.2 Importância das Orchidaceae.....	4
2.3 Tipos de <i>Laelia</i> .....	5
2.4 Problemas fitossanitários em Orchidaceae.....	6
2.5 Morfogênese <i>in vitro</i> .....	10
2.6 Micropropagação e uso do silício.....	11
2.7 Uso de uréia em cultura de tecidos.....	12
3 Referências Bibliográficas.....	14
CAPÍTULO 1: Repostas metabólicas e morfoanatômicas de plântulas de <i>Laelia purpurata</i> ‘carnea’ em diferentes ambientes.....	17
1 Resumo.....	17
2 Abstract.....	18
3 Introdução.....	19
4 Material e Métodos.....	22
4.1 Local do experimento.....	22
4.2 Origem do material vegetal.....	22
4.3 Cultivo <i>in vitro</i> sob malhas fotoconversoras.....	23
4.4 Análise de crescimento.....	24
4.5 Doseamento de açúcares solúveis totais (AST) e açúcares redutores (AR).....	24
4.5.1 Preparo dos reagentes.....	26
4.6 Avaliação e determinação da atividade da fenilalanina amônio-liase PAL (EC 4.3.1.24).....	28
4.7 Avaliações anatômicas.....	32
4.8 Delineamento Experimental.....	32
5 Resultados e Discussão.....	33
6 Conclusões.....	61
7 Agradecimentos.....	61
8 Referências bibliográficas.....	62
CAPÍTULO 2: Morfoanatomia de plântulas de <i>Laelia purpurata</i> ‘carnea’ cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de nitrato de amônio e uréia.....	69
1 Resumo.....	69

2 Abstract.....	70
3 Introdução.....	71
4 Material e Métodos.....	72
4.1 Local do experimento.....	72
4.2 Cultivo <i>in vitro</i> .....	72
4.3 Substituição do nitrato de amônio (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ) por uréia (CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O).....	73
4.4 Análise de crescimento.....	73
4.5 Doseamento de clorofila.....	73
4.6 Anatomia foliar e radicular.....	74
4.7 Delineamento experimental.....	75
5 Resultados e Discussão.....	76
6 Conclusões.....	89
7 Agradecimentos.....	89
8 Referências Bibliográficas.....	90

CAPÍTULO 3: Alterações anatômicas e atividade de Fenilalanina Amônio	
Liase (PAL) em plântulas de <i>Laelia purpurata</i> ‘carnea’ micropropagadas com	
diferentes fontes de silício.....	
1 Resumo.....	93
2 Abstract.....	94
3 Introdução.....	95
4 Material e Métodos.....	96
4.1 Local do experimento.....	96
4.2 Cultivo <i>in vitro</i> .....	96
4.3 Fontes de silício.....	97
4.4 Avaliação e determinação da atividade da fenilalanina amônio-liase PAL (EC 4.3.1.24).....	97
4.5 Anatomia foliar.....	101
4.6 Delineamento Experimental.....	101
5 Resultados e Discussão.....	102
6 Conclusões.....	108
7 Agradecimentos.....	108
8 Referências Bibliográficas.....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANA:** ácido naftalenoacético  
**AR:** açúcares redutores  
**AST:** açúcares solúveis totais  
**atm:** atmosfera  
**BST:** biomassa seca total (g)  
**BSR:** biomassa seca de raízes (g)  
**BSP:** biomassa seca de plantas (g)  
**cm:** centímetros  
**CPA:** comprimento da parte aérea de plantas (cm)  
**CV:** casa de vegetação  
**CVa:** cilindro vascular  
**CVA:** casa de vegetação sombreado sob malhas fotoconversora azul 50%  
**CVP:** casa de vegetação sombreado sob malha sombrite preta 50%  
**CVV:** casa de vegetação sombreado sob malhas fotoconversora vermelha 50%  
**Co:** córtex  
**DNS:** ácido dinitrosalicílico  
**E:** diâmetro equatorial  
**EAB:** epiderme da face abaxial  
**EAD:** epiderme da face adaxial  
**Ex:** exoderme  
**F.A.A 70%:** formaldeído, ácido acético glacial, etanol solução preparada em ácool a 70 GL  
**g:** grama  
**gL:** gramas por litro  
**GA<sub>3</sub>:** ácido giberélico  
**h:** hora  
**HCL:** ácido clorídrico  
**LB:** limbo foliar  
**M:** molar  
**MS:** Murashigi e Skoog  
**mM:** milimolar  
**mg:** miligrama  
**mL:** mililitro  
**mm<sup>-2</sup>:** milímetro quadrado  
**mim:** minuto  
**μmol:** micro mol  
**μg:** micro grama  
**μL:** micro litro  
**N:** normal  
**NF:** número de folhas

**NR:** número de raízes  
**PM:** peso molecular  
**pH:** potencial de hidrogênio  
**PAL:** fenilalanina amônio-liase  
**P:** diâmetro polar  
**rpm:** rotações por minuto  
**SC:** sala de crescimento  
**SCA:** sala de crescimento sob sombreamento de malha fotoconversora azul 50%  
**SCP:** sala de crescimento sob sombreamento de malha sombrite preta 50%  
**SCV:** sala de crescimento sob sombreamento de malha fotoconversora vermelha 50%  
**SE:** solução estoque  
**SA:** solução amostra  
**Si:** silício

## RESUMO GERAL

SILVA JÚNIOR, Jessé Marques da. **Caracterização anatômica e bioquímica de *Laelia purpurata* ‘carnea’ micropropagada em diferentes ambientes.** 2009. 109 p. Tese (Doutorado em Agronomia-Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A espécie *Laelia purpurata* ‘carnea’, se destaca pela beleza exuberante e por ser fonte de variação para a realização de cruzamentos com outras espécies, como, por exemplo, as *Cattleya*, para a aquisição de híbridos. No presente trabalho, foram instalados três experimentos com os seguintes objetivos: **1)** avaliar alterações anatômicas e bioquímicas em plantas de *L. purpurata* ‘carnea’ sob diferentes intensidades e qualidade espectral de luz, promovidas por diferentes malhas fotoconversoras (azul e vermelha) e malha sombrite preta. **2)** avaliar a viabilidade da substituição do nitrato de amônio por uréia (0; 25; 50; 75 e 100%). **3)** avaliar o efeito de diferentes fontes de silício na morfoanatomia e atividade da PAL. A análise da enzima PAL das plantas sob às malhas fotoconversoras demonstrou alterações na sua atividade, com o favorecimento da malha fotoconversora azul em relação à vermelha e a malha sombrite preta. Ocorreram, ainda, aumentos significativos para comprimento da parte aérea, biomassa seca de plantas, AR e AR/AST, quando as mesmas eram sombreadas sob malha fotoconversora vermelha. A substituição de nitrato de amônio por ureia foi satisfatória até 75%; acima dessa concentração, apresentou efeito tóxico nos tecidos avaliados. A atividade da PAL induzida pelas fontes de silício ( $K_2SiO_3$  e  $Ca_2SiO_3$ ) foi verificada na concentração de 1,5 e 2,0 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Melhorias na organização dos tecidos foliares foram observadas com a utilização das fontes  $K_2SiO_3$  e  $Ca_2SiO_3$ .

---

\* Comitê Orientador: Evaristo Mauro de Castro-UFLA (Orientador), Dr. Moacir Pasqual-UFLA

## GENERAL ABSTRACT

SILVA JÚNIOR, Jessé Marques da. **Anatomical and Biochemical characterization of *Laelia purpurata* 'carnea' micropropagated in different environments.** 2009. 109 p. Thesis (Ph.D Program in Agronomy-Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

The species *Laelia purpurata* 'carnea' stands out for its exuberant beauty and has been a source of variation in the realization of crosses with other species, for example, as *Cattleya*, for the purchase of hybrids. In this study, three experiments were installed with the following objectives: 1) analyze anatomical and biochemical changes in *L. purpurata* 'carnea' plants under different intensities and spectral quality of light, promoted by different shading nets (blue and red) and black mesh shade. 2) Evaluate the feasibility of replacing the ammonium nitrate with urea (0, 25, 50, 75 and 100%). 3) Evaluate the effect of different sources of silicon in morphoanatomy and the activity of PAL. Analysis of PAL enzymes in plants to shading nets showed changes in activity, with favoring of the blue shading nets in relation to the red and black fabric shade. Significant increases in shoot length, dry biomass of plants, AR and AR / AST, also occurred when they were shaded by red shading nets. The substitution of ammonium nitrate by urea has been satisfactory until 75%; above this concentration, it showed toxic effects in tissues evaluated. The PAL activity induced by sources of silicon ( $K_2SiO_3$  and  $Ca_2SiO_3$ ) was observed at concentrations of 1.5 and 2.0 g L<sup>-1</sup>, respectively. Improvements in the organization of leaf tissues were observed with the use of renewable  $K_2SiO_3$  and  $Ca_2SiO_3$ .

---

\* Guidance Committee: Evaristo Mauro de Castro, PhD-UFLA (Adviser); Moacir Pasqual-UFLA

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O consumo de flores e plantas ornamentais em todo mundo vem aumentando ao longo dos anos. Nos tradicionais países consumidores e nas novas economias de países em desenvolvimento, a demanda tem crescido significativamente. A produção e o consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil vêm acompanhando a tendência de expansão desse agronegócio, que também vem crescendo a cada ano (Landgraf & Paiva, 2009).

A capacidade de geração de ocupação e renda da floricultura é muito grande, empregando, aproximadamente, 120 mil pessoas, 80% de mulheres e 18,7% de origem familiar. Entre as culturas agrícolas, a floricultura destaca-se por empregar, em média, de 10 a 15 funcionários por hectare, superando em dez vezes os demais cultivos (Vencato et al., 2006).

A produção de plantas ornamentais é uma atividade agrícola e trata-se de um setor altamente competitivo, que exige a utilização de tecnologias avançadas, conhecimentos técnicos do produtor, além de um sistema eficiente de distribuição e comercialização (Landgraf & Paiva, 2009).

Devido a esse vigente crescimento e desenvolvimento do setor de plantas ornamentais no país, observa-se a necessidade simultânea de ampliar as pesquisas de caracterização e conservação de espécies nativas com características potencialmente econômicas e efetuar a domesticação e a multiplicação racional das mesmas na área da micropropagação (Soares et al., 2009).

As técnicas de cultivo de células e tecidos vegetais *in vitro* permitem a produção massal de plantas da família Orchidaceae, dentre outras (Nayak et al., 2001). Sobretudo, apresentam, ainda, diversas vantagens, pois o número de espécies em extinção aumenta o índice da germinação *in vitro* (98% a 100%) para a grande maioria dessas espécies, acelera o processo de crescimento e desenvolvimento, formando plantas mais vigorosas e adaptáveis para o cultivo

*ex vitro*, além de permitir a manutenção de um banco de espécies (germoplasma) (Martini et al., 2001).

No cultivo *in vitro* ou *ex vitro*, a intensidade e a qualidade espectral da radiação fornecida por lâmpadas em sala de crescimento desempenham papel fundamental no desenvolvimento morfológico das plantas (fotomorfogênese), visando uma melhor eficiência do aparato fotossintético na captação e na utilização da energia radiante, uma vez que a folha é um órgão plástico e sua estrutura interna adapta-se às condições do ambiente (Oren-Shamir et al., 2001).

Sendo assim, as plantas ornamentais (orchídeas) são, por excelência, o grupo de plantas em que a aplicação da micropropagação teve uma expressão significativa no mundo científico, em que *Laelia purpurata* ‘carnea’ se destaca por apresentar estabilidade durante o cultivo *in vitro* (Silva Júnior, 2007).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 As Orchidaceae (*Laelia purpurata* ‘carnea’)

A família Orchidaceae Juss. é uma das maiores dentre as angiospermas, estimando-se, mundialmente, a existência de 19.500 espécies e 725 gêneros (Dressler, 1993), dos quais 440 gêneros apresentam hábitos epifíticos (Kress, 1986). No Brasil, ocorrem cerca de 2.400 espécies (Barros & Batista, 2004). Representantes da família Orchidaceae ocorrem em todo o planeta, exceto nas regiões polares e nos desertos, porém, a maioria das espécies ocorre nas regiões tropicais, crescendo diretamente no solo, sobre pedras ou, principalmente, como epífitos (Pinheiro et al., 2004), constituindo um grupo bastante significativo e diversificado dentre os epífitos vasculares (Waechter, 1998).

Provavelmente, essa grande amplitude geográfica é favorecida pela dispersão a longas distâncias, proporcionada por suas numerosas e diminutas sementes (Benzing, 1981). As orquídeas possuem grande variação quanto ao

hábito de crescimento e ao hábitat de ocorrência, podendo ser desde epífitas até terrestres, saprófitas ou rupícolas.

Entre as várias orquídeas, *Laelia* (em português: Lélia) é um pequeno gênero com 20 espécies de hábito epífita e litófitas, endêmicas desde o México até a América do Sul. Este gênero é estreitamente relacionado com o gênero *Cattleya*. A diferença principal entre eles é que as *Laelias* têm oito polínias em cada flor e as *Cattleya*, quatro (Joly, 2002).

Sua classificação científica é pertencente ao domínio Eukaryota, reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Asparagales, família Orchidaceae, gênero *Laelia* e espécie *purpurata* (Joly, 2002).

As *Laelias* são mais frequentes no Brasil e na América Central. As do México são encontradas em altitudes mais elevadas, enquanto no Brasil são comuns nas planícies em locais quentes e úmidos (Joly, 2002). O gênero encontra-se ameaçado pela intensa destruição de seu hábitat, por isso merece especial atenção, além de ser fonte de variabilidade genética para cruzamentos com outros gêneros, com, por exemplo, *Cattleya*, para a obtenção de híbridos (Lorenzi & Souza, 2008; Ávila-Díaz et al., 2009).

Técnicas como a cultura de tecidos têm auxiliado na preservação de várias espécies, entre elas as orquídeas. Uma de suas principais vantagens é o manuseio de grande número de indivíduos em espaço reduzido e sob condições assépticas. A micropropagação, ou propagação *in vitro*, tem sido utilizada para aumentar, principalmente, a produção de mudas, reduzindo seu custo e contribuindo para salvar muitas espécies de orquídeas da extinção (Stancato et al., 2001).

No Brasil o gênero *Laelia* foi identificado, em 1846, por François Devos no litoral da então província de Santa Catarina. Por conta da exuberância de suas flores, em que o labelo se destaca por apresentar coloração rósea ao centro e nas extremidades branco, dessa forma realçando as estrias (Figura 1 A e B), a partir

dessa data, tornou-se a flor símbolo da cidade de Florianópolis (Lorenzi & Souza, 2008).

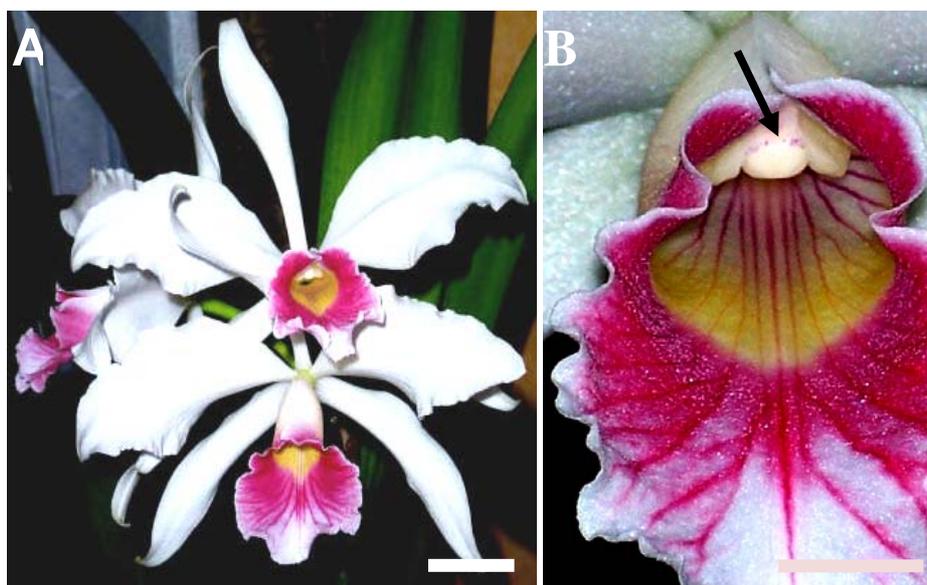


FIGURA 1 (A) *Laelia purpurata* 'carnea'. (B) Detalhe do labelo, evidenciando a coluna (seta) e o lóbulo central (labelo). Lavras-MG. Barra: 2 cm.

## 2.2 Importância econômica das orquídeas

Espécies de orquídeas são comercializadas como plantas ornamentais (especialmente, as dos gêneros *Cattleya*, *Oncidiuns* e *Laelia*), medicinais e alimentícias (Arora & Kapil, 1989). Povos asiáticos a utilizam tanto para a confecção de peças de artesanato como para produção de medicamentos. O suco do *Dendrobium crumenatum* é utilizado pelos malasianos para tratar inflamações no ouvido, furúnculos e pústulas. Na Índia, os pedúnculos secos desta espécie são utilizados para amarração e a fibra do córtex é empregada como material para chapéus. O tubérculo de *Geodorum nutans* é utilizado pelos nativos da Malásia em cataplasmas. Cita-se, também, que, em Ambonia, os pseudobulbos de *Grammatophyllum speciosum* são ingeridos em pasta, para

combater vermes e prevenir tumores malignos. O suco de folhas frescas de *Dendrobium ovatum* pode ser um excelente laxativo, sendo utilizado pelos nativos de Madras (Dunsterville & Garay, 1959).

A orquídea mais conhecida e mais utilizada mundialmente em escala industrial é a *Vanilla planifolia*, que já era utilizada pelos astecas entre os séculos XII e XIV. As cápsulas são colhidas, secas e curadas para produzir a *vanillina* (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>), que é o princípio ativo da vanila, cujo nome comercial atualmente é: extrato de *Vanilla*, e usada para aromatizar chocolates, doces e tortas. Existem, porém, diferenças entre o produto natural e o extrato industrializado. Sugere-se que *Vanilla planifolia* tenha sido usada primeiro como droga e só mais tarde descobriram-se algumas de suas propriedades na alimentação. Ela foi introduzida na Europa logo após a descoberta da América (May et al., 2008).

Menciona-se, ainda, a importância das orquídeas na indústria horticultural, que é indiscutível graças, sobretudo, à beleza, ao exotismo, às fragrâncias e à variedade de suas flores. Hoje, são gastos, anualmente, em todo o mundo, sobretudo na Ásia, Europa e Estados Unidos, milhões de dólares, aplicados na cultura e na propagação, visando obter flores cada vez melhores, maiores e mais deslumbrantes (Araújo, 2008; May et al., 2008).

### **2.3 Tipos de *Laelias***

Comercialmente, vinte variedades são exploradas, porém, apenas seis são apreciadas e procuradas, todas elas com peculiaridades que as diferenciam pela coloração do labelo ou a proeminência de suas estrias na região central da flor (Figura 2).

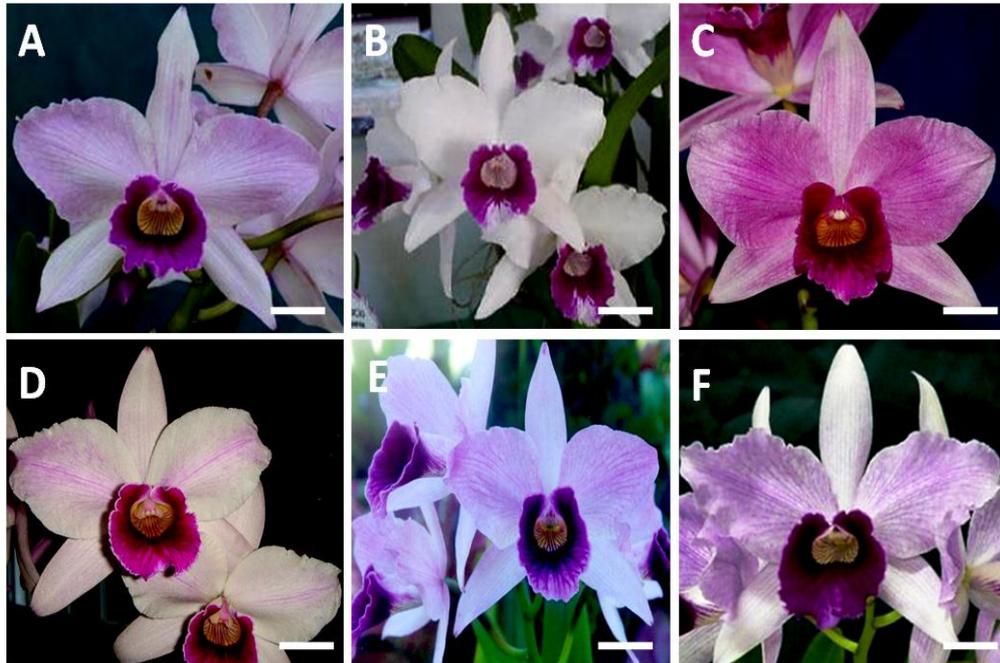


FIGURA 2 Algumas variedades de *Laelia purpurata*. (A) *Laelia purpurata* ‘linda’; (B) ‘Ana Clara’; (C) ‘Claudio Deschamps’; (D) ‘Magnífica’; (E) ‘Lapurpurata’; (F) ‘Esplendor’; Fonte: [www.orquidariocarlosgomes.com](http://www.orquidariocarlosgomes.com). Barras: 2 cm.

#### 2.4 Problemas fitossanitários em Orchidaceae

A propagação de orquídeas pode ser tanto vegetativa quanto por meio de sementes. Essas, embora produzidas em grande quantidade, apenas germinam na natureza se houver associação simbiótica com fungos micorrízicos, pois não possuem endosperma funcional. Por conta dessa particularidade, as orquídeas apresentam desenvolvimento vegetativo lento, visto que a divisão de uma muda leva, no mínimo, dois anos, o que torna muito lenta e onerosa a multiplicação de grandes quantidades para comercialização de mudas. A multiplicação das orquídeas por sementes também é demorada e, dos 2,5 milhões de sementes produzidas em uma cápsula, somente 5% germinam (Pereira et al., 2003).

A cultura assimbiótica, ou sementeira *in vitro* de orquídeas, constitui técnica relevante, do ponto de vista comercial e também ecológico. As plantas produzidas dessa forma são altamente interessantes para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental. A cultura assimbiótica resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos simbiotes (Martini et al., 2001).

Outro agravante para a multiplicação vegetativa (convencional) é o seu hábitat (florestas, bosques, matas, etc.) que pode ocorrer a disseminação de microorganismos sobre suas folhas e raízes, os quais colonizam seus tecidos e diminuem a área fotossintética, levando à senescência prematura da planta (Toscano & Moraes, 2002).

No Brasil, a questão fitossanitária de plantas ornamentais tem sido objeto de alguns trabalhos (Almeida et al., 1997; Lins & Coelho, 2004), no entanto, as flores ornamentais estão pouco inseridas nesse contexto. Assis (2002) relata doenças e pragas em helicônias e Coelho & Warumby (2002), doenças e pragas em flores ornamentais tropicais na zona da mata de Pernambuco.

De acordo com Lins & Coelho (2004), os agravantes para a disseminação de doenças, principalmente as fúngicas em plantas ornamentais, é a utilização de mudas não certificadas, o que aumenta a incidência e a severidade dos problemas fitossanitários.

Para eliminar as patologias e acelerar os processos de multiplicação em larga escala de plantas ornamentais, em especial as orquídeas, cujo desenvolvimento é lento, vêm-se utilizando, desde a década de 1950, técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos *in vitro* (micropropagação), a fim de se obter material de multiplicação com alta qualidade fitossanitária e livre de patógenos, itens esses requeridos pelos produtores (Campos, 1996).

A multiplicação e a produção de mudas de orquídeas são realizadas principalmente em laboratórios, em vista da exigência de condições assépticas durante seu desenvolvimento. A demanda crescente por plantas e flores de orquídeas tem obrigado os produtores a comprarem mudas de laboratórios especializados. Os investimentos em material, infraestrutura e mão-de-obra especializada obrigam esses laboratórios a minimizarem as perdas e a maximizarem a utilização dos fatores envolvidos na produção (Stancato et al., 2001).

Na Figura 3 pode-se observar o aspecto das plantas de orquídeas infectadas por algumas doenças de grande importância econômica. Em produção comercial, patógenos podem levar a grandes perdas da produção, por comprometerem processos básicos à sobrevivência das plantas, como a capacidade fotossintética, por meio da diminuição da área foliar (Lins & Coelho, 2004).

A antracnose, cujo agente causal é *Colletotrichum gloeosporioides*, é uma doença fungica que pode afetar qualquer parte da planta, mas, sobretudo, folhas, principalmente quando as injúrias são provocadas pela incidência de raios solares, frio ou ferimentos físicos. Os sintomas iniciais são constituídos por manchas arredondadas, grandes e de coloração castanho-marrom. Em seguida, as manchas tornam-se deprimidas e sobre elas surgem pequenos corpos de frutificação negros e elevados, responsáveis pela produção de massas de esporos fúngicos (Figura 3 A).

Na cercosporiose, que tem como agente causal a *Cercospora odontoglossi*, o fungo provoca inicialmente, na superfície superior (adabaxial), manchas cloróticas que posteriormente tornam-se negras e pardas (Figura 3 B).

A ferrugem causada pelo fungo *Sphenospora kevorkianii* é uma doença fácil de ser diagnosticada, devido à presença de pequenas pústulas de coloração alaranjada na face abaxial das folhas, constituídas por massas de esporos

pulverulentas do fungo. É uma doença frequente em espécies de *Oncidium* sob condições de alta umidade (Figura 3 C).

As manchas foliares causada pelo fungo *Phoma* sp. são manchas de coloração parda a negra em folhas de orquídeas, podendo ser circulares ou ovaladas. Por vezes, estão também associadas a sintomas de secamento apical ou das margens foliares, confundindo-se com aqueles provocados pela antracnose. Dessa maneira, o diagnóstico do fungo presente só pode ser feito em condições de laboratório (Figura 3 D).

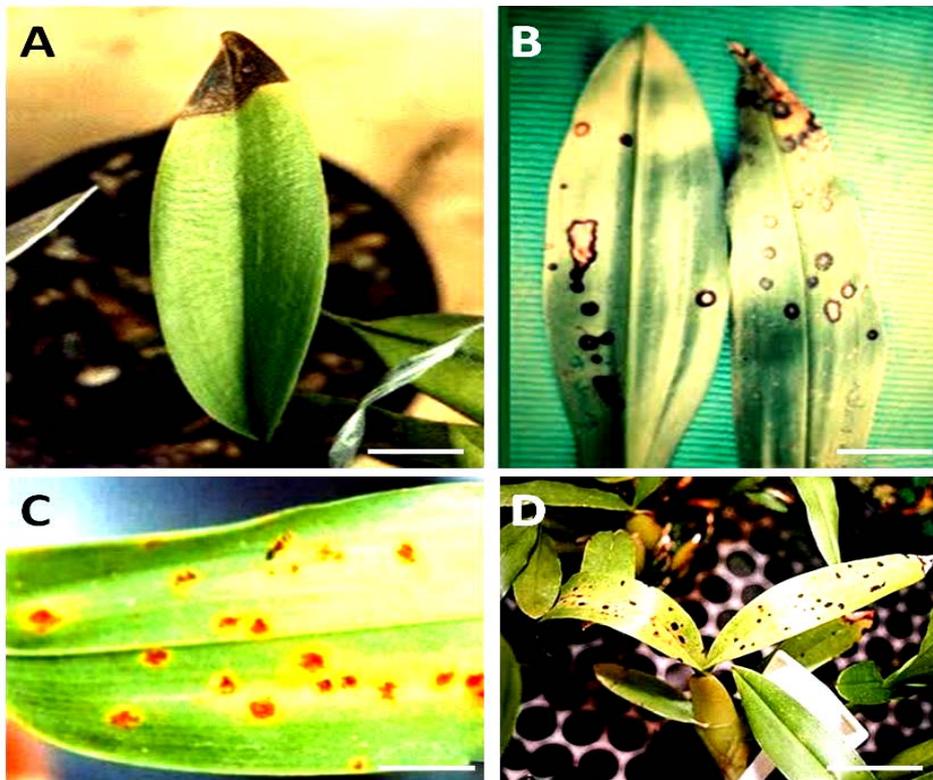


FIGURA 3 (A) *Colletotrichum gloeosporioides* (antracnose). (B) *Cercospora odontoglossi* (cercosporiose). (C) *Sphenospora kevorkianii* (ferrugem). (D) *Phoma* sp. (mancha foliar). Barras: 10 cm.

## 2.5 Morfogênese *in vitro*

O controle da morfogênese utilizando tecidos cultivados *in vitro* é feito por meio da indução exógena de estímulos químicos e de substratos diversos aliada à intensidade e à qualidade da luz. A retirada de fragmentos de tecidos de um organismo íntegro e sua transferência para meio de cultura contendo nutrientes e reguladores de crescimento apropriados trazem como consequência a liberação de suas células do controle, as quais se encontravam nesse organismo e as expõem a uma condição alterada, permitindo que o potencial de divisão celular possa expressar-se de novas formas, podendo levar à formação de novas estruturas organizadas, num processo morfogenético que ocorre de *novo* (Handro & Floh, 1990).

As plantas utilizam sinalizadores para promover determinados padrões de crescimento e estes respondem à qualidade de luz, crescendo sob uma região limitada no espectro visível e exibindo morfologia e fisiologia determinadas pelas variações ocorridas neste espectro (Almeida et al., 2004). A dependência das plantas à luz é um processo complexo que envolve a ação combinada de fotorreceptores que controlam estádios variados no desenvolvimento.

Esses fotorreceptores, que são os fitocromos e criptocromos, são estimulados por meio do comprimento de onda (fótons fotossinteticamente ativos) que chega à superfície da planta (folha, caule, flor, etc.), desencadeando, assim, uma sequência de síntese de enzimas que são responsáveis pela modulação e arquitetura da planta. Uma dessas enzimas que são estimuladas pela luz é a fenilalanina amônia-liase (PAL; EC 4.3.1.24), que é uma enzima da via dos fenilpropanoides responsável pelo processo de lignificação e biossíntese de flavonas e flavonoides a partir da fenilalanina. Nas plantas, esta enzima está localizada tanto no citoplasma quanto nas organelas. O metabolismo dos fenilpropanoides é definido como a sequência de reações envolvendo a

conversão da fenilalanina para ativar o ácido cinâmico, o qual é precursor de lignina (Hahlbrock & Scheel, 1989; Taiz & Zeiger, 2006).

Sua atividade é influenciada por vários fatores externos e internos, como hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção por patógenos e ferimentos. A invasão de fungos, por exemplo, induz a transcrição do RNAm que codifica para essa enzima, aumentando assim sua síntese de *novo* e, conseqüentemente, estimulando a produção de substância fenólica (Taiz & Zaiger, 2006).

Estudos da qualidade e intensidade da luz no mecanismo de ação da PAL ainda não são claros, bem como os efeitos do espectro e de níveis de irradiância no crescimento de plântulas durante o cultivo *in vitro*. Alguns estudos revelam que, com a variação na qualidade da luz, pode-se manipular o crescimento *in vitro* de diversas espécies, de maneira alternativa à adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura (Nomura et al., 2009).

A qualidade espectral afeta também estruturalmente a anatomia das folhas, parecendo exercer maiores efeitos durante a expansão foliar, exibindo alto grau de plasticidade, tanto anatômico como fisiológico (Dousseau et al., 2008).

## **2.6 Micropropagação e uso de silício**

A essencialidade do silício (Si) como elemento benéfico para as plantas ainda não está bem esclarecida (Eptein & Bloom, 2006). Entre os vários efeitos e aplicação na agricultura, a presença desse elemento tem sido relacionada principalmente ao aumento da resistência contra pragas e doenças e tolerância à toxidez. Estruturalmente, proporciona mudanças anatômicas nos tecidos, como células epidérmicas com a parede celular mais espessa, devido à deposição de sílica, favorecendo a melhor arquitetura das plantas, além de aumentar a capacidade fotossintética e resistência às doenças (Luz et al., 2006; Gomes et al., 2008).

Com base nos excelentes resultados obtidos de plantas em campo, diversos trabalhos foram realizados com a utilização do silício no meio de cultura para a micropropagação de inúmeras espécies. Dessa forma, alterações na composição dos meios de culturas com uso de silício são uma estratégia para aumentar o número de plantas sobreviventes em processo de aclimatização, por diminuir a transpiração (Silva, 2007).

Segundo Braga et al. (2009), a adição de silicato de sódio ao meio de cultura na micropropagação de morangueiro resulta em aumento da espessura dos tecidos do limbo foliar, deposição de cera epicuticular, maior teor de clorofila e aumentos significativos de matéria seca e fresca (Braga et al., 2009).

## **2.7 Uso de uréia em cultura de tecidos**

O meio de cultura utilizado na micropropagação é fator determinante para o sucesso do cultivo *in vitro* de frutíferas. A fonte de sais minerais fornecida aos explantes é extremamente importante, assim como sua concentração (Villa et al., 2009). O nitrogênio é um dos principais nutrientes essenciais e ativos, sendo absorvido, principalmente, na forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ).

Por ser constituinte de várias biomoléculas essenciais, como aminoácido, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outros, sua assimilação se dá em diversos processos metabólicos da planta (Eptain & Bloom, 2006). Sabe-se que as fontes de nitrogênio são de grande importância, tanto no crescimento quanto na diferenciação de células e tecidos cultivados *in vitro*.

Estudos têm sido realizados no intuito de testar fontes alternativas de nitrogênio, entre elas a ureia ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ), no meio de cultura (Fráguas et al., 2003) e, ao mesmo tempo, verificar a viabilidade técnica dessa substituição. Existem poucos trabalhos realizados com ornamentais utilizando fontes alternativas de nitrogênio no cultivo *in vitro*, visto que a uréia pode promover fitotoxidez (Fráguas et al., 2003; Villa et al., 2009).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; IMEMES, S. L. **Problemas fitossanitários em plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Biológico de Campinas, 1997.
- ALMEIDA, L. P.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; ZANELA, S. M.; VIEIRA, C. V. Crescimento inicial de plantas de *Cryptocaria aschersoniana* Mez. submetidas a níveis de radiação solar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 83-88, jan./fev. 2004.
- ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; CARVALHO, J. G. de; ZARRAGA, D. Z. A. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, Maringá, v. 31, n. 1, p. 35-39, mar. 2009.
- ARORA, S.; KAPIL, R. N. Comparative study of pollinia of two species of Pholidota Lindl. **Phytomorphology**, New Delhi, v. 39, n. 4, p. 343-352, 1989.
- ASSIS, S. M. P.; MARINHO, R. R. L.; GONDIM JÚNIOR, M. G. C.; MENEZES, M.; ROSA, R. C. T. **Doenças e pragas de helicônias**. Recife: UFRPE, 2002.
- ÁVILA-DIAZ, I.; OYAMA, K.; GÓMEZ-ALONSO, C.; SALGADO-GARCIGLIA, R. In vitro propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, n. 3, p. 335-343, Dec. 2009.
- BAKER, G. R. A pleurothallid primer. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v. 60, n. 11, p.1082-10833, 1991.
- BARROS, F.; BATISTA, N. A. J. Variedades, formas e outras categorias infraespecíficas em orquídeas brasileiras. In: BARROS, F.; KERBAUY, B. G. **Orquidologia sul-americana: uma compilação científica**. São Paulo: SMA, 2004. p. 99-106.
- BENZING, D. H. Why is orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedlings mycotrophic? **Selbyana**, Sarasota, v. 5, n. 3/4, p. 241-242, 1981.

- BRAGA, F. T.; NUNES, C. F.; FAVERO, A. C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G.; CASTRO, E. M. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 128-132, fev. 2009.
- CAMPOS, D. M. **Orquídea**: manual prático de cultura. São Paulo: Correa, 1996. 143 p.
- COELHO, R. S. B.; WARUMBY, J. F. Doenças e pragas de plantas ornamentais detectadas na Zona da Mata de Pernambuco. In: FLORICULTURA em Pernambuco. Recife: SEBRAE-PE, 2002. p. 67-69.
- DRESSLER, L. R. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides, 1993.
- DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A.; ARANTES, L. O.; OLIVEIRA, D. M. O.; NERY, F. C. Germinação de sementes de tanchagem (*plantago tomentosa* lam.): influência da temperatura, luz e substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 438-443, mar./abr. 2008.
- DUNSTERVILLE, G. C. K.; GARAY, L. A. **Venezuelan orchids illustrated I**. London: A. Deustch, 1959. 448 p.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, J. A. **Nutrição mineral de plantas**: princípios e perspectivas. Londrina: Planta, 2006. 403 p.
- FRÁGUAS, C. B.; CHAGAS, E. A.; FERREIRA, E. M.; CARVALHO, J. G.; PASQUAL, M. Micropropagação de gloxínia em diferentes concentrações de nitrato de amônio e uréia. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 811-815, jul./ago. 2003.
- GOMES, F. B.; MORAES, J. C.; SANTOS, C. D. dos; ANTUNES, C. S. Uso de silício como indutor de resistência em batata a *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 185-190, mar./abr. 2008.
- HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 40, p. 347-369, 1989.

HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa/CNPH, 1990. p. 203-212.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução a taxonomia vegetal. 13. ed. São Paulo: Nacional, 2002.

KRESS, J. W. The systematic distribution of vascular epiphytes: an update. **Selbyana**, Sarasota, v. 9, p. 2-22, 1986.

LANGRAF, P. R. C.; PAIVA, P. D. O. Produção de flores cortadas no Estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 120-126, jan./fev. 2009.

LINS, S. R. O.; COELHO, R. S. B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 332-335, maio/jun. 2004.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LUZ, J. M. Q.; GUIMARÃES, S. T. M. R.; KORNDÖRFER, G. H. Produção hidropônica de alface em solução nutritiva com e sem silício. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 295-300, jul. 2006.

MARTINI, P. C.; WILLADINO, L.; ALVES, G. A.; DONATO, V. M. T. S. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 10, p. 1319-1324, out. 2001.

MAY, A.; MORAES, A. R. A.; CASTRO, C. E. F.; JESUS, J. P. F. F. **Baunilha**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/tecnologias/baunilha/baunilha.htm>>. Acesso em: 29 abr. 2008.

NAYAK, N. R.; SAHOO, S.; PATNAIK, S.; RATH, P. S. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Azrobium aloifolium* (L.) SW. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orquidaceae). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 94, p. 107-116, Apr. 2001.

NOMURA, E. S.; LIMA, J. D.; RODRIGUES, D. S. R.; GARCIA, V. A.; FUZITANI, E. J.; SILVA, S. H. M. G. da. Crescimento e produção de antúrio cultivado sob diferentes malhas de sombreamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1394-1400, ago. 2009.

OREN-SHAMIR, M.; GUSSAKOVSKY, E. E.; SHPIEGEL, E.; NISSIM-LEVI, A.; RATNER, K.; OVADIA, R.; GILLER, Y. U. E.; SHAHAK, Y. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 76, n. 3, p. 353-361, May 2001.

PEREIRA, O. L.; ROLLEMBERG, C. L.; KASUYA, M. C. M. Association des mycorhizies dans les orchidees - perspectives d'utilisation dans les programmes de propagation symbiotique. **Journal des Orchidees**, Gand, v. 55, p. 24-27, 2003.

PINHEIRO, F.; BARROS, F.; LOURENÇO, A. R. O que é uma orquídea. In: BARROS, F. de; KERBAUY, G. B. (Org.). **Orquidologia sul-americana: uma compilação científica**. São Paulo: SMA, 2004. p. 11.

SILVA, D. P. **Meios de cultura e fontes de silício no desenvolvimento in vitro de gérbere**. 2007. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA JÚNIOR, J. M. [*Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith]: propagação, obtenção de protoplastos e aspectos anatômicos. 2007. 113 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOARES, J. D. R.; ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; ASSIS, F. A. Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento in vitro de plântulas de orquídea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 772-777, maio/jun. 2009.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes in vitro e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 25-33, 2001.

STANCATO, G. C.; FARIA, R. T. *In vitro* growth and mineral nutrition of lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem (Orchidaceae). I: Effects of macro and microelements. **Lindleyana**, Palm Beach, v. 11, p. 41-43, 1996.

TAIZ, L.; ZAIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TOSCANO, L. A. de B.; MORAES, M. M. de. **Saiba mais sobre orquídeas**. 2002. Disponível em: <<http://www.jbrj.gov.br/saibamais/orquideas>>. Acesso em: 4 out. 2009.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; FRÁQUAS, C. B.; REZENDE, J. C. Utilização de nitrato de amônio e de uréia como fontes. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 5, p. 365-370, set./out. 2009.

WAECHTER, J. L. Epiphytic orchids in eastern subtropical south america. In: WORLD ORCHID CONFERENCE, 15., 1998, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Turriers: Naturalia, 1998. p. 332-334.

## CAPÍTULO 1

Repostas metabólicas e morfoanatômicas de plântulas de *Laelia purpurata* 'carnea' micropropagadas em diferentes ambientes e malhas coloridas

### 1 RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar as respostas metabólicas e morfoanatômicas em plântulas de *Laelia purpurata* 'carnea' micropropagadas submetidas a diferentes intensidades e qualidade espectral de luz. Plântulas de *L. purpurata* 'carnea' cultivadas expostas diretamente à luz dos ambientes da casa de vegetação e sala de crescimento foram utilizadas como controle. O material vegetal utilizado neste experimento foi preparado e analisado por microscopia óptica. A intensidade e a qualidade espectral de luz e os ambientes interferiram de forma significativa em todos os parâmetros analisados, após 120 dias de subcultivo. O comprimento de parte aérea e o maior teor de matéria seca foram observados em plântulas cultivadas em sala de crescimento sob malha fotoconversora vermelha. Menores comprimento e teor de matéria seca foram observados em ambos os ambientes, sob malha fotoconversora azul. Maior doseamento de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e relação (AR/AST), foi observado em casa de vegetação sob malha fotoconversora vermelha e azul. As plântulas cultivadas sob malha fotoconversora azul apresentaram aumento significativo da atividade da PAL. Nas secções transversais e paradérmicas das folhas, a malha fotoconversora azul proporcionou incrementos às variáveis analisadas. Em secções transversais de raízes, o ambiente de casa de vegetação proporcionou maior diferenciação dos tecidos, permitindo, assim, maior condutividade hidráulica.

Palavras-chave: anatomia vegetal, fenilalanina amônia-liase, malhas fotoconversoras, orquídea.

## CHAPTER 1

Metabolic and morpho-anatomical responses of seedlings of *Laelia purpurata* 'carnea' micropropagated in different environments and colored nets

### 2 ABSTRACT

This work aimed at verifying metabolic and morpho-anatomical responses of seedlings of *Laelia purpurata* 'carnea' micropropagated and submitted to different intensities and spectral quality of light. Cultivated seedlings of *L. purpurata* 'carnea' that were directly exposed to the light in environments of the greenhouse and growth chamber were used as control. The plant material used in this experiment was prepared and analyzed by optical microscopy. The intensity and spectral quality of light environments interfered significantly in all parameters after 120 days of subculture. The length of shoots and the highest dry matter content were observed in seedlings cultivated in a growth chamber under red shading nets. Minor length and dry matter content were also observed in both environments, or blue shading nets. A greater dose of soluble sugars (TSS), reducing sugars (RS) and ratio (AR / AST) was viewed in a greenhouse under shading nets red and blue. The plant embryos grown under blue shading nets presented a significant increase in PAL activity. In the transversal sections and paradermic of the leaves, the blue shading nets provided increments to the variable studied. In transversal sections of the roots, the greenhouse environment provided greater differentiation of tissues, thus allowing high hydraulic conductivity.

Key words: plant anatomy, phenylalanine ammonia-lyase, shading nets, orchid.

### 3 INTRODUÇÃO

A luz é um fator ambiental de fundamental importância para as plantas, pela ação direta ou indireta na regulação de seu crescimento e desenvolvimento. Ou seja, a planta utiliza essa informação para modular respostas, para controlar sua arquitetura e determinar o momento do florescimento. As respostas morfofisiológicas das plantas não dependem apenas da presença, atenuação ou ausência da luz, mas também da variação em qualidade luminosa (Larcher, 2004).

Várias técnicas para manipulação da qualidade da luz têm sido utilizadas. Alguns trabalhos mostram efeitos marcantes sobre a fotomorfogênese de plantas, seja pela iluminação artificial (Pons & Berkel, 2004), por coberturas de solo, tintas ou coberturas coloridas para casas de vegetação ou malhas que modificam a radiação por elas transmitida (Oren-Shamir et al., 2001; Shahak et al., 2004; Martins et al., 2009).

Segundo Oren-Shamir et al. (2001), a utilização da malha fotoconversora vermelha é capaz de alterar o espectro da luz, reduzindo as ondas azuis, verdes e amarelas e acrescentando as ondas na faixa espectral do vermelho e vermelho-distante. Já a malha fotoconversora azul é capaz de mudar o espectro da luz, reduzindo as ondas na faixa do vermelho e vermelho distante e acrescentando as ondas azuis.

As respostas de plantas, em especial as ornamentais, quanto às alterações na modulação da qualidade da luz, incluem aumentos da área foliar total em *Codiaeum variegatum* cultivado sob malha de sombreamento vermelha (Gaffney, 2004), aumento do comprimento do entrenó em *Chrysanthemum*

cultivado sob filme de polietileno azul (Oyaert et al., 1999), aumento da altura e do número de folhas em *Dracaena marginata* sob malha de sombreamento vermelha (Kobayashi et al., 2006) e alterações na anatomia foliar de plantas de *Dendranthema grandiflorum* cv. Raga submetidas a sombreamento por malhas coloridas (Braga et al., 2009).

Alterações na anatomia foliar podem ser influenciadas pela radiação recebida durante o crescimento, uma vez que a folha é um órgão plástico e sua estrutura interna adapta-se às condições externas do ambiente (Hanba et al., 2002; Schluter et al., 2003).

No entanto, a plasticidade adaptativa das espécies vegetais à radiação solar depende do ajuste do aparato fotossintético, a fim de possibilitar conversão altamente eficiente de energia radiante em carboidratos e, conseqüentemente, promover maior crescimento (Alvarenga et al., 2003).

O aparato fotossintético dos vegetais é capaz de chegar a uma ótima eficiência em relação à absorção e à utilização da luz visível. Entretanto, a forte radiação induz uma quantidade de energia fotoquímica na folha maior que a capacidade de utilização dessa energia na fotossíntese, sobrecarregando os processos fotossintéticos e resultando em uma baixa utilização quântica e em rendimentos assimilatórios baixos (fotoinibição) (Larcher, 2004; Taiz & Zeiger, 2006).

Segundo Huber & Rodriguez-Maia (2008), os vegetais se protegem do excesso de radiação por meio da produção de pigmentos (carotenoides, antocianinas, flavonoides), do aumento na atividade de enzimas (fenilalanina amônio liase, peroxidase) e do aumento na espessura das células epidérmicas (ligninas).

Flavonas e flavonóis são compostos fenólicos derivados da rota da fenilalanina, os quais são produzidos em grandes concentrações nas folhas,

quando estão submetidas ao excesso de radiação principalmente a UV-B (280-320 nm), (Schurger et al., 1997; Taiz & Zeiger, 2006).

Assim como todos os fatores que influenciam o desenvolvimento e o crescimento da planta, a resposta à qualidade e à intensidade da luz também depende da espécie em estudo Orian-Shamir et al. (2001). Portanto, seus efeitos devem ser estudados em função da espécie e da cultivar.

Pelo exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar aspectos do metabolismo, crescimento e morfoanatomia no cultivo *in vitro* de *Laelia purpurata* 'carnea' sob diferentes malhas de sombreamento.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Local do experimento**

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e casa de vegetação localizados no Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, Brasil a 21°14'S, 45°17'W e 918 m de altitude, entre janeiro e junho de 2009. Segundo Köppen (1948), a região possui duas estações definidas: seca, com temperaturas mais baixas, de abril a setembro, e chuvosa, com temperaturas mais elevadas, de outubro a março.

As condições de sala de crescimento foram fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C e radiação de 52 MJ. m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> (LI-200SA; Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes.

As condições de casa de vegetação foram temperatura (16° a 20°C) e fotoperíodo (12 a 14 horas) de acordo com dados fornecidos pela estação meteorológica da UFLA, radiação 2,56 MJ. m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup>(LI-200SA; Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA).

### **4.2 Origem do material vegetal**

Sementes de *Laelia purpurata* 'carnea' foram gerninadas *in vitro* em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com a metade da concentração dos sais, solidificado com 6 g L de ágar, 30 g L<sup>-1</sup> de açúcar e pH ajustado para 5,8 e autoclavado a 121°C e 0,1 atm por 20 minutos.

Após três meses da inoculação, as plântulas já estavam com 1 cm de comprimento, quando foram inoculadas em meio MS padrão acrescido de 2,68 µmol de ANA + 13,72 µmol de GA<sub>3</sub> + 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado + 100 g.L<sup>-1</sup> de polpa de banana (nanica), solidificado com 6 g L de ágar, 30 g L de açúcar e pH ajustado para 5,8 e autoclavado a 121°C e 0,1 atm, por 20 minutos.

#### **4.3 Cultivo *in vitro* sob malhas fotoconversoras**

Os materiais vegetais de *L. purpurata* 'carnea' com 1 cm de comprimento foram cultivados em casa de vegetação e sala de crescimento, nas seguintes condições: 1) expostos diretamente à luz ambiente; 2) malha fotoconversora vermelha 50%; 3) malha fotoconversora azul 50% e 4) malha sombrite preta 50%. Os materiais vegetais cultivados em casa de vegetação foram dispostos diretamente sob bancadas e os dados de fotoperíodo e temperatura aos quais os tratamentos foram submetidos variaram de acordo com as condições climatológicas de Lavras, MG. As malhas coloridas utilizadas foram fornecidas pela empresa Polysac Plastic Industries®.

Os tratamentos em casa de vegetação foram os seguintes: casa de vegetação expostos diretamente a luz ambiente (CV); sombreados sob malha fotoconversora vermelha (CVV); sombreados com malha fotoconversora azul (CVA) e sombreados com malha sombrite preta (CVP).

Os materiais vegetais em sala de crescimento foram dispostos em estantes de aço com sistema de iluminação artificial fornecida por lâmpadas fluorescentes e os dados de fotoperíodo e temperaturas foram controlados por meio de um *timer* acoplado ao sistema de energia. A intensidade da radiação foi

mensurada diariamente por meio de três sensores de radiação acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Licor. Neb).

Os tratamentos em sala de crescimento foram os seguintes: sala de crescimento expostos à luz ambiente (SC), sombreados sob malha fotoconversora vermelha (SCV), sombreados sob malha fotoconversora azul (SCA) e sombreados com malha sombrite preta (SCP).

#### **4.4 Análise de crescimento**

Após 120 dias de cultivo, as plântulas foram avaliadas com base nos seguintes parâmetros de crescimento: número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento da parte aérea (CPA, cm) e biomassa seca total (BST, g).

#### **4.5 Doseamento de açúcares solúveis totais (AST) e açúcares redutores (AR)**

No presente trabalho, foi realizada a construção de uma curva padrão (Figura 1; Tabela 1) para o doseamento de açúcares solúveis totais em amostras vegetais, baseando-se no método proposto por Hodge & Hofreiter (1962).

Para a determinação da curva padrão para açúcares solúveis totais os seguintes reagentes foram utilizados: reagente Antrona; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e glicose 60 mg mL<sup>-1</sup> ou 0,333 mM. Foram pesados 40 mg de antrona, colocados em um béquer e adicionado 1,0 mL de água destilada e, posteriormente, 20 mL de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Primeiramente, a solução de glicose foi adicionada aos tubos de ensaio e, logo depois, o reagente Antrona.

TABELA 1 Procedimento para a obtenção da curva padrão de açúcares solúveis totais

	Glicose (60mg/mL)	Água	Antrona	
Tubos	(mL)	(mL)	(mL)	µg/mL AST
01	0,0	1,0	2,0	0,0
02	0,1	0,9	2,0	6,0
03	0,2	0,8	2,0	12,0
04	0,4	0,6	2,0	24,0
05	0,6	0,4	2,0	36,0
06	0,8	0,2	2,0	48,0
07	1,0	0,0	2,0	60,0

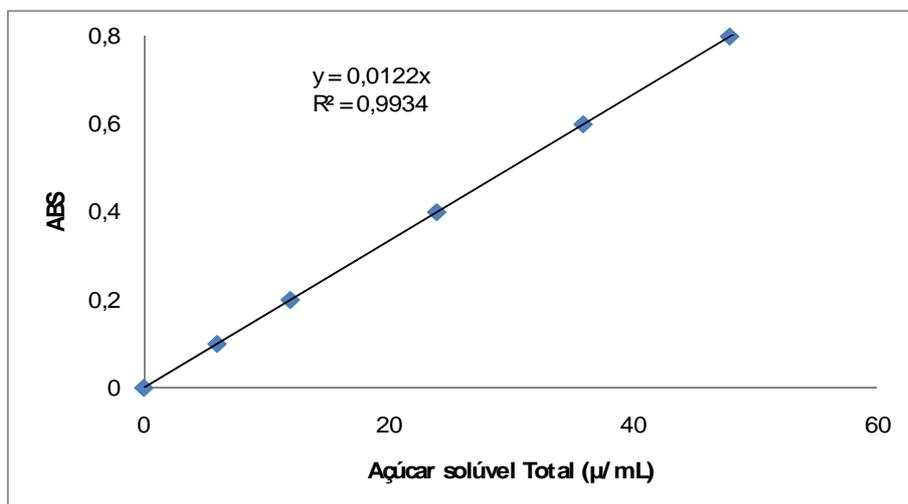


FIGURA 1 Curva padrão de açúcares solúveis totais obtidas a partir da média de absorbância das leituras em espectrofotômetro a 620 nm, pelo método da antrona.

A equação de ajuste encontrada para os teores de açúcares solúveis totais foi linear ( $y = ax + b$ ) e seu valor de  $R^2$  denota boa correlação entre a taxa de absorbância e as concentrações da solução de glicose.

Posteriormente à adição do reagente antrona aos tubos de ensaio (mantidos no gelo) contendo volumes definidos de glicose e água, estes foram agitados (em agitador do tipo vórtex) e levados ao banho-maria, à temperatura de 100°C, por 3 minutos. Os tubos foram resfriados no gelo e foi feita a leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 620 nm.

Para iniciar a leitura, retirou-se uma cubeta imersa em água destilada, secando-a em papel absorvente macio. Transferiu-se o branco para a cubeta, introduzindo-a no compartimento de amostra com as estrias do tubo voltadas para o operador. Procedeu-se à leitura dele, clicando com o botão esquerdo do mouse em Reading Blanck, aguardou-se e clicou-se com o botão direito na tela.

O valor da absorbância apareceu na tela, mas, para efeito de cálculo posterior, considerou-se o branco com valor zero. A seguir devolveu-se o líquido para o tubo de ensaio, lavou-se a cubeta com água destilada e procedeu-se à leitura da próxima amostra, identificada em teclado alfanumérico que aparece na tela do aparelho ao se clicar com o botão esquerdo do mouse sobre o número da leitura.

O doseamento de açúcares redutores (AR) foi determinado pelo método de Nelson (Hodge & Hofreiter, 1962) e a absorbância foi determinada a 540 nm. Para a determinação da curva padrão para açúcares redutores, os seguintes reagentes foram utilizados: ácido dinitrosalicílico (0,5 g); NaOH 2N (0,8 g); tartarato duplo de sódio e potássio – sal de Rochelle (15 g) e glicose (10 mM).

#### **4.5.1 Preparo dos reagentes**

##### **DNS**

Pesaram-se 0,5 g de DNS e foram adicionados 5 mL de hidróxido de sódio (NaOH) e, aproximadamente, 25 mL de água destilada. A solução foi agitada até a dissolução. Posteriormente, foram adicionados 15 g do sal de Rochelle e completado o volume para 50 mL. A solução foi armazenada em

frasco fechado e coberto com papel alumínio, já que este reagente apresenta instabilidade na presença de luz e CO<sub>2</sub>.

#### **Solução padrão de glicose**

Foi preparada uma solução estoque de glicose com 180 mg em 10 mL de água, resultando numa concentração final de 0,1 M. Para a solução de uso, foi diluído 1 mL da solução estoque em 9 mL de água destilada, numa concentração final de 10 mM. Nota-se que, no procedimento original Miller (1959), acrescentaram-se sulfito de sódio e fenol à mistura reagente. Na construção dessa curva padrão, nenhum desses compostos foi utilizado.

#### **Obtenção da curva padrão**

Primeiramente, a solução de glicose foi adicionada aos tubos de ensaio e, logo depois, o reagente DNS. A mistura foi agitada em agitador do tipo vórtex e os tubos foram levados ao banho-maria, a 100°C, por cinco minutos. Posteriormente, esses tubos foram esfriados à temperatura ambiente e o volume da solução foi completado para 5 mL (volume reacional), com a adição de água destilada. A média dos pontos foi traçada na curva (Figura 2; Tabela 2).

TABELA 2 Procedimento para a obtenção da curva padrão de açúcares redutores.

	Glicose (10Mm)	Água (mL)	AR (μmol)	DNS (mL)
Tubos	(mL)			
01	0,0	0,75	0,0	0,5
02	0,1	0,65	1,0	0,5
03	0,2	0,55	2,0	0,5
04	0,3	0,45	3,0	0,5
05	0,4	0,35	4,0	0,5

#### **Leitura no espectrofotômetro**

As leituras foram realizadas no espectrofotômetro Beckman DU série 600, em comprimento de onda de 540 nm, fixado no teclado numérico na tela do aparelho. Para dar início à leitura, retirou-se uma cubeta embebida em água destilada, secando-a em papel absorvente macio. Posteriormente, o tubo branco foi transferido para a cubeta, a qual foi introduzida no compartimento de amostra do espectrofotômetro com a tampa estriada voltada para o operador. Procedeu-se à leitura clicando-se com o botão esquerdo do mouse em Reading Blank, aguardou-se e clicou-se com o botão direito na tela.

O valor da absorbância apareceu na tela, mas, para efeito de cálculo posterior, considerou-se o branco com valor zero. A seguir, devolveu-se o líquido para o tubo de ensaio, lavou-se a cubeta com água destilada e procedeu-se a leitura da próxima amostra, identificada em teclado alfanumérico que aparece na tela do aparelho ao se clicar com o botão esquerdo do mouse sobre o número da leitura.

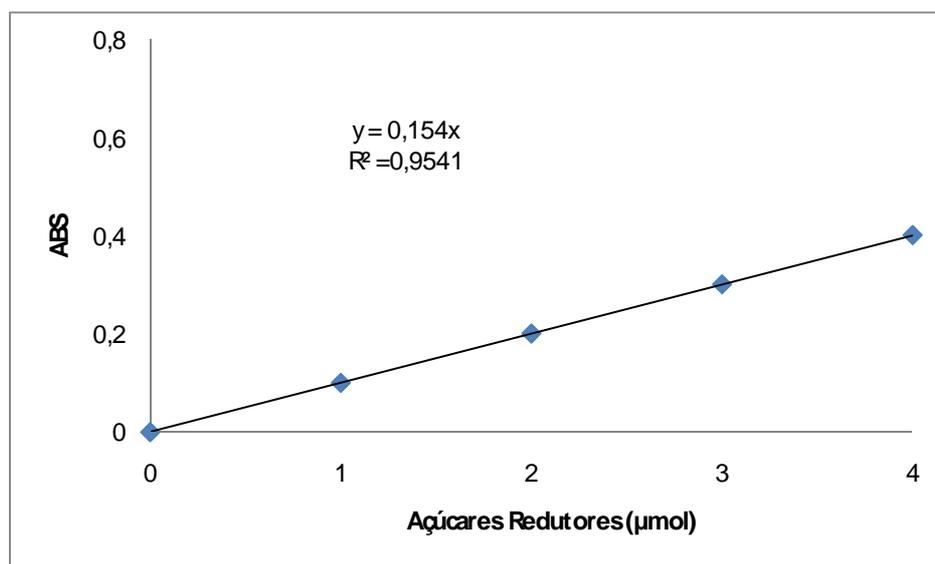


FIGURA 2 Curva padrão de açúcares redutores, obtida a partir da média de absorvância das leituras em espectrofotômetro a 540 nm, pelo método do DNS.

#### **4.6 Avaliação e determinação da atividade de fenilalanina amônia-liase PAL (EC 4.3.1.24)**

Foi verificada a atividade da enzima fenilalanina amônio liase (PAL) em folhas, baseada na técnica preconizada por Rhodes & Woollorton (1971) e a absorvância foi determinada a 290 nm.

Amostras com 100 mg dos tratamentos foram maceradas com 1mL de tampão fosfato (pH 6,0) em gral de porcelana (Chiarotti) previamente resfriado. O macerado foi transferido a tubos eppendorf de 1,5 mL, identificados e centrifugados em microcentrífuga rotativa microtubos a 14.000 rpm, por 5 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido a tubos plásticos, rotulados e armazenados à baixa temperatura. Na quantificação da PAL, utilizaram-se 6 µM de L-fenilalanina; 0,5 M de tampão TRIS-HCl (pH 8,0) e 200µL de extrato dos (esquema 1). Incubaram-se os extratos por 60 minutos, a 37°C, em banho-maria (Tecnal). Após esse período, adicionaram-se 0,05 mL de HCl 5 N e, em seguida, as concentrações de PAL foram medidas quantitativamente em 290 nm, em espectrofotômetro Shimadzu (Modelo UV1601) (esquema 1) e os resultados expressos em µg/mL de ácido cinâmico.

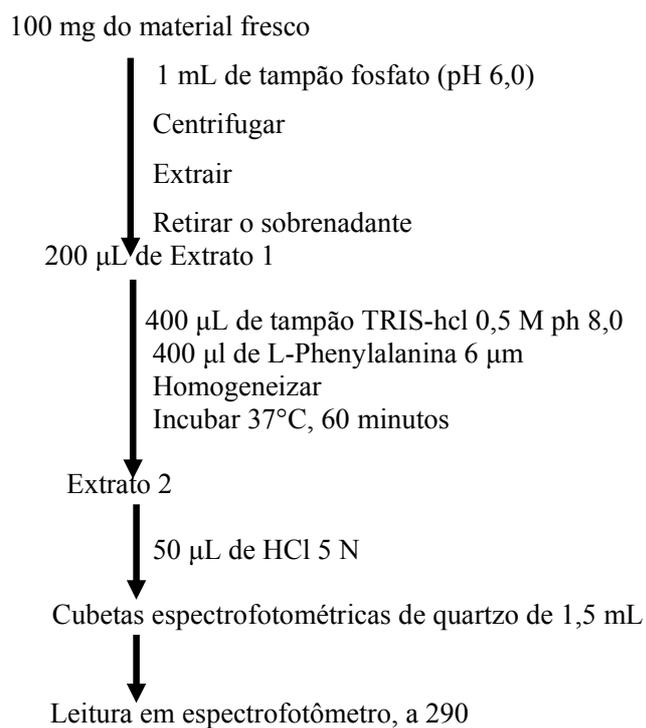
#### **Curva padrão**

A PAL teve como padrão o ácido cinâmico (Sigma). Pesaram-se 100 mg de ácido cinâmico e diluiu-se com tampão fosfato (pH 6), em balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se a solução estoque (SE) com 10 mg/mL de ácido cinâmico. Da solução estoque (SE) retirou-se a alíquota de 1mL e diluiu-se com tampão fosfato (pH 6), em balão volumétrico de 100 mL, constituindo a solução amostra (SA) com 0,1 mg/mL ou 100 µg/mL, da qual foram retiradas alíquotas de 100

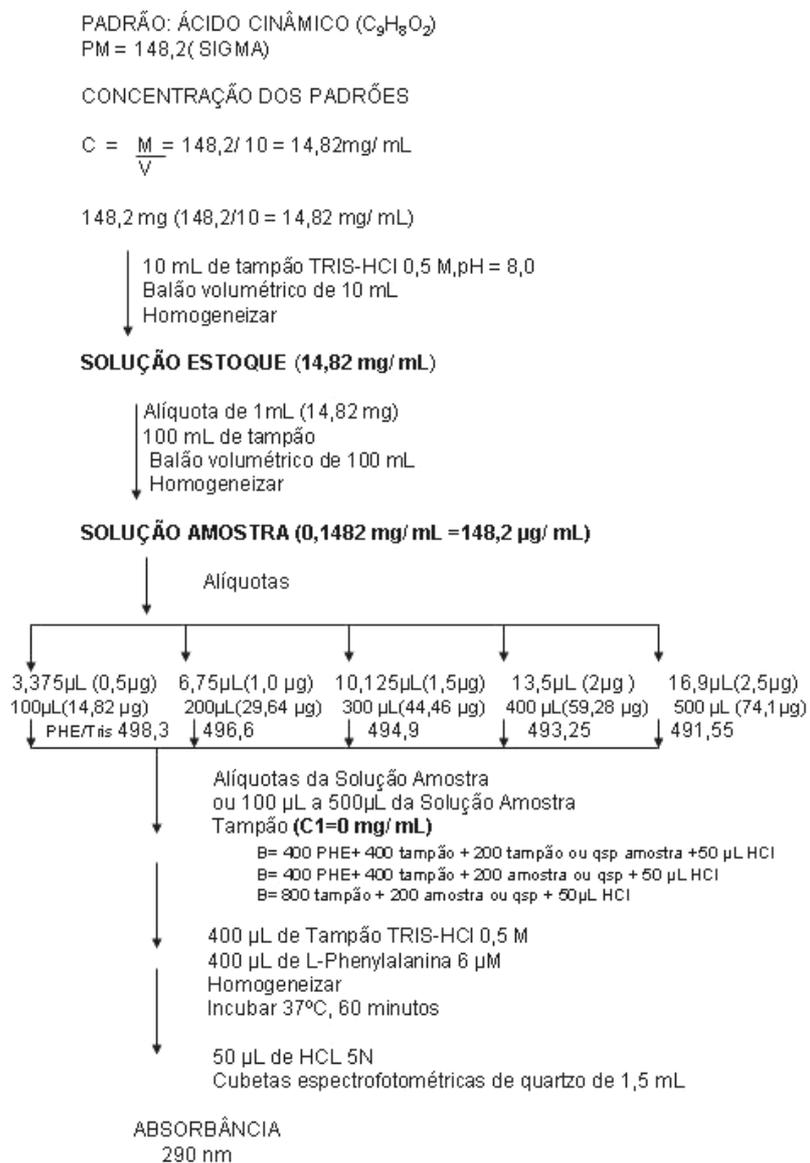
$\mu\text{L}$  a  $500 \mu\text{L}$ , com as concentrações de  $10 \mu\text{g}$  a  $50 \mu\text{g}$ , que foram adicionados a  $6 \mu\text{M}$  de L-fenilalanina,  $0,5 \text{ M}$  de tampão TRIS-HCl (pH 8,0).

Procedeu-se à homogeneização e incubaram-se os extratos por 60 minutos, a  $37^\circ\text{C}$ , em banho-maria (Tecnal). Após esse período, adicionaram-se  $0,05 \text{ mL}$  de HCl  $5 \text{ N}$  e, em seguida, as concentrações foram quantificadas em  $290 \text{ nm}$ , em espectrofotômetro Shimadzu Modelo UV1601 (esquema 2) e os resultados expressos em  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{mim}^{-1}$  de ácido cinâmico.

**ESQUEMA 1.** Metodologia de quantificação da atividade PAL ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{mim}^{-1}$  de ácido cinâmico) por doseamento espectrofotométrico.



**ESQUEMA 2.** Curva de calibração de fenilalanina amônio liase (PAL)



#### **4.7 Avaliações anatômicas**

Amostras dos tecidos foliares e das raízes de *L. purpurata* foram fixadas em F.A.A. 70% (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 70%), por 72 horas, após o que foram armazenadas em etanol 70% até a data das análises (Pereira et al., 2008). Foram feitos cortes transversais nas folhas em micrótomo de mesa e coradas com solução safrablau [safranina (1%) e azul de astra (1%) na proporção de 7:3] e cortes transversais das raízes na região a 4,5 cm, a partir da região apical das raízes. Os cortes foram corados com solução safrablau (Pereira et al., 2008). Foram confeccionadas lâminas semipermanentes com os cortes montados em lâmina e lamínula com glicerina 50% e selados com resina de nitrocelulose. As lâminas foram observadas em microscópio óptico Olympus BX60, com câmera digital (Canon A630) acoplada.

Foram realizadas fotomicrografias, as quais foram analisadas em software de análise de imagens UTHSCSA imagetool, em que foram medidas as espessuras da epiderme da face abaxial (EAB) e adaxial (EAD), espessura do mesofilo (MF) e do limbo foliar (LB) nas folhas e análise comparativa das estruturas radiculares (Pereira et al., 2008).

Foram feitos cortes paradérmicos na lâmina foliar e corados com safranina (0,1%). Procedeu-se a mesma metodologia para os cortes transversais de acordo com Pereira et al. (2008). Foram mensurados os diâmetros polar e equatorial dos estômatos, além da densidade estomática (número de estômatos por mm<sup>2</sup>).

#### **4.8 Delineamento experimental**

Para o experimento de malhas fotoconversoras, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito tratamentos e dois ambientes (8x2) e 20 repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco com 5 plântulas de 1 cm de comprimento. Os dados foram submetidos à análise

de variância e as médias foram comparadas, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o software estatístico Genes (Cruz, 2006).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas plântulas cultivadas em sala de crescimento, com exceção das submetidas sob malha fotoconversora azul, observou-se maior comprimento da parte aérea, provavelmente devido à baixa incidência de fótons fotossinteticamente ativos presente nesse ambiente (Figura 3). Diversos autores verificaram rápido aumento da superfície fotossintetizante como forma das plantas assegurarem um aproveitamento maior das baixas intensidades luminosas (Farias et al., 1997; Muroya et al., 1997).

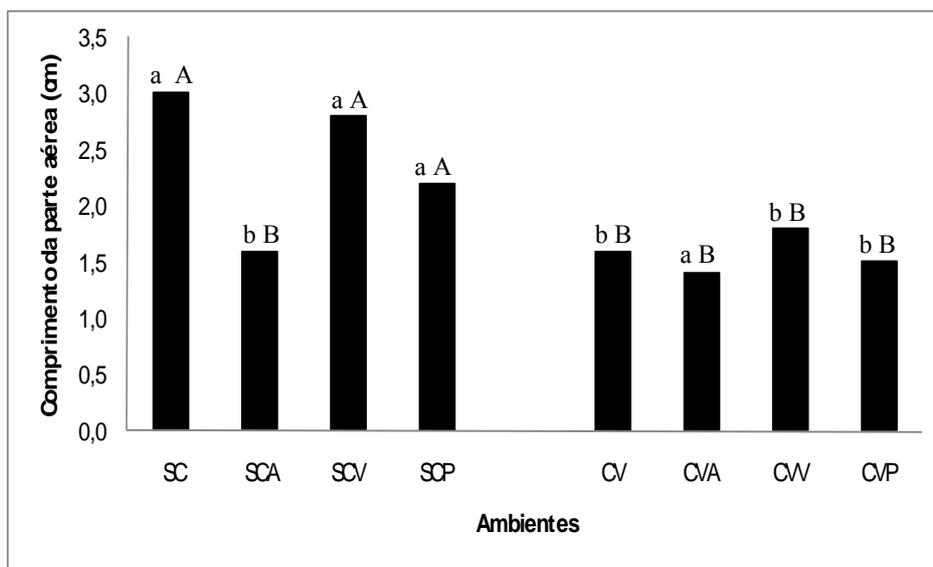


FIGURA 3 Comprimento da parte aérea de *Laelia purpurata* 'carnea' micropropagada sobre malhas coloridas, após 120 dias de subcultivo. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Considerando que o comprimento de parte aérea é uma importante variável para a estimativa do crescimento da planta, devido à relação dos órgãos fotossintetizantes com a produção biológica da planta, observa-se que o ambiente de sala de crescimento proporcionou a melhor condição para o crescimento de *L. purpurata* ‘carnea’, promovendo os maiores comprimentos de parte aérea: 3,0; 2,8 e 2,2 cm, nos tratamentos sala de crescimento sem malha, malha vermelha e preta, respectivamente (Figura 3).

As plântulas submetidas ao tratamento em sala de crescimento com malha preta apresentaram crescimentos intermediários em altura e aquelas cultivadas em casa de vegetação apresentaram as menores alturas, quando comparadas aos demais tratamentos (Figura 3), porém, não diferindo de SCA, CV, CVA e CVV.

Os tratamentos mantidos em sala de crescimento, com exceção da malha azul, promovem incrementos na parte aérea em plântulas de *L. purpurata* ‘carnea’, havendo um provável redirecionamento do fluxo de fotoassimilados dos órgãos fonte e dos sítios de armazenamento em direção ao crescimento em altura nas plântulas. Esse tipo de comportamento é característico de plantas capazes de evitar a sombra (heliófitas) (Smith & Whitelam, 1997). Porém, nessas condições, o ambiente alterou o metabolismo das plântulas de *L. purpurata* ‘carnea’, fazendo com que as mesmas tivessem comportamento à semelhança de espécies heliófitas, visto que a espécie em estudo é uma esciófita.

Os efeitos que o ambiente em sala de crescimento promove nas plântulas podem ser constatados, por exemplo, em estudos com *Cattleya walkeriana* Gardner, cultivadas *in vitro* em diferentes ambientes, realizados por Dignart et al. (2009). Esses autores verificaram resultados semelhantes para número e comprimento de folhas, tendo as plântulas cultivadas em sala de crescimento proporcionado maiores valores quando comparados com as de casa de vegetação. Dignart et al. (2009) observaram que a utilização de malhas coloridas

em casa de vegetação não resultou em diferenças significativas, quando comparado aos demais tratamentos, o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo para as plântulas cultivadas em casa de vegetação (Figura 3).

Resultados semelhantes foram obtidos por Radmann et al. (2001), ao cultivarem *Gypsophila paniculata* L., sob diferentes intensidades luminosas. Os autores observaram que todas as plântulas mantidas em casa de vegetação desenvolveram menor comprimento de parte aérea, comparadas às plântulas mantidas em sala de crescimento. O mesmo foi observado por Dignart et al. (2009), que relataram resultados semelhantes, tendo o ambiente sala de crescimento sido mais eficiente em promover crescimento de parte aérea em plântulas de orquídeas cultivadas *in vitro*.

Estes resultados podem ser explicados pela baixa luminosidade da sala de crescimento em relação à luz natural, caracterizando um crescimento estiolado dessas plântulas. Ambientes de sala de crescimento também alteram o padrão do cultivo *in vitro* em *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage (Braga et al., 2009). Os autores, comparando ambientes e malhas coloridas, verificaram aumentos no comprimento da parte aérea, número de folhas, número de raízes e comprimento de raízes em sala de crescimento.

O ambiente de casa de vegetação, independente do sombreamento, não apresentou diferença significativa para comprimento da parte aérea em plântulas de *L. purpurata* 'carnea' (Figura 3). Provavelmente, o principal fator responsável pelo reduzido crescimento das plântulas de *L. purpurata* 'carnea' em casa de vegetação foi a ocorrência de baixas temperaturas (15°C a 21°C) nesta condição de cultivo. Segundo Ávila-Díaz et al. (2009), as orquídeas são espécies de plantas para as quais a temperatura ótima para a emergência foliar é de cerca de 26°C e ótima para crescimento (assimilação) e desenvolvimento é de cerca de 24°C.

Plântulas de *L. purpurata* 'carnea' que se desenvolveram em ambos os ambientes, porém sobre malha fotoconversora azul, apresentaram os menores valores em comprimentos de parte aérea (Figura 3) e biomassa seca total (Figura 4), quando comparadas às dos demais tratamentos. Tal fenômeno pode ser explicado pelo fato da malha fotoconversora azul transmitir maior conteúdo de ondas entre os comprimentos 450 a 500 nm, em relação aos demais fotossinteticamente ativos. Essa alteração no balanço energético possivelmente desencadeia reações mediadas por receptores de luz azul (criptocromos) que estão envolvidos na inibição do alongamento do caule, especialmente das plantas esciófitas (Taiz & Zeiger, 2006).

Respostas à luz azul também foram verificadas por Tsunoyama et al. (2001), ao irradiarem plantas de *Arabidopsis thaliana* com feixes de luz no espectro do azul. Eles verificaram um encurtamento do caule de até 60%, quando comparavam as plantas irradiadas com as que não foram irradiadas. Oren-Schamir et al. (2001), comparando o desenvolvimento de plantas de *Pittosporum variegatum* sobre as malhas azul e vermelha, observaram que a malha vermelha propiciou maior crescimento dos galhos e a azul, um desenvolvimento mais lento da planta.

Outra possível explicação para o menor desenvolvimento do comprimento de parte aérea e biomassa seca total (Figuras 3 e 4) de plântulas de *L. purpurata* 'carnea' cultivadas sob malha fotoconversora azul pode ser consequência da maior transmissividade de radiação na região do espectro absorvida pelos pigmentos fotossintéticos, carotenoides ou clorofilas, levando, assim, à hipótese de fotoinibição. Segundo Nomura et al. (2009), a energia disponível para atividade fotossintética fornecida pela malha azul provocou mudanças fisiológicas ou microclimáticas negativas no ambiente de cultivo, as quais refletiram negativamente no comprimento de parte aérea e no conteúdo de matéria seca.

A biomassa seca total de *L. purpurata* ‘carnea’ foi significativamente afetada pelo uso de malhas coloridas. Tratamentos mantidos sob malha fotoconversora vermelha proporcionaram melhores resultados em ambos os ambientes (Figura 4). Esse resultado indica que a produção de biomassa total nos indivíduos dessa espécie foi influenciada tanto pela intensidade quanto pela qualidade espectral da luz.

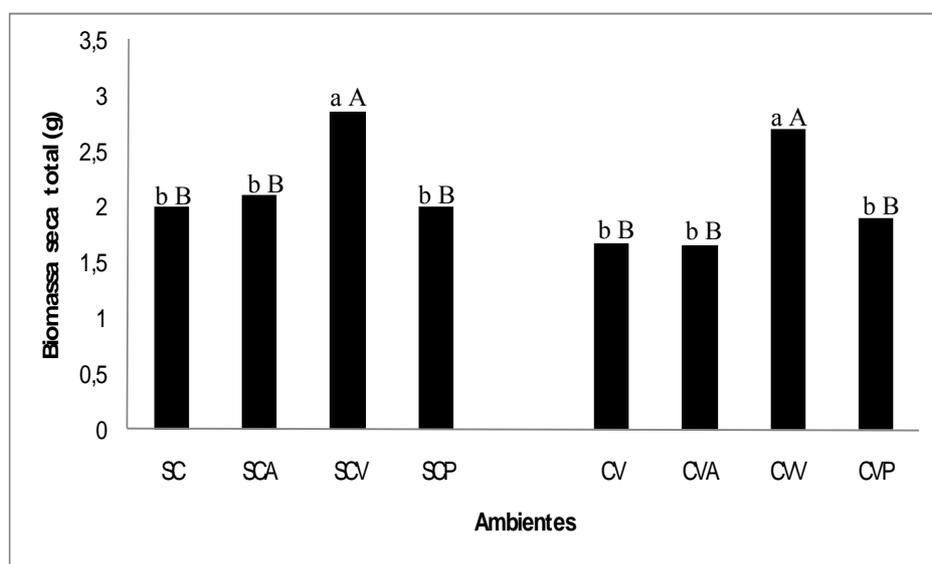


FIGURA 4 Biomassa seca total de plântulas de *Laelia purpurata* ‘carnea’ micropropagadas sobre malhas coloridas, após 120 dias de subcultivo. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

As diferenças marcantes no conteúdo de biomassa seca total dos tratamentos mantidos sob malha fotoconversora vermelha em relação aos demais mostram que a intensidade e a qualidade espectral da radiação podem ser

moduladas para a obtenção de características morfológicas, fisiológicas e metabólicas desejáveis.

Comparando o acúmulo de biomassa seca entre as plântulas cultivadas sob malhas, observou-se uma diferença significativa nas plântulas de *L. purpurara* 'carnea' sob malha fotoconversora vermelha, ou seja, a intensificação de radiação vermelha causada por essa malha estimulou o maior acúmulo de biomassa em relação às malhas preta e azul. De acordo com Gussakovsky et al. (2007), a radiação vermelha, incidindo sobre as plantas, promove aumentos da relação V/VD, a qual é um estímulo para maior conversão do fitocromo da forma ativa (F<sub>vd</sub>) para a forma inativa (F<sub>v</sub>), reduzindo a relação F<sub>vd</sub>/F<sub>total</sub>, o que causaria maior alongamento de caules. Tais informações são traduzidas em processos metabólicos que permitem às plantas alterarem seu crescimento e desenvolvimento.

Neste trabalho, o maior incremento de matéria seca da parte aérea no tratamento sob malha vermelha pode ser devido à menor relação V/VD proporcionada por esse tratamento.

Em estudos sobre o efeito de diferentes níveis de luz sobre aspectos fisiológicos do crescimento inicial de plantas jovens de *Cryptocarya aschersoniana* Mez., Almeida et al. (2004) verificaram que os maiores valores médios de biomassa seca total ocorreram em plantas cultivadas sob 30% de sombreamento em malha fotoconversora vermelha. O maior acúmulo de matéria seca foliar foi observado nas plantas cultivadas sob 30% e 50% de sombreamento em malha vermelha.

Diferentemente dos resultados observados neste trabalho, Nomura et al. (2009) observaram, ao cultivarem antúrio sombreado com malha sombrite preta 50%, que a mesma proporcionou melhores condições de cultivo e produção de hastes florais quando comparada com a malha vermelha, azul e termorrefletora com a mesma intensidade de sombreamento. Martins et al. (2009), utilizando

malhas coloridas no cultivo de *Ocimum gratissimum* para a produção de óleo essencial, verificaram que o tratamento a pelo sol promoveu maior espessamento do mesofilo e maior quantidade de tricomas glândulares, quando comparados aos tratamentos com malhas fotoconversoras azul, vermelha e preta.

As plântulas de *L. purpurata* ‘carnea’ submetidas às malhas fotoconversoras azul e preta, bem como sem sombreamento em ambos os ambientes, foram as que menos alocaram biomassa seca total (Figura 4). Esse resultado está diretamente relacionado ao menor alongamento da parte aérea como uma resposta à qualidade e à intensidade da luz promovida por essas malhas (Figura 4), típica de espécies esciófitas submetidas a altos níveis de radiação na faixa espectral do azul (Morgan & Smith, 1979; Taiz & Zeiger, 2006).

Isso evidencia que a intensificação de radiação na faixa espectral do vermelho-distante, proporcionada pela malha azul, não ocasionou variação na distribuição de fotoassimilados. No entanto, a quantidade de matéria seca superior nas plantas sob malha vermelha, evidente na Figura 4, permite inferir sob a ocorrência de maior eficiência fotossintética das plantas nesse ambiente, em relação às crescidas sob malha azul e preta.

Os resultados dos teores endógenos de açúcares solúveis totais e redutores, nos ambientes de casa de vegetação e sala de crescimento, apresentaram diferenças conforme a intensidade e a qualidade da luz (Tabela 3).

TABELA 3 Teores de açúcares redutores (AR), açúcares solúveis totais (AST) e relação AR/AST, obtidos de plântulas de *Laelia purpurata* ‘carnea’ micropropagada aos 120 dias.

Ambientes	Malhas	AR (mg/gMS)	AST (mg/gMS)	AR/AST (%)
Sala de crescimento	SC	4,25 b B	7,31 b A	58,13 b B
	Azul	6,72 a B	9,11 a A	73,76 a B
	Vermelho	6,43 a A	8,37 b A	76,82 a B
	Preto	5,21 b B	8,91 b A	58,47 b B
Casa de vegetação	CV	5,2 b A	7,24 b A	71,82 b A
	Azul	7,9 a A	9,82 a A	80,61 a A
	Vermelho	6,43 a A	8,12 b A	79,18 b A
	Preto	6,32 b B	8,14 b A	77,77 b A
CV (%)		6,34	2,42	4,81
Erro padrão		0,15	0,08	1,41

Teste Tukey, 5% de significância. Letras minúsculas comparam o mesmo ambiente e as letras maiúsculas comparam ambientes diferentes.

A qualidade da luz incidente nas plantas de *L. purpurata* ‘carnea’ crescidas em ambos os ambientes alterou significativamente o teor de açúcares redutores (AR) e a relação açúcares redutores e totais (AR/AST) das folhas (Tabela 3), principalmente nas plântulas crescidas em sala de crescimento, as quais apresentaram as menores médias, com exceção da malha azul, embora não tenha sido avaliada formalmente.

Possivelmente, essa redução ocorreu em decorrência de taxas fotossintéticas baixas, proporcionadas por esse tipo de ambiente iluminado por lâmpadas brancas fluorescentes (Dubey & Pessaraki, 1995). Ambientes com baixas taxas de fótons fotossinteticamente ativos, como os de sala de

crescimento, podem induzir as plantas a alocarem uma maior parte de seus recursos (açúcares) para o crescimento em altura. Além disso, a menor irradiância recebida por essas plântulas pode resultar em uma menor taxa fotossintética e, conseqüentemente, em reduzida produção de açúcares.

Resultados mais expressivos foram observados para a malha azul em casa de vegetação (Tabela 3), onde os maiores teores de açúcares redutores (AR), açúcares solúveis totais (AST) e relação entre açúcares redutores e totais (AR/AST) foram observados, independente do ambiente onde as plântulas foram cultivadas.

O fato de a luz azul ser absorvida com maior intensidade pelas plantas conseqüentemente repercute em maiores taxas fotossintéticas, em função da maior produção de fotoassimilados e maiores teores de açúcares solúveis totais (AST) (Carvalho et al., 2006).

Avaliando a ação de fitocromos no desempenho fotossintético em microtomateiros mutantes, Melo et al. (2009) observaram que o mutante *hp1*, o qual expressa hipersensibilidade de respostas em processos mediados por fitocromos, apresentou as maiores taxas de fotossintéticas e obteve o conteúdo de AST menor que a cultivar MT.

Os mesmos autores observaram também que a concentração de AST no mutante *aurea* deficiente em fitocromo A (*phyA*), assim como a síntese do cromóforo, o que o torna deficiente em todas as espécie de fitocromo, foi inferior à da cultivar Micro-Tom (MT), apesar de serem similares quanto à capacidade fotossintética. Isso que sugere, além do potencial fotossintético, que as mutações associadas ao fitocromo provavelmente influenciaram a partição dos açúcares solúveis para rotas de biossíntese de aminoácidos e proteínas nos mutantes *aurea* e *atv*.

Fotorreceptores de luz dos vegetais, tais como fitocromos e criptocromos, influenciam de forma decisiva os processos de crescimento

vegetal, por alterarem o metabolismo fotossintético para que a eficiência de absorção da luz do visível seja ótima (Larcher, 2004).

A atividade da enzima fenilalanina amônio liase (PAL) aumentou em plântulas de *L. purpurata* 'carnea' crescidas em ambos os ambientes de cultivo, sob a malha azul (Figura 5 e 7). O pico máximo de atividade da PAL ocorreu ao final de 120 dias de subcultivo em ambiente de casa de vegetação (0,63  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{proteína}$ ).

Aumentos significativos da atividade dessa enzima foram verificados quando células de cenoura foram cultivadas em presença ou ausência de luz azul, tendo Broetto & Crocomo (1995) observado aumentos de 70% na atividade da PAL quando essas células foram irradiadas por 36 horas.

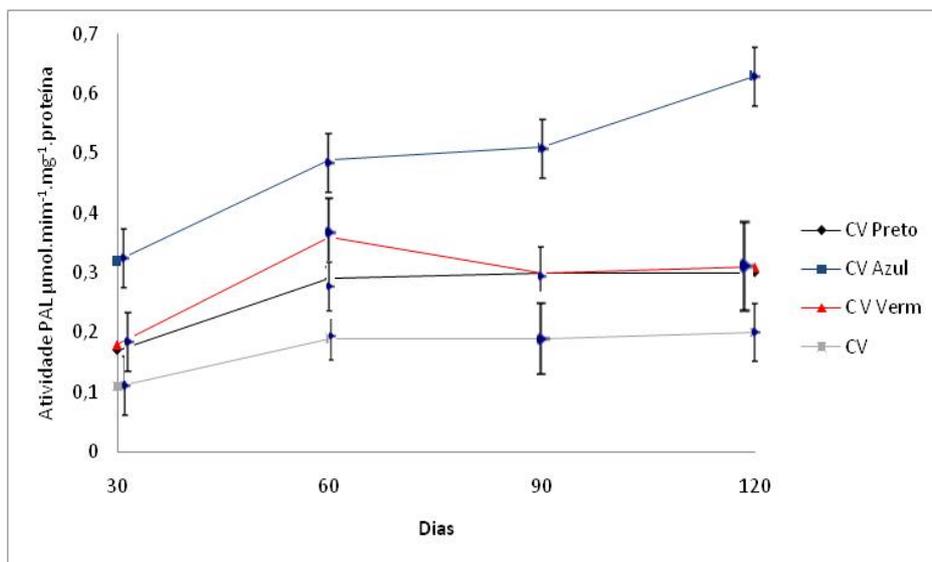


FIGURA 5 Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase em quatro períodos de avaliação em plântulas de *L. purpurata* 'carnea' cultivadas em casa de vegetação. CV: casa de vegetação; CV Verm: malha vermelha; CV Azul: malha azul e CV Preto: malha preta. Letras distintas indicam médias que diferem entre si pelo Teste de Tukey  $P < 0,05$  DMS (5%).

O comprimento de onda na faixa do azul transmitida pela malha azul atua nos vegetais, desencadeando a transcrição de RNAm para a síntese de PAL, que é precursora da biossíntese da maioria dos compostos fenólicos entre elas a lignina e flavonoides. Entre os flavonoides destacam-se as flavonas e os flavonóis, estes últimos atuando na proteção de células contra o excesso de radiação da faixa do azul, dessa forma preservando as proteínas dos fotossistemas e evitando o fenômeno da fotoinibição (Achnine et al., 2004).

Neste estudo, a atividade da PAL aumentou progressivamente em ambos os ambientes sob malha azul dentro de período avaliado. Provavelmente, parece ter ocorrido que plântulas de *L. purpurata* 'carnea' sintetizaram altas concentrações de PAL para proteger o aparato fotossintético, principalmente o centro de reação do fotossistema II (FSII) que, nessa situação, promovida pelo aporte excessivo de radiação, compromete o transporte eletrônico do processo fotossintético, o qual é interrompido e a eficiência do fotossistema II é diminuído (fotoinativação FSII). Como uma adaptação ao excesso da radiação fornecida pela malha azul, plântulas de *L. purpurata* 'carnea' apresentaram os bordos da lâmina foliar e da superfície da epiderme abaxial com uma coloração arroxeada, característica essa típica de intensa síntese de antocianinas (Figura 5).

Segundo Larcher (2004) e Taiz & Zeiger (2006), particularmente em situação de estresse por radiação é que as antocianinas são sintetizadas em folhas jovens não expandidas, ou seja, agindo como um filtro opaco para proteger o mesófilo. Os mesmos autores ainda mencionam que, sob forte radiação, aumenta a concentração de pigmentos de proteção no cloroplasto, como o caroteno e a luteína, que agem absorvendo a luz estressante.

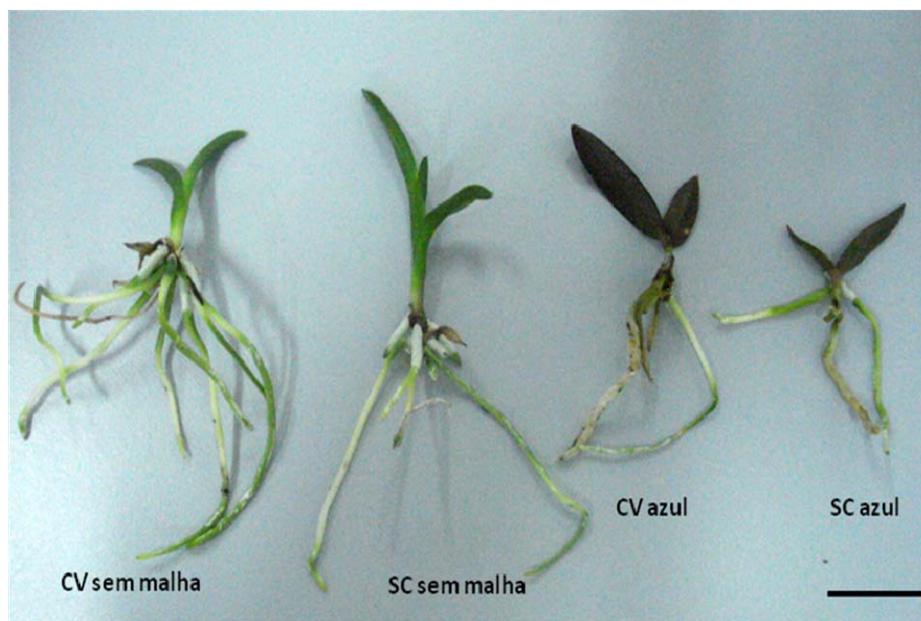


FIGURA 6 Aspectos morfológicos das plântulas de *L. purpurara* ‘carnea’ durante o cultivo *in vitro*. CV sem malhas: casa de vegetação; SC sem malha: sala de crescimento; CV azul: sombreada com malha fotoconversora azul e SC azul: sombreada com malha fotoconversora azul, aos 120 dias de subcultivo. Barra: 2 cm.

O aumento da atividade da PAL, aos 120 dias de subcultivo ( $0,63 \mu\text{mol}\cdot\text{mim}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína, em casa de vegetação) representa 50,79,2% em relação ao período de 30 dias ( $0,32 \mu\text{mol}\cdot\text{mim}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) (Figura 5). Pôde-se observar que quanto maior a atividade da PAL mais escura é a lâmina foliar e, conseqüentemente, maior a concentração de pigmentos responsáveis pela interceptação da luz e proteção dos fotossistemas (Figura 6). Observa-se que o padrão de indução da atividade de PAL se mostrou máximo em função do tempo de exposição das plântulas à malha azul.

As malhas preta e vermelha, por conta do comprimento de ondas que elas transmitem, não foram capazes de aumentar a atividade de PAL, independente do tipo de ambiente (Figuras 3 e 5).

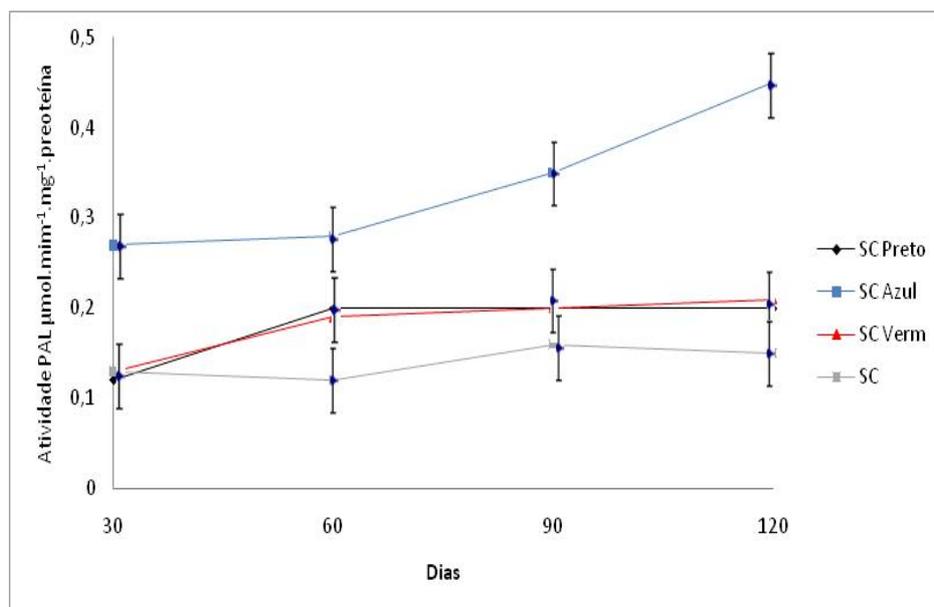


FIGURA 7 Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase em quatro períodos de avaliação em plântulas de *L. purpurata* 'carnea' cultivadas em sala de crescimento (SC). SC: sem malha; SC Verm: malha vermelha; SC azul: malha azul e SC Preto: malha preta.

Mesmo sendo as plântulas de *L. purpurata* 'carnea' submetidas a baixas irradiâncias nos tratamentos em sala de crescimento, a malha azul aumentou a atividade da PAL em torno de 91,02% em relação ao primeiro período de avaliação, aos 30 dias de subcultivo (Figura 6).

No ambiente de sala de crescimento sob as malhas fotoconversoras vermelha e preta, observou-se um pequeno aumento na atividade de PAL no intervalo de 30 dias. A partir de 60 dias, a atividade mantém-se constante, até o

último período avaliado (120 dias). Esse aumento pode ser explicado pelo fato de as plântulas de *L.purpurata* ‘carnea’ submetidas a malha vermelha absorverem radiação vermelho-distante que, em excesso, pode levar a alterações no metabolismo, com consequências semelhantes às do comprimento da luz azul, a qual possui ondas também na faixa do vermelho distante.

Assim, quando se comparam as respostas de plântulas de *L. purpurata* ‘carnea’ micropropagadas nos ambientes (SC e CV) sombreados com malha vermelha (590nm), observam-se alterações nas características das folhas relacionadas ao aumento da atividade de PAL, a qual é mediada por fitocromos.

Os ambientes de sala de crescimento e casa de vegetação sem malha também sofrem interferência na atividade da PAL (Figura 5 e 7). Sob baixa irradiância promovida na sala de crescimento, as plântulas de *L. purpurata* ‘carnea’ não sintetizaram PAL em concentração quanto nos tratamentos com malhas azuis (Figura 5 e 7), havendo uma redução na atividade dessa enzima de 61,1%, em comparação com a malha azul.

O ambiente de cultivo e as malhas coloridas promoveram diferenças significativas para a epiderme adaxial (EAD), na espessura do mesofilo (MF) e na espessura do limbo foliar (LB), conforme dados da Tabela 4.

TABELA 4 Espessura dos tecidos e do limbo foliar de *Laelia purpurata* ‘carnea’ micropropagada em diferentes ambientes.

Ambientes	Malhas	EAD ( $\mu\text{m}$ )	EAB ( $\mu\text{m}$ )	MF ( $\mu\text{m}$ )	LB ( $\mu\text{m}$ )
Sala de cresc.	Sem malha	28,01 b A	23,98 a A	81,32 c B	134,97 b A
	Azul	31,73 a B	23,34 a A	99,37 a B	151,33 a A
	Vermelho	29,07 b A	22,76 a A	94,38 b B	147,82 b A
	Preto	27,87 b A	22,01 a A	92,86 b A	144,7 b A
Casa de veget.	Sem malha	29,73 b A	23,72 a A	93,38 b A	148,97 b A
	Azul	35,46 a A	22,59 a A	100,97a A	171,74 a A
	Vermelho	29,07 b A	21,76 a A	100,08a A	157,01 b A
	Preto	28,08 b A	22,89 a A	99,91 b A	152,5 b A
CV (%)		8,91	17,63	11,08	21,86
Erro padrão		1,88	2,32	4,76	1,69

Legenda: EAD: epiderme da face adaxial, EAB: epiderme da face abaxial, MF: espessura do mesofilo, LB: espessura do limbo foliar. Teste Tukey, a 5% de significância. Letras minúsculas comparam o mesmo tratamento e as letras maiúsculas comparam ambientes diferentes.

Quanto às características anatômicas, as folhas em secção transversal apresentaram epiderme unisseriada, tanto na face abaxial como adaxial, clorênquima homogêneo, com células arredondadas (isodiamétricas), de parede celular delgada e de maior tamanho na região central (Figura 8 A-H).

As plântulas de *L. purpurata* ‘carnea’ que foram cultivadas sob malha azul, independentemente do ambiente de cultivo, obtiveram maiores espessamentos na epiderme adaxial (31,73 e 35,46 $\mu\text{m}$ ). Isso, possivelmente, ocorreu em função da maior atividade da PAL, a qual, nessa situação, atua na biossíntese de lignina aumentando o espessamento das paredes das células epidérmicas (Tabela 4 e Figura 7).

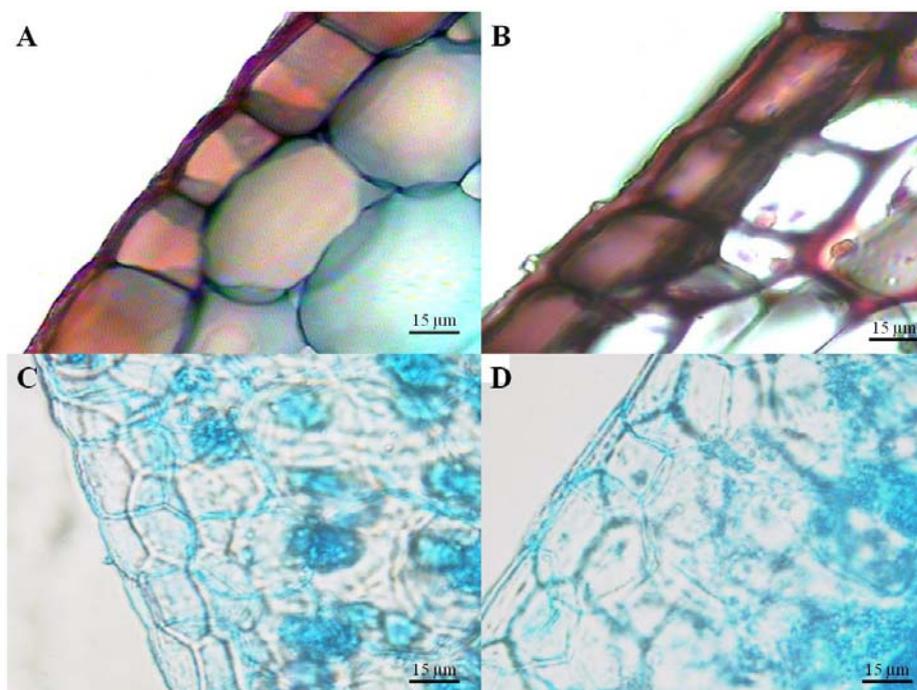


FIGURA 8 A. Secção transversal do limbo foliar de plântulas de *L. purpurata* ‘carnea’ sob malha azul em sala de crescimento, B. Sob malha azul em casa de vegetação, C. Sala de crescimento (sem malha) e D. Casa de vegetação (sem malha).

Essa constituição anatômica é desejável e de fundamental importância nos processos de aclimatização por proporcionar menor taxa de transpiração cuticular, o que aumenta as chances de sobrevivência das plantas no ambiente *ex vitro*. O aumento da espessura das células da epiderme adaxial das plântulas sombreadas com malha azul foi de 26,15% em casa de vegetação e de 11,8% em sala de crescimento (Tabela 4).

Lee et al. (1988), trabalhando com *Liquidambar styraciflua* L., obtiveram resultados mostrando que diferenças no fluxo quântico podem modificar o desenvolvimento *in vitro*. A elevação nos níveis de luz produziu

folhas mais espessadas *in vitro*, com diferenciação do tecido paliçádico no mesofilo das folhas. A anatomia foliar dessas plântulas apresentou-se mais próxima de folhas de mudas em aclimatização do que o material *in vitro* crescendo sob baixa irradiância.

Aumentos na espessura do mesofilo foram influenciados pelo sombreamento com malha azul em casa de vegetação. Tal malha promoveu um aumento nesse tecido de 35,94%, quando comparada à dos demais tratamentos (Tabela 4).

As plântulas de *L. pururata* 'carnea' que se desenvolveram em casa de vegetação apresentaram tendência a maiores espessamentos no limbo foliar em relação aos demais tratamentos, mesmo não apresentando diferenças significativas (Tabela 4). Isso mostra que a qualidade da luz azul influencia a diferenciação dos tecidos internos dessas plântulas.

A diferenciação de tecidos e a plasticidade na anatomia foliar são fatores importantes no processo de absorção de luz, especialmente na estrutura do mesofilo. É esperado que quanto mais espesso o mesofilo, maior as taxas fotossintéticas (Bolhar-Vordenkampf & Draxler, 1993), processo esse fundamental ao crescimento e desenvolvimento vegetal.

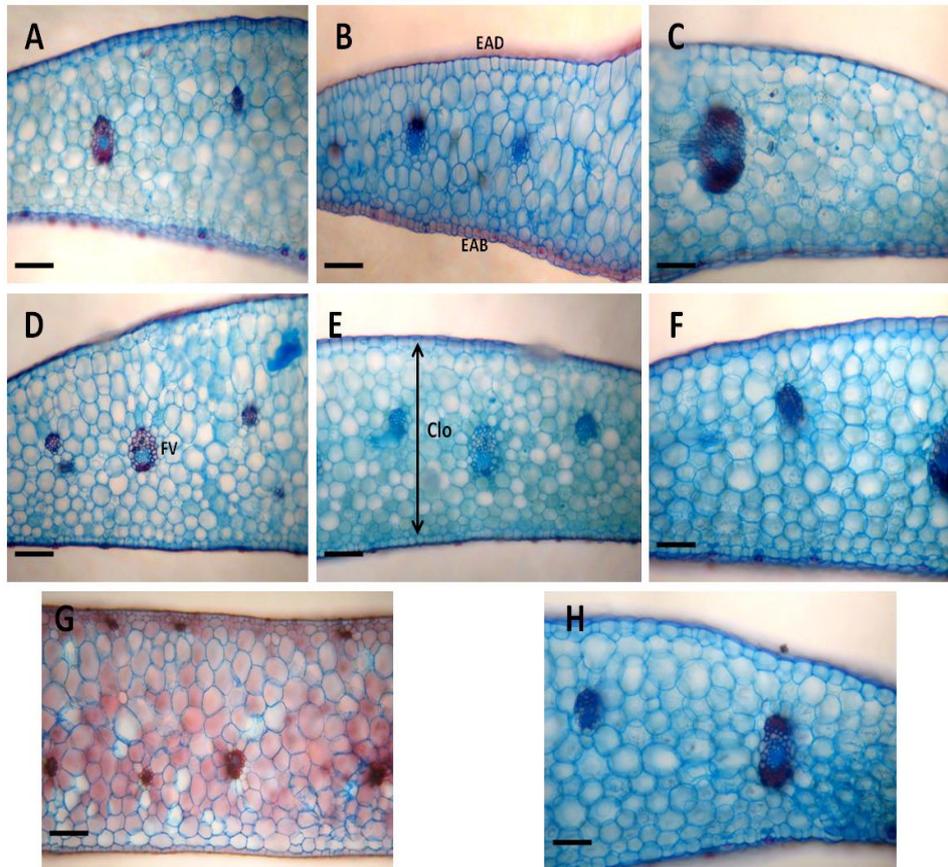


FIGURA 9 Fotomicrografias de seções transversais de folhas de *L. purpurata* ‘carnea’ cultivadas sob malhas fotoconversoras e sombrite. EAD, epiderme da face adaxial; EAB, epiderme da face abaxial; FV, feixe vascular; Clo, clorênquima (A) sala de crescimento malha azul; (B) sala de crescimento malha vermelha; (C) sala de crescimento malha preta; (D) casa de vegetação malha azul; (E) casa de vegetação malha vermelha; (F) casa de vegetação malha preta; (G) sala de crescimento (sem malha) e (H) casa de vegetação (sem malha). Barras 30 $\mu$ m.

Pode-se perceber que o ambiente em sala de crescimento promoveu menor desenvolvimento dos feixes vasculares em folhas de *L. purpurata* ‘carnea’ (Figuras 8 A-C e G) quando comparado com o ambiente de casa de vegetação (Figuras 8 D-F e H).

De acordo com Alves & Angyalossy-Alfonso (2000), os fatores ambientais do cultivo *in vitro* afetam as dimensões e, até mesmo, o arranjo dos elementos vasculares, na tentativa de garantir aumento na segurança do transporte, quando a planta está sujeita a algum tipo de estresse (Baas, 1982). El-Bahr et al. (2003) verificaram que *Phoenix dactylifera* L. cv. Zaghlool, obtida por propagação *in vitro*, apresentou tecido vascular menos desenvolvido e com menor diferenciação que aquelas cultivadas *in vivo* e aclimatizadas.

A densidade estomática é considerada um fator de alta plasticidade em decorrência da exposição das plantas a diferentes ambientes, portanto, observaram-se, no presente trabalho, mudanças nesse parâmetro (Tabela 5; Figura 9). Houve diferenças significativas entre as malhas coloridas e o ambiente, com as maiores densidades de estômatos observadas no cultivo em casa de vegetação sem proteção de sombrite, seguido de casa de vegetação com malha fotoconversora azul, casa de vegetação com malha fotoconversora vermelho e casa de vegetação com sombrite preto (Tabela 5).

Na epiderme da face abaxial, as paredes anticlinais das células ordinárias se apresentaram bastante sinuosas (sala de crescimento) e com os estômatos do tipo anomocítico. Observou-se, ainda, que, nas plântulas de *L. purpurata* ‘carnea’ subcultivadas em sala de crescimento, os estômatos apresentaram o ostíolo mais aberto quando comparado aos demais tratamentos (Figura 9 A - H) e, como consequência, o diâmetro polar era menor que o das plântulas em casa de vegetação (Tabela 5). Para as plântulas em sala de crescimento, a maior densidade estomática foi verificada quando as mesmas

foram sombreadas com malha vermelha, quando comparadas com as demais malhas e sem sombreamento (Tabela 5).

Em ambiente de casa de vegetação, as malhas não apresentaram diferenças significativas, tendo a maior densidade estomática sido verificada em plântulas sem sombreamento (Tabela 5).

Maiores densidades estomáticas foram observadas durante o cultivo *in vitro* de crisântemos por Braga et al. (2009), os quais relataram que as plântulas cultivadas em casa de vegetação apresentaram maiores quantidades de estômatos quando comparadas às plântulas em sala de crescimento e em casa de vegetação sombreada com malha azul e preta. Ainda segundo os mesmos autores, a malha vermelha apresentou densidade de estômatos maior que as outras malhas, porém, menor que o tratamento sem sombreamento. Corroborando os resultados obtidos neste trabalho, Dignart et al. (2009) relataram que as maiores densidades estomáticas foram observadas no cultivo de *Cattleya walkeriana*, em casa de vegetação sem sombrite.

Quanto aos diâmetros polar e equatorial e relação polar equatorial (P/E), apenas houve diferença para diâmetro o polar e relação P/E para as plântulas que foram cultivadas em casa de vegetação (Tabela 5). O maior o diâmetro polar resulta num formato elíptico que sugere, portanto, maior funcionalidade desses estômatos (Khan et al., 2002). Segundo Martins et al. (2009), quanto maior a relação diâmetro polar/equatorial (P/E), mais elipsoide é o formato do estômato, portanto, maior funcionalidade ele deve apresentar.

Os maiores diâmetros polares foram observados em plântulas que se desenvolveram em casa de vegetação (Tabela 5), tendo esse aumento sido de 23,1%, 24,51%, 24,01% e 24,56%, para CV, CVA, CVV e CVP, respectivamente, quando comparados com as plântulas de ambiente de sala de crescimento. Independente da malha de sombreamento, maior relação P/E foi

observada em plântulas de *L. purpurata* ‘carnea’ cultivadas em casa de vegetação (Tabela 5).

TABELA 5. Médias do número de estômatos/mm<sup>2</sup>, diâmetro polar (P), equatorial (E) e relação (P/E) dos estômatos na face abaxial de plântula de *L. purpurata* ‘carnea’, obtidas pela propagação *in vitro*, submetidas aos diferentes ambientes e malhas coloridas

Ambientes	Malhas	(n°estômatos/mm <sup>2</sup> )	P (µm)	E (µm)	P/E
Sala de cresc.	Test. SC	93,89 bB	41,23aB	29,31aA	1,46aB
	Azul	98,92 bB	40,31aB	30,87aA	1,31aB
	Vermelho	101,6 aB	40,45aB	28,44aA	1,42aB
	Preto	86,68 cB	42,01aB	27,78aA	1,51aB
Casa de vege.	Test. CV	254,85 aA	52,92aA	30,0 aA	1,76aA
	Azul	162,21 bA	52,65aA	30,23aA	1,74aA
	Vermelho	157,93 bA	53,22aA	33,11aA	1,61aA
	Preto	96,02 cA	54,87aA	32,51aA	1,68aA
CV (%)		12,8	10,42	10,28	6,31
Erro padrão		2,54	1,81	4,87	2,43

Sala de cresc.: sala de crescimento (sem malha), Casa de vege.: casa de vegetação (sem malha), P: diâmetro polar; E: diâmetro equatorial; P/E: relação diâmetro polar e equatorial. Tukey, a 5% de significância. Letras minúsculas comparam o mesmo tratamento e as letras maiúsculas comparam ambientes diferentes.

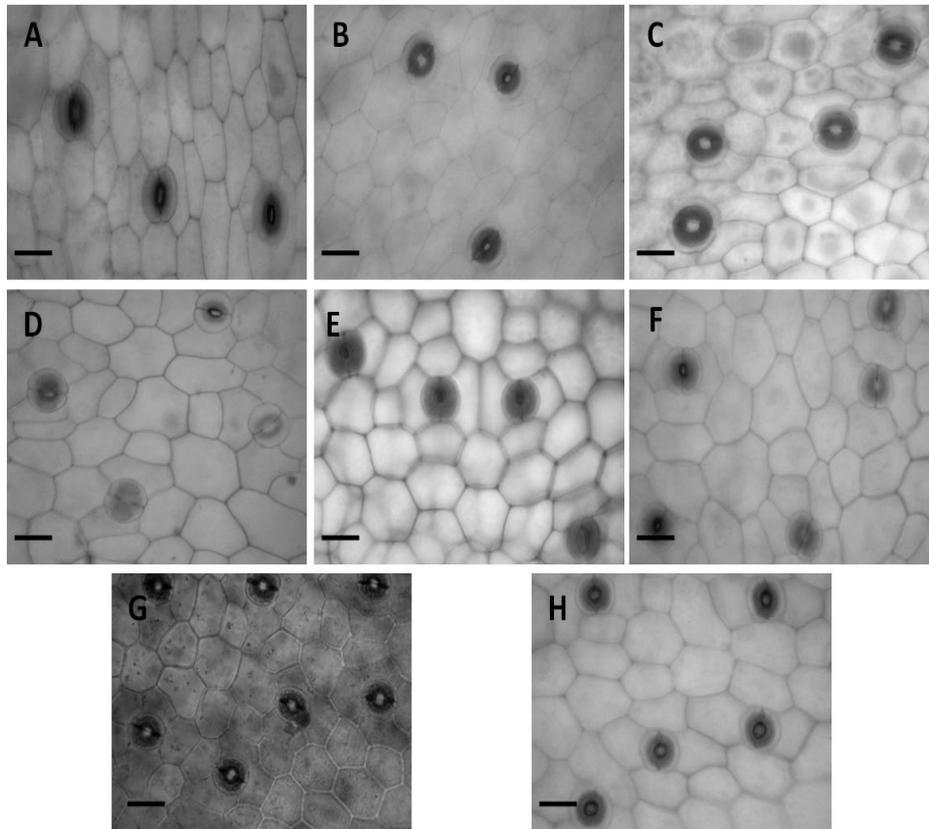


FIGURA 10 Secções paradérmicas do limbo foliar de *L. purpurata* 'carnea' cultivadas em diferentes ambientes. A) sala de crescimento malha azul; B) sala de crescimento malha vermelha; C) sala de crescimento malha preta; D) casa de vegetação malha azul; E) casa de vegetação malha vermelha; F) casa de vegetação malha preta; G) sala de crescimento (sem malha) e H) casa de vegetação (sem malha). Barras 30µm.

Observou-se aumento significativo no número de camadas de células do velame em raízes de plântulas de *L. purpurata* 'carnea' que foram cultivadas em casa de vegetação, independente da malha de sombreamento, quando

comparadas com as plântulas que foram cultivadas em sala de crescimento (Tabela 6, Figura 10).

Nesta situação, o ambiente de cultivo foi determinante no desenvolvimento do sistema radicular. Embora as plântulas tenham sido mantidas *in vitro*, as condições de iluminação da casa de vegetação proporcionaram desenvolvimento mais uniforme do velame, cuja função é a captação do vapor de água, a qual deve ser conduzida na forma líquida através das células menores presentes na exoderme das raízes, para que essa água chegue ao córtex e, posteriormente, ao cilindro vascular, de onde será distribuído por toda a planta.

O ambiente de sala de crescimento, onde as plantas crescem sob condições limitantes de trocas gasosas, alta umidade do ar, baixa intensidade luminosa e uso de açúcar como fonte de energia, pode ter sido a condição para uma menor diferenciação das camadas de células do velame, tornando as raízes menos funcionais (Tabela 6; Figura 10).

Mayer et al. (2008) verificaram modificações na estrutura de raízes de orquídeas cultivadas *in vitro*, independente da concentração de sais no meio, decorrentes do processo de micropropagação, que as deixavam menos funcionais.

O ambiente no qual as espécies vegetais estão inseridas sofrem constantes mudanças, fazendo com que as plantas se adaptem a ele para que sobrevivam. Pereira et al. (2008), estudando a formação de aerênquima em raízes de milho *Saracura* provenientes de 18 ciclos de seleção, observaram que o aumento dos sucessivos ciclos de seleções resultava em maior desenvolvimento das estruturas de aerênquima, que melhoraram a condutividade hidráulica nas raízes, tornando-as mais funcionais.

TABELA 6 Características quantitativas dos tecidos radiculares de plântulas de *L. purpurata* ‘carnea’, em diferentes ambientes de cultivo.

Ambientes	Malhas	V (µm)	Ex (µm)	Co (µm)	CVa(µm)
Sala de cresc.	Test. SC	37,03 c B	33,47 a A	270,56 b B	73,98 b B
	Azul	75,85 a A	30,09 a A	330,81 a A	139,01 a B
	Vermelho	49,01 b B	33,71 a A	390,54 a A	100,72 a B
	Preto	36,54 c B	30,99 a A	260,21 b B	79,35 b B
Casa de veget.	Test. CV	50,56 c A	29,33 b B	330,79 a A	91,04 c A
	Azul	105,15 a A	28,71 b B	260,58 b B	169,60 a A
	Vermelho	80,11 b A	29,42 b B	315,99 a B	149,69 b A
	Preto	101,03 a A	27,76 b B	310,71 a A	159,97 b A
CV (%)		10,32	3,55	6,81	8,92
Erro padrão		2,14	1,64	4,72	5,24

V (velame), Ex (exoderme), Co (córTEX) e CVa (cilindro vascular). Teste Tukey, a 5% de significância. Letras minúsculas comparam o mesmo tratamento e as letras maiúsculas comparam ambientes diferentes.

O ambiente de cultivo alterou a morfologia e a espessura das células do velame, bem como no número de camadas desse tecido (Figura 10, Tabela 6). Plântulas de *L. purpurata* ‘carnea’ cultivadas em casa de vegetação obtiveram as maiores médias quando comparadas com o ambiente em sala de crescimento.

O velame das orquídeas funciona como uma esponja (a entrada de água é puramente passiva), permitindo que a raiz mobilize uma reserva temporária, mas altamente acessível, de água e sais minerais (Benzing *et al.* 1982). Uma vez em contato com esses fluidos, os mesmos penetram no velame por capilaridade (Esau 1966, Benzing 1990). Benzing atribui ao velame uma função de proteção, quando ele se encontra vazio, isto é, com células cheias de ar. Por outro lado, Dycus & Knudson (1957) verificaram que na região apical da raiz, onde o

velame apresenta células vivas, ocorre absorção de água e nutrientes. Mas como essa região é reduzida, sua capacidade de absorção é insignificante. Portanto o ambiente de casa de vegetação promove desenvolvimento mais uniforme do velame permitindo assim uma melhor adaptação dessas plântulas ao ambiente *ex vitro*.

A espessura da exoderme apresentou diferenças significativas quanto ao ambiente de cultivo e quanto à qualidade da luz fornecida pelas malhas fotoconversoras (Tabela 6; Figura 10). As células da exoderme de raízes de plântulas crescidas em ambos os ambientes se apresenta com uma camada unisseriada com células de parede primária onde se observa maior diâmetro dessas células no ambiente de sala de crescimento e formato modificado (idioblasto) (Figura 10 B). Já no ambiente de casa de vegetação, o tamanho e o formato das células da exoderme se apresentaram de forma homogênea e isodiamétrica (Figura 10 E).

A exoderme pode ser importante como uma barreira apoplástica ao refluxo de água e à entrada de patógenos (Castro, 2009; Pereira et al., 2008). Durante as fases do cultivo *in vitro*, as plântulas crescem sob condições de saturação de vapor d'água, baixa incidência de fótons fotossinteticamente ativos e utilizam uma fonte de carbono altamente assimilável, a sacarose (Pasqual et al., 2001). Dessa forma, a diferenciação ocorrida na exoderme de *L. purpurata* 'carenea' pode estar relacionada com a redução nas funções do velame, a qual é responsável pela captura e o transpote da água para levá-la até as células do cilindro vascular (Castro, 2009). Assim, no ambiente *in vitro*, essa função deixa de ser essencial, decorrente das condições ótimas de umidade presentes nesse ambiente. Esses fatos apontam para necessidade da fase de aclimatização para as plantas de *L. purpurata* 'carnea' cultivadas *in vitro*, provenientes do ambiente de sala de crescimento.

O córtex das plântulas provenientes do cultivo em casa de vegetação apresentou-se com menor diâmetro e células de menor tamanho, quando comparado com o de plantas mantidas em sala de crescimento (Tabela 6; Figura 10). Esse fenômeno diz respeito a uma maior funcionabilidade dessas raízes, pois menores diâmetros de córtex estão diretamente relacionados com raízes mais finas, que são as que realmente absorvem os nutrientes do meio de forma eficiente. Mayer et al. (2009) observaram que raízes de orquídeas cultivadas *in vitro* eram menos espessas do que as raízes de plantas aclimatizadas e plantas matrizes.

De forma geral, as plântulas de *L. purpurata* 'carnea', que se desenvolveram em ambiente de casa de vegetação, apresentaram os maiores diâmetros do cilindro vascular (CVa), pois o fator ambiente foi preponderante para a diferenciação desse tecido, que acarreta em melhorias na condutividade hidráulica dessas raízes. Estas melhorias foram observadas por Pereira et al. (2008), ao constatarem que uma maior área de aerênquima em raízes de milho Saracura sob alagamento aumentaram a condutividade hidráulica dessas raízes e a difusão de CO<sub>2</sub>, permitindo, assim, um melhor desempenho sob condições de estresse.

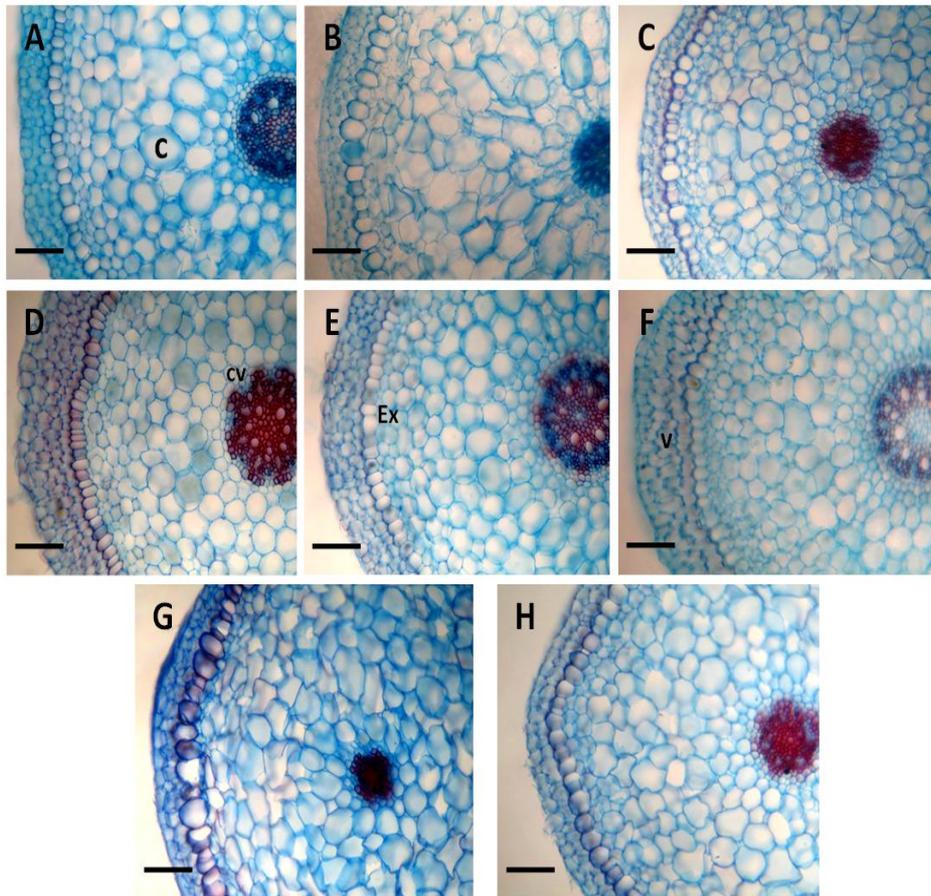


FIGURA 11. Detalhe das secções transversais das raízes de plântulas de *L. purpurata* 'carnea' e das testemunhas, em diferentes ambientes de cultivo e malhas coloridas, após 120 dias de subcultivo. C: córtex; CV: cilindro vascular; Ex: exoderme. V: velame. A: sala de crescimento sob malha azul; B: sala de crescimento sob malha vermelha; C: sala de crescimento sob malha preta; D: casa de vegetação sob malha azul; E: casa de vegetação sob malha vermelha; F: casa de vegetação sob malha preta; G: sala de crescimento sem malha e H: casa de vegetação sem malha. Barras: 100

## **6 CONCLUSÕES**

As plantas de *L. purpurata* 'carnea' são capazes de utilizar o comprimento de onda na faixa do vermelho fornecido pela malha vermelha, apresentando incrementos no comprimento de parte aérea e matéria seca de plantas.

A malha azul promove um encurtamento das plântulas e, conseqüentemente, diminuição do comprimento da parte aérea e teor de matéria seca, porém, aumenta os conteúdos de AST, AR e AR/AST.

A atividade da enzima PAL aumenta quando plântulas são expostas à radiação no comprimento na faixa do azul fornecido pela malha azul, promovendo uma coloração arroxeadada nos bordos e na superfície da face abaxial.

O ambiente e a malha azul promovem modificações morfológicas em raízes e folhas, deixando-as mais funcionais e requerendo menor tempo na fase de aclimatização.

## **7 AGRADECIMENTOS**

À Fapemig e ao CNPq, pelo auxílio financeiro para a realização do presente trabalho.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHNINE, L.; BLANCAFLOR, E. B.; RASMUSSEN, S.; DIXON, R. A. Colocalization of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase and Cinnamate 4-Hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 3098-3109, Nov. 2004.
- ALMEIDA, L. P.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; ZANELA, S. M.; VIEIRA, C. V. Crescimento inicial de plantas de *Cryptocaria aschersoniana* Mez. submetidas a níveis de radiação solar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 83-88, jan./fev. 2004.
- ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; LIMA JÚNIOR, E. C.; MAGALHÃES, M. *Croton urucurana* Baill in southeastern Brazil. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 1, p. 1-7, jan. 2003.
- ALVES, E. S.; ANGYALOSSY-ALFONSO, V. Ecological trends in the wood of some Brazilian species 1: growth rings and vessels. **IAWA Journal**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 3-30, Jan. 2000.
- ANTONOPOLOU, C.; DIMASSI, K.; THERIOS, I.; CHATZISSAVVIDIS, C. The influence of radiation quality on the *in vitro* rooting and nutrient concentrations of peach rootstock. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 48, n. 4, p. 549-553, 2004.
- ARAÚJO, A. G. **Micropropagação de *Cattleya loddigesii* 'tipo'**: fontes de nitrogênio, qualidade de luz, sacarose e ácido giberélico. 2007. 74 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ÁVILA-DÍAZ, I.; OYAMA, K. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (orchidaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 94, n. 2, p. 184-193, 2007.
- ÁVILA-DIAZ, I.; OYAMA, K.; GÓMEZ-ALONSO, C.; SALGADO-GARCIGLIA, R. In vitro propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, n. 3, p. 335-343, Dec. 2009.
- BAAS, P. Systematic, phylogenetic and ecological wood anatomy: history and perspectives. In: \_\_\_\_\_. **New perspectives in wood anatomy**. The Hague: M. Nijhoff, 1982. p. 23-58.

BENZING, D.H. **Vascular epiphytes - general biology and related biota**. Cambridge University Press, Cambridge. 1990

BENZING, D.H.; SEEMAN, J.; RENFROW, A.. The foliar epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and its role in habitat selection. **American Journal of Botany**, v. 65, p. 359-365. 1978

BOLHAR-VORDENKAMPF, H. R.; DRAXLER, G. **Funcional leaf anatomy photosynthesis and production in a changing environment**: a field and laboratory manual. London: Chapman & Hall, 1993.

BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; DIGNART, S. L.; BIAGIOTTI, G. B.; PORTO, J. M. P. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 502-508, mar./abr. 2009.

BROETTO, F.; CROCOMO, O. J. Ação de luz UV e Ga<sub>3</sub> sobre a atividade de enzimas do metabolismo secundário em células de cenoura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 7, n. 1, p. 61-66, jun. 1995.

CARVALHO, L. M.; CASALI, V. W. D.; LISBOA, S. P. Growth and metabolism of feverfew plants in response to the irradiance level. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 289-294, jul./set. 2006.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. R. P.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Influencia do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum**. Agronomy, Maringá, v. 26, n. 2, p. 253-258, jun. 2004.

CRUZ, C. D. **Programa genes**: biometria. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2006. v. 1. 382 p.

DYCUS, A.M.; KNUDSON, L. The role of the velamen of the aerial roots of orchids. **Botanical Gazette**, p.119:7887. 1957

DIGNART, S. L.; CASTRO, E. C.; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F. T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun. 2009.

DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Physiological mechanisms of nitrogen absorption and assimilation in plants under stressful conditions. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of plant and crop physiology**. New York: M. Dekker, 1995. p. 605-625.

ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. 2. ed. J. New York: J. Wiley, 1966.

EL-BAHR, M. K.; ALI, Z. A.; TAHA, H. S. In vitro propagation of Egyptian date palm cv. Zaghlool: II. comparative anatomical studies between direct acclimatized and *in vitro* adapted (pre-acclimatized) plantlets. **Arab Universities Journal of Agricultural Sciences**, Cairo, v. 11, n. 2, p. 701-714, 2003.

FARIAS, V. C. C.; VARELA, V. P.; COSTA, S. de S.; BATALHA, L. F. P. Análise de crescimento de mudas de cedrorana (*Cedrelinga catenaeformis* (Ducke) Ducke) cultivadas em condições de viveiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 193-200, jul. 1997.

GAFFNEY, M. ChromatiNet-light spectrum management. **Greenhouse Product News**, Illinois, v. 14, n. 12, p. 54, 2004. Abstract.

GUSSAKOVSKY, E. E.; SHAHAK, Y.; SCHROEDER, D. F. Color of illumination during growth affects LHCII chiral macroaggregates in pea plant leaves. **Journal of photochemistry and photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 86, n. 2, p. 121-130, 2007.

HANBA, Y. T.; KOGAMI, H.; TERASHIMA, I. The effects of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 1021-1030, 2002.

HODGE, J. E.; HOFREITER, B. T. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WHISTLER, J. E.; WOLFROM, M. L. **Methods in carbohydrate chemistry**. New York: Academic, 1962. p. 380-394.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-MAIA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 1, p. 97-108, jan./mar. 2008.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução a taxonomia vegetal. 13. ed. São Paulo: Nacional, 2002.

KHAN, P. S. S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 141-146, Nov. 2002.

KOBAYASHI, K. D.; LICHTY, J. S.; KOBAYASHI, K. D.; SAKAI, W. S. Effects of photoselective shade cloths on potted *Dracaena* and *Anthurium* plants. **HortScience**, Alexandria, v. 41, n. 4, p. 1053-1054, 2006.

KÖPPEN, W. **Climatología**: con un estudio de los climas de La tierra. México: Fondo de Cultura Económica, 1948. 478 p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2004. 531 p.

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

MARTINS, J. R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; SILVA, A. P. O. da; OLIVEIRA, C.; ALVES, E. Anatomia foliar de plantas de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 82-87, jan./fev. 2009.

MAYER, J. L. S.; RIBAS, L. L. F.; BONA, L.; QUOIRIN, M. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasílica**, Porto Alegre, v. 22, n. 2, p. 323-332, jun. 2008.

MELO, H. C.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M.; OLIVEIRA, C.; RAMOS, S. J. Características fisiológicas de microtomateiros fitocromo-mutantes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 5, p. 1213-1219, set./out. 2009.

MILLER, G. L. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

MOHLE, B.; HELLER, W.; WELLMANN, E. UV – induced biosynthesis of quercetin 3-0-B-D-Glucuronide in dill cell cultures. **Phytochemistry**, New York, v. 24, p. 465-476, 1985.

MORGAN, D. C.; SMITH, H. A systematic relationship between phytochromecontrolled development and species habitat, for plant grown in simulated natural irradiation. **Planta**, Berlin, v. 145, n. 3, p. 253-258, Jan. 1979.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 3-35.

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

MUROYA, K.; VARELA, V. P.; CAMPOS, M. A. A. Análise de crescimento de mudas de jacareúba (*Calophyllum angulare* A. C. Smith - Guttiferae) cultivadas em condições de viveiro. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 27, n. 3, p. 197-212, set. 1997.

NOMURA, E. S.; LIMA, J. D.; RODRIGUES, D. S. R.; GARCIA, V. A.; FUZITANI, E. J.; SILVA, S. H. M. G. da. Crescimento e produção de antúrio cultivado sob diferentes malhas de sombreamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1394-1400, ago. 2009.

OREN-SHAMIR, M.; GUSSAKOVSKY, E. E.; SHPIEGEL, E.; NISSIM-LEVI, A.; RATNER, K.; OVADIA, R.; GILLER, Y. U. E.; SHAHAK, Y. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 76, n. 3, p. 353-361, May 2001.

OYAERT, E.; VOLCKAERT, E.; DEBERGH, P. C. Growth of chrysanthemum under coloured plastic films with different light qualities and quantities. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 79, n. 3/4, p. 195-205, Feb. 1999.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Propagação de plantas frutíferas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 137 p.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1649-1656, dez. 2008.

PONS, T. L.; BERKEL, Y. E. M. de J. van. Species-specific variation in the importance of the spectral quality gradient in canopies as a signal for photosynthetic resource partitioning. **Annals of Botany**, London, v. 94, n. 5, p. 725-732, Nov. 2004.

RADMANN, E. B.; BRAGA, E. J. B.; KARAN, M. A. L.; POSADA, M. A. C.; PETERS, J. A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 3, p. 171-175, set. 2001.

RAJAPSKE, N. C.; KELLY, J. W. Spectral filters influence transpirational water loss in *Chrysanthemum*. **HortScience**, Alexandria, v. 28, n. 10, p. 999-1001, Oct. 1999.

RHODES, M. J. C.; WOOLTORTON, L. S. C. Changes in the activity of enzymes of phenylpropanoid metabolism in tomatoes stored at low temperatures. **Phytochemistry**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 655-659, May 1971.

ROCHA, H. S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira 'prata anã'**: alterações morfoanatômicas. 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SCHLUTER, U.; MUSCHAK, M.; BERGER, D.; ALTMANN, T. Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 383, p. 867-874, Feb. 2003.

SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-brasil (*bertholletia excelsa* h. b. k.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 4, p. 833-840, out./dez. 2000.

SHAHAK, Y.; GUSSAKOVSKY, E. E.; GAL, E.; GANELEVIN, R. Colornets: crop protection and light-quality manipulation in one technology. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 659, p. 143-151, 2004.

SMITH, H.; WHITELAM, G. C. The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 20, n. 6, p. 840-844, June 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TSUNOYAMA, Y.; MORIKAWA, K.; SHIINA, T.; TOYOSHIMA, Y. Blue light specific and differential expression of plastid sigma factor, Sig5 in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 516, n. 1/3, p. 225-228, Apr. 2001.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanine decarboxylase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, Baltimore, v. 40, n. 5, p. 779-784, Sept. 1965.

## CAPÍTULO 2

Crescimento e morfoanatomia de plântulas de *Laelia purpurata* ‘carnea’ cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de amônio e ureia

### 1 RESUMO

Objetivou-se de avaliar o efeito de diferentes concentrações de ureia na micropropagação e nas características anatômicas de mudas de *L. purpurata* ‘carnea’. Foram utilizadas plântulas cultivadas *in vitro* em meio MS, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, 2,68 µmol de ácido naftalenacético (ANA) e 13,72 µmol de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), acrescidos de 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 100 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana. Os tratamentos consistiram da adição ao meio MS de 0%, 25%, 50%, 75% e 100% de ureia. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dez repetições. Após 120 dias em sala de crescimento, foram avaliadas características de crescimento, anatômicas e bioquímicas. Ocorreram modificações nas características de crescimento das plantas cultivadas em 75% de ureia, com aumento da biomassa, número de raízes, folhas e maior produção de clorofilas, enquanto a concentração de 100% promoveu reduções nesses parâmetros. Na concentração de 75% ocorreu espessamento do mesofilo, aumento na espessura da endoderme e da exoderme, redução no diâmetro do cilindro vascular e do número de camada de células e espessura do velame. As modificações ocorridas permitem inferir que a espécie possui tolerância à ureia com a utilização desse recurso, aumentando o potencial para crescimento adequado nas condições *in vitro*, sendo, no entanto, necessário um período de aclimatização para otimizar as funções das raízes.

Palavras-chave: orquídea, micropropagação, fontes de nitrogênio orgânico.

## CHAPTER 2

Growth and morphoanatomy of *Laelia purpurata* 'carnea' cultivated in vitro in different concentrations of ammonium nitrate and urea

### 2 ABSTRACT

This work aimed at examining the different concentrations of urea in the micropropagation and the anatomical characteristics of seedlings of *L. purpurata* 'carnea'. In vitro plantlets on MS medium were used, and 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 6 g L<sup>-1</sup> agar, 2.68 µmol of naphthalene acetic acid (NAA) and 13.72 µmol of gibberellic acid (GA3) and 2 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal and 100 g L<sup>-1</sup> banana pulp were added. The treatments consisted of adding to the MS of 0%, 25%, 50%, 75% and 100% urea. The experimental delineation was completely randomized, with ten repetitions. After 120 days in a growth chamber, anatomical and biochemical characteristics were evaluated. There were changes in growth characteristics of cultivated plants about 75% of urea, an increase of biomass, number of roots, leaves and increased production of chlorophyll, while the concentration of 100% promoted reductions in these parameters. At the concentration of 75% was a thickening of the mesophyll, an increased thickness of the endodermis and exodermis, reduction in vascular diameter of the cylinder and the number of cell layers and thickness of the canopy. The modification made allows inferring that the specie has a tolerance for urea, using it as a resource, increasing the potential for growth in appropriate conditions in vitro; however, a period of acclimatization is required to optimize the function of the roots.

Key words: orchid, micropropagation, organic nitrogen sources.

### 3 INTRODUÇÃO

O Brasil tem grande importância no mercado internacional de floricultura, com parceiros como Holanda e Estados Unidos, entretanto, pode estar perdendo mercado, sendo necessários investimentos nesse setor visando à produtividade (Kiyuna et al., 2007). A produção *in vitro* é de grande importância para esse mercado, pois proporciona alto valor agregado ao produto final, permitindo maior qualidade fitossanitária às plantas (Bosa et al., 2003).

*Laelia* é um pequeno gênero de orquídea que consiste de 22 espécies encontradas desde o México até a América do Sul, muito cultivada e explorada pela beleza das flores (Ávila-Díaz et al., 2009). Devido à intensa exploração, que ocasiona a destruição de seus habitats, levando inúmeras espécies à extinção, técnicas biotecnológicas, como o cultivo *in vitro*, o qual utiliza meios nutritivos que fornecem as substâncias essenciais para seu crescimento e desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas *ex vitro* são conservadas em material vegetal *in vitro*. Por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto às concentrações dos sais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas *in vitro* (Caldas et al., 1998; Moreira et al., 2007).

Alterações no balanço final da concentração dos sais nos meios nutritivos, principalmente do nitrogênio, podem provocar modificações nas taxas de crescimento, na morfologia e na totipotência celular (Primavesi et al., 2005).

A combinação entre as formas de nitrogênio, como o amônio e o nitrato, pode modificar as características de desenvolvimento das espécies (Villa et al., 2009; Araújo et al., 2009). As substituições das formas inorgânicas de nitrogênio por ureia são uma alternativa desejável ao cultivo *in vitro* de plantas de interesse comercial. Para o cultivo do abacaxi, essa substituição demonstrou ser

interessante alternativa para a melhoria da qualidade das plantas (Moreira et al., 2007).

Modificações na estrutura interna das plantas podem ocorrer quando estão sob condições de cultivo *in vitro* (Santana et al., 2008; Costa et al., 2009). Tais modificações incluem alterações na espessura do mesofilo, epiderme e densidade de estômatos e nas raízes, influenciando na epiderme, na endoderme, no córtex e no cilindro vascular de plantas cultivadas. Condições ambientais também podem influenciar no conteúdo de clorofilas a, b e a relação a/b, consequentemente influenciando a eficiência fotossintética das plantas (Franco & Dillenburg, 2007; Streit et al., 2005; Nakazono et al., 2001; Grisi et al., 2008; Pereira et al., 2008).

Diante disso, objetivou-se estudar a viabilidade técnica da substituição do nitrato de amônio por ureia como fonte de nitrogênio na micropropagação de plântulas de *Laelia purpurata* ‘carnea’, visando compreender a dinâmica desta substituição e sua influência na qualidade das plântulas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

### 4.2 Cultivo *in vitro*

Plântulas de *Laelia purpurata* ‘carnea’ com 1 cm de comprimento, provenientes de germinação *in vitro*, foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 2,68  $\mu\text{mol}$  de ANA + 13,72  $\mu\text{mol}$  de  $\text{GA}_3$  + 2  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado + 100  $\text{g.L}^{-1}$  de polpa de banana (nanica), solidificado com 6  $\text{g.dm}^{-3}$  de ágar, pH ajustado para 5,8 e autoclavado a 121°C e 0,1 atm, por 20 minutos.

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, as plântulas foram inoculadas em frascos de 200 mL com 30 mL do meio de cultivo MS modificado de acordo com o tratamento. Os frascos foram fechados com tampas de polipropileno, vedados e transferidos para sala de crescimento, onde foram mantidos à temperatura de  $27\pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $32\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas.

#### **4.3 Substituição do nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) por uréia ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ )**

Os tratamentos consistiram da substituição do N na concentrações de 0%, 25% ( $144,4\ \text{mg L}^{-1}$ ), 50% ( $288,85\ \text{mg L}^{-1}$ ), 75% ( $433,2\ \text{mg L}^{-1}$ ) e 100% ( $577,7\ \text{mg L}^{-1}$ ) de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) por uréia ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ), 0%, 25% ( $309,51\ \text{mg L}^{-1}$ ), 50% ( $619,02\ \text{mg L}^{-1}$ ), 75% ( $928,53\ \text{mg L}^{-1}$ ) e 100% ( $1228,04\ \text{mg L}^{-1}$ ) não sendo alterado o balanço de nitrogênio fornecido pelo meio MS.

#### **4.4 Análise de crescimento**

Após 120 dias de subcultivo, plântulas de *L. purpurata* ‘carnea’ foram avaliadas com base nas seguintes características: número de folhas (NF), número de raízes (NR), biomassa seca folha (BSF) e biomassa seca de raízes (BSR). As plântulas foram secas em estufa de circulação forçada, a  $70^\circ\text{C}$ , até peso constante.

#### **4.5 Doseamento de clorofila**

Foi medido o teor de clorofilas das folhas das plântulas *in vitro*. A extração foi conduzida com 30 mL de acetona 80%, macerando-se 1g de tecido foliar (fresco) em grau e pistilo. O extrato foi filtrado e diluído para 50 mL. Os extratos foram avaliados em espectrofotômetro nos comprimentos de ondas  $\lambda=645$  e  $663\ \text{nm}$  e os teores de clorofila **a** e **b** calculados pelas diferenças nas absorbâncias segundo método adaptado de Franco & Dillenburg, (2007) e Arnon (1949) (Figura 1).

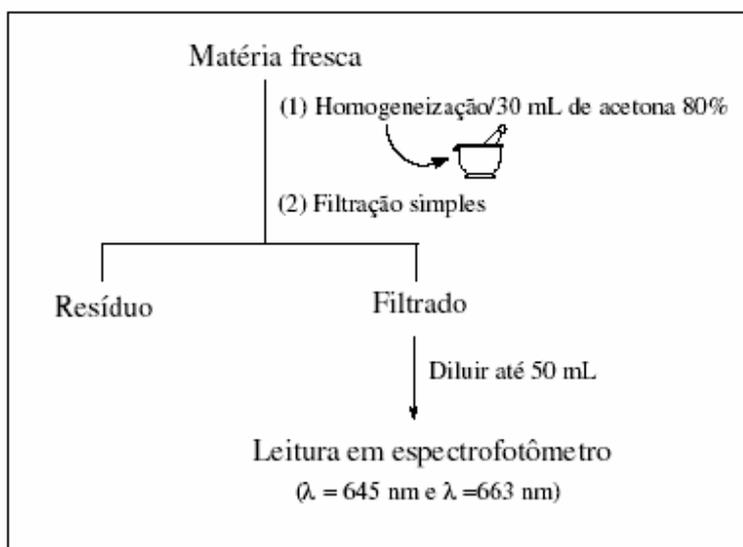


FIGURA 1 Protocolo de extração e quantificação de clorofila

Durante todo o processo de extração da clorofila, o ambiente foi mantido escuro e o filtrado foi coletado em frascos opacos para evitar qualquer tipo de fotodegradação da molécula. Os respectivos cálculos (clorofila total, clorofila a e clorofila b) foram realizados com base nas equações seguintes:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g.mL}^{-1}) = 12,7A_{663} - 2,69A_{645}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g.mL}^{-1}) = 22,9 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663}$$

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g.mL}^{-1}) = 20,2 \cdot A_{645} + 8,02 \cdot A_{663}$$

#### 4.6 Anatomia foliar e de radicular

As amostras dos tecidos foliares e das raízes de *L. purpurata* foram fixadas em F.A.A. 70% (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 70%), por 72 horas, após o qual foram armazenadas em etanol 70%, até a data das análises

(Pereira et al., 2008). Foram feitos cortes transversais nas folhas em micrótomo de mesa e coradas com solução [safrablau (safranina (1%) e azul de astra (1%) na proporção de 7:3] e cortes transversais das raízes na região a 4,5 cm a partir da região apical das raízes. Os cortes foram corados com solução safrablau (Pereira et al., 2008). Foram feitas lâminas semipermanentes com os cortes montados em lâmina e lamínula com glicerina 50% e selados com resina de nitrocelulose. As lâminas foram observadas em microscópio óptico Olympus BX60 com câmera digital Canon A630 acoplada. Foram realizadas fotomicrografias e essas analisadas em software de análise de imagens UTHSCSA imagetool, onde foram realizadas as medidas de espessuras da epiderme da face abaxial (EAB) e adaxial (EAD), espessura do mesofilo (MF) e do limbo foliar (LB) nas folhas e análise comparativa das estruturas radiculares (Pereira et al., 2008).

#### **4.7 Delineamento experimental**

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e dez repetições, cada uma composta por um frasco com cinco plântulas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o software estatístico Genes (Cruz, 2006).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferentes doses de ureia promoveram modificações significativas para os parâmetros de desenvolvimento avaliados (Tabela 1).

TABELA 1 Número de folhas (NF), número de raízes (NR), biomassa seca de folhas (BSF) e biomassa seca de raízes (BSR) de plântulas de *L. purpurata* 'carnea' micropropagadas em diferentes porcentagens de N.

Fontes de N (%)	NF	NR	BSF (g)	BSR (g)
100% NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,46 c	3,71 b	0,165 b	0,253 b
25% CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O + 75% NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	4,27 b	4,65 b	0,174 b	0,267 b
50% CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O+ 50% NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	4,99 a	4,31 b	0,151 b	0,298 b
75% CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O+25% NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5,45 a	6,03 a	0,185 a	0,357 a
100% CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	3,33 b	6,78 a	0,161 b	0,260 b

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey 5% probabilidade.

A adição de ureia ao meio de cultura na concentração de 75% apresentou incrementos em todas as características analisadas. Ocorreu um aumento de cerca de 120% no número de folhas, 62% no número de raízes, de 22,51% na biomassa seca de folhas e de 41,11% na biomassa seca de raízes (Tabela 1). Esses resultados sugerem que as plântulas de *L. Purpurata* 'carnea' são tolerantes e capazes de assimilar a ureia como forma inorgânica de nitrogênio, até a concentração de 75%. A concentração de uréia 100% prejudicou o desenvolvimento das plântulas *in vitro*, reduzindo os valores de todas as características analisadas, exceto para NR (Tabela 1).

Contrariamente aos resultados observados neste trabalho, Fráguas et al. (2003) verificaram que concentrações acima de 20% de ureia adicionada ao meio de cultura promoveram efeitos fitotóxicos no cultivo *in vitro* de gloxínia (*Gloxinia speciosa*). Villa et al. (2009), estudando a viabilidade da substituição do nitrato de amônio por ureia em amoreira-preta, constataram que a substituição acima de 20 mg.dm<sup>-3</sup> provocou redução do comprimento da parte aérea, número de folhas e biomassa fresca da parte aérea. Esses resultados estão de acordo com os relatados por Primavesi et al. (2005) que verificaram modificações na taxa de crescimento e na morfologia das plantas cultivadas *in vitro*, decorrentes de modificações na concentração de sais.

Para biomassa seca de folhas (BSF) e biomassa seca de raízes (BSR), houve redução em ambas as variáveis no tratamento com 100% de ureia. Esta redução representa apenas 12,9% e 27,1%, respectivamente, com relação ao tratamento com 75% de ureia (Tabela 1). Tal redução não comprometeu o desenvolvimento *ex vitro*, pois todas as plântulas foram aclimatizadas e obtiveram percentual de sobrevivência de 100%.

Com relação aos teores de clorofila **a**, **b**, clorofila total e razão **a/b**, houve efeito significativo das concentrações de ureia no meio de cultura para a micropropagação de *L. purpurata* 'carnea'. Ocorreu um aumento de 19,81% no teor de clorofila a no tratamento com 50% de ureia em relação aos tratamentos com menores concentrações de ureia, tendo os tratamentos com maiores concentrações de ureia (75% e 100%) exibido um teor de clorofila a 54,8% superior ao tratamento sem ureia (Tabela 2). A clorofila b teve uma queda de 6,6% no tratamento com 25% de ureia, em relação ao tratamento com nitrato. Contudo, nas concentrações 50% a 100% de ureia, observou-se um aumento de cerca de 200,14% no seu conteúdo em relação ao tratamento com 100% nitrato (Tabela 2). As clorofilas totais aumentaram em 62,39% no tratamento com 50% de ureia, tendo esse aumento sido de cerca de 89,53% nos tratamentos com

maior concentração de ureia (Tabela 2). No entanto, a razão clorofilas a/b aumentou em 18,93% no tratamento com 25% de ureia e, posteriormente, reduziu em 58,80% nos tratamentos com maior concentração de ureia (Tabela 2).

TABELA 2 Teores de clorofila **a**, **b**, total e razão **a/b** em folhas de *L. purpurata* ‘carnea’ micropropagada com diferentes concentrações de nitrato de amônio e ureia em meio Murashige e Skoog (MS)

Fontes de N	Clorofila $\mu\text{g mL}^{-1}$			
	a	b	total	a/b
100% $\text{NH}_4\text{NO}_3$	09,54 c	3,17 b	12,71 c	3,01 b
25% $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ + 75% $\text{NH}_4\text{NO}_3$	10,62 c	2,96 c	13,58 c	3,58 a
50% $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ + 50% $\text{NH}_4\text{NO}_3$	11,43 b	9,21 a	20,64 b	1,24 c
75% $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ +25% $\text{NH}_4\text{NO}_3$	13,87 a	9,80 a	23,67 a	1,41 c
100% $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	14,77 a	8,32 a	24,09 a	1,58 c

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

A estabilidade do conteúdo de clorofilas a partir da dose de 75% de ureia pode ser parcialmente relacionada com o chamado ponto de maturidade fotossintético, que se mantém invariável mesmo com aumento nos teores de N no tecido da planta (Costa et al., 2001). A relação normal das plantas para a razão clorofila **a/b** é de 3:1 (Streit et al., 2005), estando essa razão próxima da encontrada com a aplicação de nitrato (Tabela 2). Contudo, com a aplicação de ureia, essa relação passou para 3,5, o que pode ser um fator interessante, pois a clorofila **a** é que recebe a energia do complexo antena dos fotossistemas e transmite essa energia na dissipação fotoquímica (Taiz & Zeiger, 2006). Porém, nas maiores concentrações, essa relação cai para valores próximos a 1,5, que pode estar relacionado a uma maior proporção de clorofila **b** nessas folhas

(Tabela 2). Essa redução da relação clorofila **a/b** é frequentemente observada nas plantas sombreadas (Franco & Dillenburg, 2007), sendo a clorofila **b** referenciada como um pigmento acessório importante na fotossíntese, otimizando o funcionamento do fotossistema II em condições de sombra (Koike et al., 2001; Nakazono et al., 2001).

Dessa forma, pode-se perceber aumento no total de clorofilas de *L. purpurata* e favorecimento do teor de clorofila **b** com as doses crescentes de ureia, fato que pode ser um fator positivo, pois o aumento da eficiência fotossintética pela maior quantidade de clorofila **a** e o maior efeito protetor do maior teor de clorofila **b** nos complexos antena podem favorecer a fotossíntese na espécie cultivada em meio contendo ureia como fonte alternativa de nitrogênio, sendo potenciais para a melhoria da produção dessa espécie, fator necessário no contexto do atual mercado (Kiyuna et al., 2008). Dessa forma, as plantas cultivadas nessas condições podem agregar a qualidade, frequentemente referida para as plantas cultivadas *in vitro* (Bosa et al., 2003).

Quanto às características anatômicas, as folhas em secção transversal apresentaram epiderme unisseriada tanto na face abaxial como na adaxial, clorênquima homogêneo com células arredondadas, parede celular delgada e de maior tamanho na região central (Figura 1 A-D). O cultivo *in vitro* pode provocar modificações na anatomia, como a presença de parede celular mais sinuosa tanto das células do mesofilo quanto da epiderme, pois o ambiente saturado de vapor d'água pode ser o desencadeador desse fenômeno (setas) Figura 1B. Na Figura 1 E está ilustrado o provável efeito tóxico da concentração de 100% de ureia, que promoveu deformações em algumas regiões da folha, deixando-a, provavelmente, inerte nas suas funções fisiológicas e caracterizando áreas de necrose.

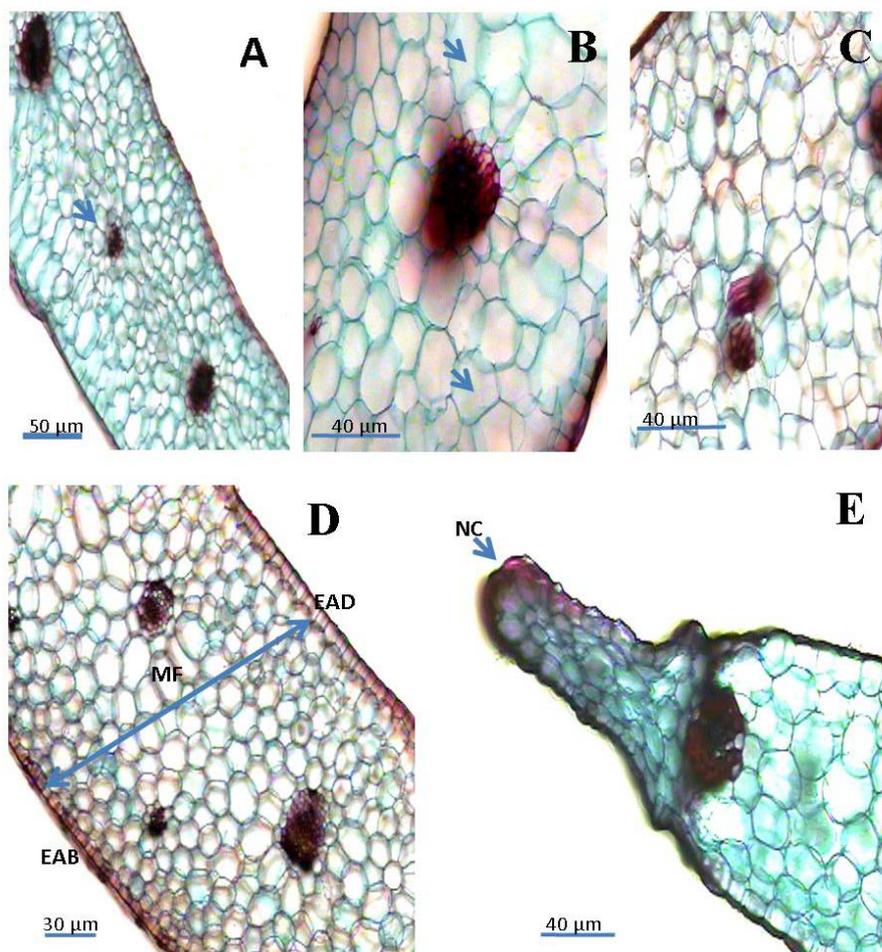


FIGURA 1 Fotomicrografias de secções transversais de folhas de *L. purpurata* ‘carnea’ cultivada em meio MS com diferentes concentrações de nitrato de amônio e ureia. Nitrato de amônio: 100% (A); ureia: 25% (B); 50% (C); 75% (D) e 100% (E). EAD: epiderme da face adaxial; MF: mesofilo; EAB: epiderme da face abaxial, NC: necrose.

Não ocorreram diferenças significativas na epiderme de ambas as faces das folhas de *L. purpurata*, em função das diferentes concentrações de ureia

utilizadas no meio MS (Tabela 3). Contudo, pode-se perceber um aumento de 28,11% na MF do tratamento com 75% de ureia em relação aos tratamentos com concentrações menores (Tabela 3). Percebe-se, ainda, redução de 45,37% na MF no tratamento com 100% de ureia em relação ao com 75%, tendo essa redução sido de 30,02% em relação aos tratamentos com concentrações abaixo de 75% (Tabela 3).

O espessamento do LB seguiu um padrão semelhante ao MF, com aumento de 20,79% no tratamento de 75% de ureia em comparação com os tratamentos menos concentrados, seguido de uma redução de 44,44% no tratamento com 100% de ureia em relação ao de 75% e de 16,17% nos tratamentos com menos de 75% de ureia.

Ausência de modificações na espessura da epiderme de ambas as faces das folhas foi relatada por Grisi et al. (2008) em cafeeiros em estresse hídrico. Os autores verificaram, ainda, um efeito semelhante ao observado no mesofilo, com aumento na espessura. O aumento da espessura foliar (equivalente ao LB) foi observado também em plantas de *Annona glabra* L. à medida que foi aumentando a aeração do meio de cultura (Santana et al., 2008). O espessamento do mesofilo também foi verificado em bananeiras cultivadas *in vitro* durante a aclimatização, favorecendo as funções foliares (Costa et al., 2009). Os tecidos foliares podem se adaptar de acordo com as variações ambientais para otimizar a sua estrutura e função (Castro et al., 2009).

Dessa forma, a ausência de modificações na epiderme de ambas as faces pode estar relacionada à ausência de pressões que influenciassem nas variações quantitativas desse tecido, pois ele funciona como uma comunicação com o meio, auxiliando no controle da transpiração (Castro et al., 2009) e o ambiente *in vitro* pode ter mantido alta umidade relativa, não sendo necessário um espessamento da epiderme para reduzir a transpiração e as diferentes concentrações de ureia não influenciaram nesse tecido.

Contudo, o espessamento do mesofilo e das folhas de *L. purpurata* está diretamente relacionado com o clorênquima que, aumentando em tamanho, pode conferir maior eficiência fotossintética às folhas dessa espécie com o uso de ureia na concentração de 75%; em concentrações mais altas, pode ter ocorrido toxicidade e, com isso, redução na espessura desse tecido. O aumento do LB está diretamente relacionado com o aumento do MF, não tendo a epiderme sofrido modificações. Assim, a concentração de 75% de ureia parece ser favorável a essa espécie, podendo contribuir com a fotossíntese.

TABELA 3 Espessura dos tecidos e do limbo foliar de *Laelia purpurata* ‘carnea’ micropropagada em diferentes concentrações de ureia.

Fontes de N (%)	EAD ( $\mu\text{m}$ )	EAB ( $\mu\text{m}$ )	MF ( $\mu\text{m}$ )	LB ( $\mu\text{m}$ )
100% $\text{NH}_4\text{NO}_3$	22,76 a	21,98 a	087,78 b	132,52 b
25% $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ + 75% $\text{NH}_4\text{NO}_3$	23,87 a	19,03 a	086,98 b	129,88 b
50% $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ + 50% $\text{NH}_4\text{NO}_3$	24,59 a	22,65 a	085,87 b	133,11 b
75% $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ + 25% $\text{NH}_4\text{NO}_3$	24,21 a	23,66 a	110,01 a	156,88 a
100% $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	22,76 a	21,76 a	060,09 c	108,61 c

EAD = epiderme da face adaxial, EAB = epiderme da face abaxial, MF = espessura do mesofilo, LB = espessura do limbo foliar. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey 5% probabilidade.

As raízes são poliarcas com endoderme composta de uma camada de células com espessamento em “O” e apresentam células de passagem alinhadas com os polos de metaxilema (Figura 2 F). Com a adição de ureia, pode-se perceber uma redução no tamanho da medula e a área ocupada pela medula nas raízes de *L. purpurata* permite verificar uma redução de 20%, 56%, 69% e 81%,

para as respectivas concentrações 25%, 50%, 75% e 100% de ureia (Figura 2). Percebe-se que ocorreu, ainda, uma modificação na morfologia das células da endoderme, com um intenso aumento de tamanho e modificação do formato alongado longitudinalmente para um mais arredondado (Figura 2 F-J). Essas modificações na estrutura interna das raízes foram acompanhadas por um aumento na quantidade de raízes finas.

Modificações na endoderme e na medula podem ser decorrentes de diferentes fatores, como, por exemplo, o alagamento (Pereira et al., 2008). A endoderme é uma barreira anatômica que pode auxiliar no controle do fluxo de água, contaminantes e microrganismos presentes no substrato (Castro et al., 2009; Pereira et al., 2008). Mayer et al. (2008) verificaram modificações na estrutura de raízes de orquídeas cultivadas *in vitro*, independente da concentração de sais no meio, decorrentes do processo de micropropagação, que as deixavam menos funcionais.

A redução da medula associada com uma maior produção de raízes finas pode ser uma característica benéfica para as plantas de *L. purpurata*, pois raízes finas são mais funcionais quanto à absorção de água e nutrientes e, dessa forma, podem apresentar maior capacidade de absorver o nitrogênio do meio de cultura, podendo estimular o desenvolvimento de novas raízes pelo aumento na síntese de auxinas e citocininas (Taiz & Zeiger, 2006; Epstein, 2001).

Tais resultados podem ter contribuído também para o aumento observado no número de raízes (Tabela 1). Entretanto, Villa et al. (2009) observaram que concentrações deste sal acima de 20 mg dm<sup>-3</sup> provocam diminuição na emissão de novas raízes. Esses fatos demonstram alta capacidade adaptativa das plantas de *L. purpurata*, que se desenvolveram bem em altas concentrações de ureia no meio de cultura, com aumento no número de raízes, favorecendo a micropropagação dessa espécie (Tabela 1).

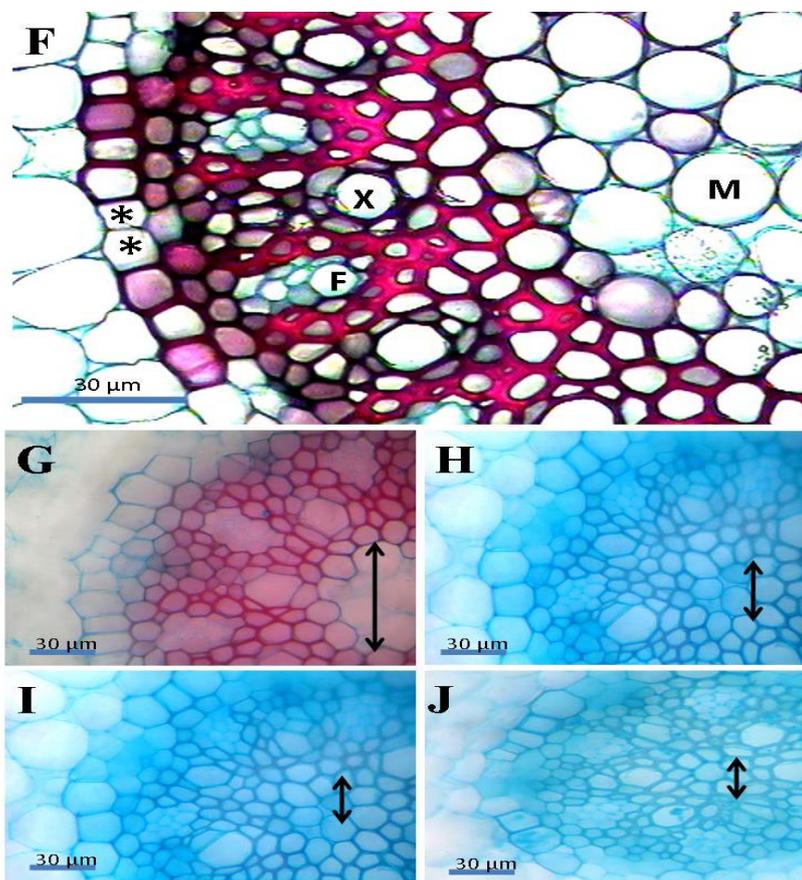


FIGURA 2 Secções transversais de raízes de *L. purpurata* 'carnea' cultivadas em diferentes concentrações de nitrato de amônio e ureia. F. MS 100% nitrato de amônio; G. MS+ 25% ureia; H. MS+ 50% ureia; I. MS + 75% ureia; J. MS+100% ureia. F, floema; X, xilema; M, medula. (\*) células de passagem.

As modificações ocorridas no velame e na exoderme das raízes de *L. purpurata* em função das diferentes concentrações de ureia estão ilustradas na Figura 3. Percebe-se redução na espessura desse tecido, associada também com

a modificação no formato das células que, de uma morfologia isodiamétrica ou semelhante a uma forma paliçada (Figura 3M), passam para um formato tabular (Figura 3O). Ocorrem, ainda, modificações na exoderme com o desenvolvimento de um maior número de idioblastos, em comparação aos tratamentos com menor concentração de ureia (Figura 3M). A exoderme pode ser importante como uma barreira apoplástica ao refluxo de água e entrada de patógenos (Castro et al., 2009; Pereira et al., 2008).

Durante as fases do cultivo *in vitro*, as plântulas crescem sob condições especiais de redução das trocas gasosas, alta umidade do ar, baixas intensidade luminosa e uso de açúcar como fonte de energia (Pospislová et al., 1999). Dessa forma, pode-se perceber que a diferenciação presente na exoderme de *L. purpurata* pode estar relacionada com a redução nas funções do velame que, com a captação do vapor de água, deve conduzi-la na forma líquida através das células menores presentes na exoderme das raízes (Figura 3P) para que essa água chegue ao córtex e, posteriormente, ao cilindro vascular, onde será distribuído por toda a planta. Assim, no ambiente *in vitro*, essa função deixa de ser essencial, devido às condições ótimas de umidade presentes nesse ambiente. Essas características apontam para a necessidade da fase de aclimatização para as plântulas de *L. purpurata* cultivadas *in vitro*.

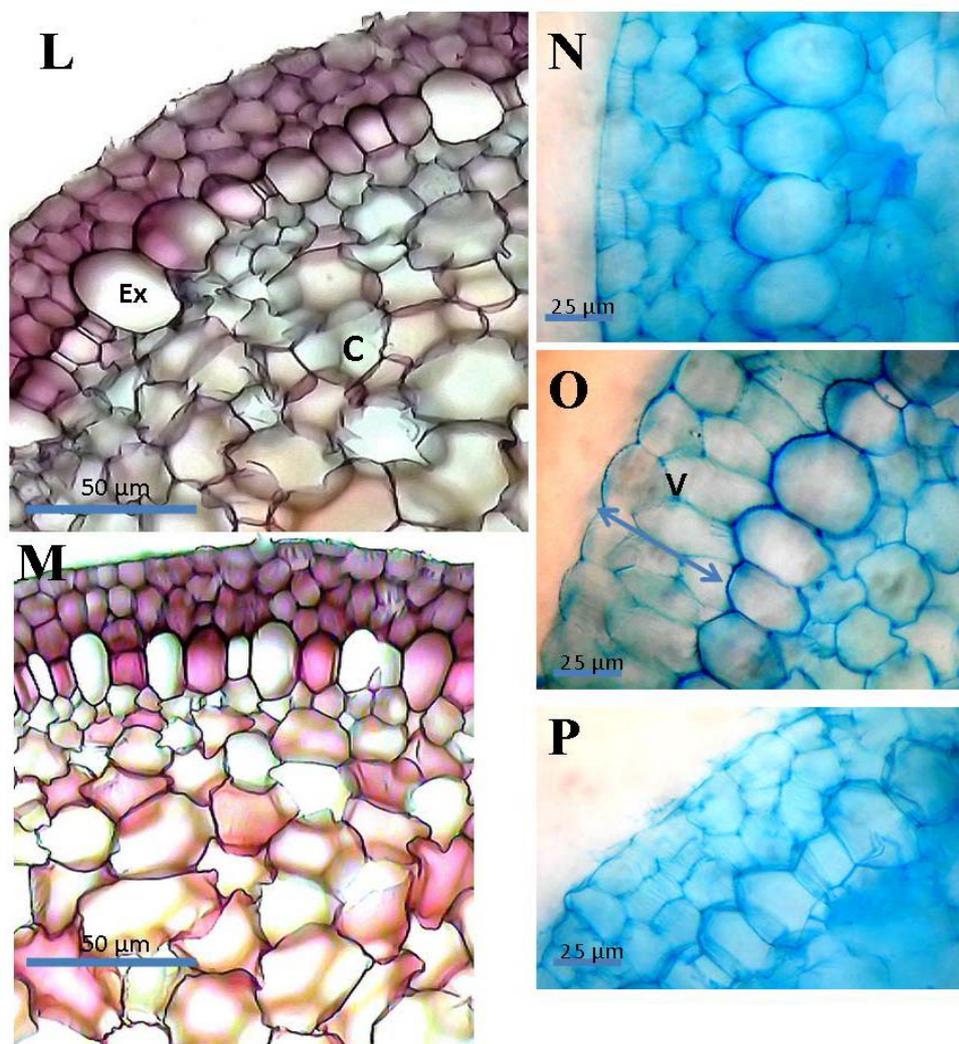


FIGURA 3 Secções transversais de raízes de *L. purpurata* 'carnea' cultivadas com diferentes concentrações de nitrato de amônio e ureia. L. MS 100% nitrato de amônio; M. MS+ 25% ureia; N. MS+ 50% ureia; O. MS + 75% ureia; P. MS+100% ureia. Ex, exoderme; C, cortex; V, velame.

As plântulas de *L. purpurata* cultivadas *ex vitro* e *in vitro* sem a adição de ureia demonstraram diferenças na estrutura interna das suas raízes (Figura 4). Ocorreram modificações no diâmetro do cilindro vascular das plântulas cultivadas *in vitro* em comparação com as cultivadas *ex vitro*, com redução no diâmetro do cilindro vascular e redução no número de pólos de metaxilema (Figura 3 Q e R). Ocorreu, ainda, redução na espessura do velame dessas raízes com redução no número de camadas celulares (Figura 3S e T).

Pressões ambientais podem influenciar as características das raízes, podendo a redução do diâmetro do cilindro vascular ser associada a uma redução na condutividade hidráulica (Castro et al., 2009). O velame é uma especialização que pode ser associada com a captação de água e gases atmosféricos, além da proteção (Castro et al., 2009). Pereira et al. (2008) verificaram modificações no diâmetro do cilindro vascular de raízes de milho sob alagamento, com um aumento do diâmetro do cilindro vascular nos ciclos de seleção mais resistentes a esse estresse. Os mesmos autores verificaram também um aumento no número de vasos de metaxilema, associado com maior eficiência do sistema vascular dessas plantas.

Dessa forma, o cultivo *in vitro* parece ter promovido modificações na estrutura das raízes de *L. purpurata* deixando-as menos funcionais, por reduzir a condutividade hidráulica e a proteção das raízes contra patógenos. Esses fenômenos estão, provavelmente, associados com o ambiente *in vitro* que promove condições ótimas para o desenvolvimento das plântulas, sem que essas sofram pressões e prováveis modificações que possibilitem a adaptação das mesmas. Tais fatos não restringem a produção dessa espécie, mas podem indicar a necessidade de um período de aclimatização para melhor desenvolvimento dessas estruturas.

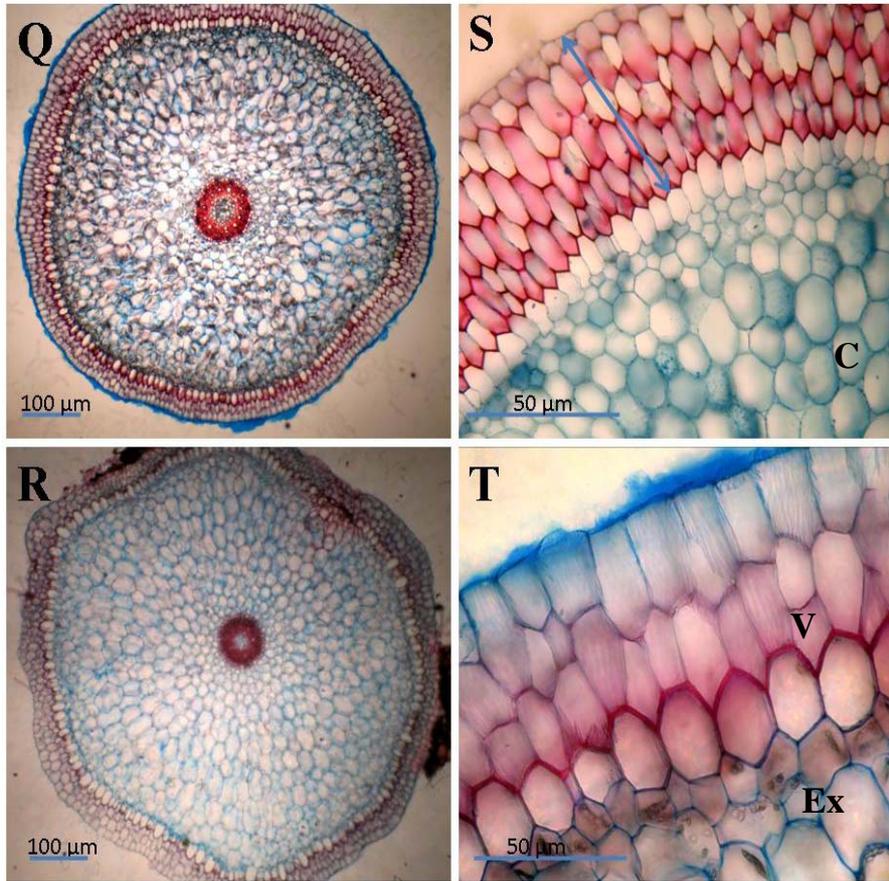


FIGURA 4 Secções transversais das raízes de *L. purpurata* 'carnea' cultivadas *ex vitro* (Q e S) e *in vitro* sem a adição de ureia (R e T).

## **6 CONCLUSÕES**

As plântulas de *L. purpurata* são capazes de utilizar a ureia durante a propagação *in vitro*, com melhorias nas características de desenvolvimento dessas plantas na concentração de 75%, com efeitos tóxicos na dose de 100%.

O uso de ureia como fonte alternativa de nitrogênio promoveu modificações no mesofilo das plantas, favorecendo o desenvolvimento dos tecidos fotossintéticos nas doses de 75% e 100% de ureia que, em conjunto com os melhores resultados para a concentração de clorofila nos tecidos, podem auxiliar na capacidade fotossintética dessas plantas.

O cultivo *in vitro* e a adição de ureia promovem modificações nas características morfológicas das raízes quanto ao cilindro vascular e velame, deixando-as menos funcionais e indicando a necessidade de uma fase de aclimatização para essas plantas.

## **7 AGRADECIMENTOS**

À Fapemig e ao CNPq, pelo auxílio financeiro para a realização do presente trabalho.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; CARVALHO, J. G. de; ZARRAGA, D. Z. A. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, Maringá, v. 31, n. 1, p. 35-39, mar. 2009.

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

ÁVILA-DIAZ, I.; OYAMA, K.; GÓMEZ-ALONSO, C.; SALGADO-GARCIGLIA, R. In vitro propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, n. 3, p. 335-343, Dec. 2009.

BOSA, N.; CALVETE, E. O.; KLEIN, V. A.; SUZIN, M. Crescimento de mudas de gipsofila em diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 514-519, jul./set. 2003.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1, p. 1-30.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

COSTA, C.; DWYER, L. M.; DUTILLEUL, P.; STEWART, D. W.; MA, B. L.; SMITH, D. L. Inter-relationships of applied nitrogen, spad, and yield of leafy and non-leafy maize genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 8, p. 1173-1194, July 2001.

COSTA, F. H. S.; CASTRO, E. M.; PASQUAL, M.; PEREIRA, J. E. S.; OLIVEIRA, C. Alterações anatômicas de bananeiras micropropagadas em resposta a aclimatização ex vitro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 2, p. 386-392, mar./abr. 2009.

CRUZ, C. D. **Programa genes: biometria**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2006. v. 1. 382 p.

EPSTEIN, E. Silicon in plants, facts vs. concepts. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier, 2001. p. 1-15.

FRÁGUAS, C. B.; CHAGAS, E. A.; FERREIRA, E. M.; CARVALHO, J. G.; PASQUAL, M. Micropropagação de gloxínia em diferentes concentrações de nitrato de amônio e uréia. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 811-815, jul./ago. 2003.

FRANCO, A. M. S.; DILLENBURG, L. R. Ajustes morfológicos e fisiológicos em plantas jovens de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em resposta ao sombreamento. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 135-144, jun. 2007.

GRISI, F. A.; ALVES, J. D.; CASTRO, E. M.; OLIVEIRA, C.; BIAGIOTTI, G.; MELO, L. A. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café 'Catuai' e 'Siriema' submetidas ao estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1730-1736, dez. 2008.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução a taxonomia vegetal. 13. ed. São Paulo: Nacional, 2002.

KIYUNA, I.; ÂNGELO, J. A.; COELHO, P. J. Floricultura: desempenho do comércio exterior em 2007. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 3, n.1, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=9186>>. Acesso em: 28 out. 2009.

KOIKE, T.; KITAO, M.; MARUYAMA, Y.; MORI, S.; LEI, T. T. Leaf morphology and photosynthetic adjustments among deciduous broadleaved trees within the vertical canopy profile. **Tree Physiology**, Oxford, v. 21, n. 12/13, p. 951-958, 2001.

MAYER, J. L. S.; RIBAS, L. L. F.; BONA, L.; QUOIRIN, M. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasílica**, Porto Alegre, v. 22, n. 2, p. 323-332, jun. 2008.

MOREIRA, B. M. T.; TOMBA, E. C.; ZONETTI, P. C. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea (*Laelia purpurata* Lindl var *venosa* X *Cattleya warneri* T. Moore alba) sob diferentes concentrações de sacarose frutose. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 2, n. 2, p. 16-21, jul./dez. 2007.

MOREIRA, M. A.; FRÁGUAS, C. B.; CARVALHO, J. G.; PASQUAL, M. Uréia como fonte alternativa de nitrogênio na micropropagação de abacaxizeiro cv. Pérola. **Acta Scientiarum**. Agronomy, Maringá, v. 29, p. 689-693, nov. 2007. Suplemento.

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

NAKAZONO, E. M.; COSTA, M. C.; FUTATSUGI, K.; PAULILO, M. T. S. Crescimento inicial de *Euterpe edulis* Mart. em diferentes regimes de luz. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 173-179, jun. 2001.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1649-1656, dez. 2008.

POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 42, n. 4, p. 481-497, Dec. 1999.

PRIMAVESI, A. C.; PRIMAVESI, O.; CORRÊA, L. A.; CANTARELLA, H.; SILVA, A. G. Absorção de cátions e ânions pelo capim-coastcross adubado com uréia e nitratode amônio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 4, p. 247-253, mar. 2005.

SANTANA, J. R. F.; PAIVA, R.; RESENTE, R. K. S.; CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. Stimulus of the photoautotrophic behavior during the *in vitro* rooting of *Annona glabra* L. II. Aspects of leaf anatomy before acclimatization. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 640-644, mar./abr. 2008.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, maio 2005.

TAIZ, L.; ZAIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; FRÁQUAS, C. B.; REZENDE, J. C. Utilização de nitrato de amônio e de uréia como fontes. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 5, p. 365-370, set./out. 2009.

### CAPÍTULO 3

Características anatômicas e atividade de fenilalanina amônio-liase (PAL) em plântulas de *Laelia purpurata* 'carnea' micropropagadas com diferentes fontes de silício

#### 1 RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar as características anatômicas e a atividade de fenilalanina amônio-liase (PAL) em plântulas de *L. purpurata* 'carnea' cultivadas com diferentes fontes e concentrações de silício. Foram utilizadas plântulas cultivadas *in vitro* em meio Murashige e Skoog (MS), acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e 2,68 μmol de ácido naftalenacético (ANA) e 13,72 μmol de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), acrescido de 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 100 g.L<sup>-1</sup> de polpa de banana. Os tratamentos consistiram da adição ao meio MS de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> e Ca<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dez repetições. Após 120 dias em sala de crescimento, foram avaliadas características anatômicas e atividade de PAL das plântulas. As maiores atividades de PAL, epiderme adaxial, espessura do mesofilo e espessura do limbo foliar foram verificadas nas fontes K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> e Ca<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, nas concentrações 1,5 e 2,0 g L<sup>-1</sup>.

Palavras-chave: anatomia vegetal, silício, orquídea, fenilalanina amônio-liase.

## CHAPTER 3

Activity and anatomical characteristics of *phenylalanine ammonia-lyase (PAL)* in micropropagated seedlings of *Laelia purpurata* 'carnea' with different sources of silicium

### 2 ABSTRACT

This work aimed at examining the activity and anatomical characteristics of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in micropropagated seedlings of *Laelia purpurata* 'carnea' cultivated with different sources and concentrations of silicon. In vitro seedlings on Murashige and Skoog (MS) were used, and 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 6 g L<sup>-1</sup> agar, 2.68 mol of naphthalene acetic acid (NAA) and 13.72 μmol of acid gibberellic (GA3), 2 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal and 100 gL<sup>-1</sup> of banana pulp were added. The treatments consisted of adding to the MS medium of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 g L<sup>-1</sup> K<sup>2</sup>SiO<sup>3</sup>, Na<sup>2</sup>SiO<sup>3</sup> and Ca<sup>2</sup>SiO<sup>3</sup>. The experimental delineation was completely randomized, with ten repetitions. After 120 days in a growth chamber the PAL activity and anatomical characteristics in seedlings were evaluated. The highest PAL activities, adaxial epidermis, mesophyll and clean leaf thickness were found in sources K<sup>2</sup>SiO<sup>3</sup> and Ca<sup>2</sup>SiO<sup>3</sup> at concentrations 1.5 and 2.0 g L<sup>-1</sup>.

Key words: plant anatomy, silicium, orchid, phenylalanine ammonia-lyase.

### 3 INTRODUÇÃO

Pesquisas mais recentes vêm demonstrando que o silício, mesmo não sendo considerado um elemento essencial, quando colocado à disposição das plantas contribui para o seu crescimento, em especial no cultivo *in vitro* de morango (Braga et al., 2009), na produção hidropônica da alface (Luz et al., 2006) e na redução de toxidez por metal pesado em mudas de eucalipto (Ramos, 2009).

O silício não é considerado essencial, visto que não atende aos critérios diretos e indiretos de essencialidade. Entretanto, a sua assimilação pode trazer efeitos benéficos para algumas culturas, como: resistência a doenças e pragas, tolerância à toxicidade por metais pesados a estresses hídricos e salinos, menor evapotranspiração (síntese de lignina), promoção de crescimento e nodulação em leguminosas, efeito na atividade de enzimas (fenilalanina amônio- liase) e na composição mineral, melhoria da arquitetura da planta, redução no acamamento e, conseqüentemente, aumento da taxa fotossintética (Polanczyk et al., 2008).

Dessa maneira, o silício na planta contribui para a qualidade final do vegetal, permitindo redução de perda hídrica, proteção mecânica ao ataque de insetos por desencadear a síntese de mRNA que codifica a enzima fenilalanina amônio-liase (PAL). Essa enzima catalisa a desaminação do aminoácido fenilalanina para a formação dos fenilpropanoides, moléculas precursoras dos compostos fenólicos (Taiz & Zeiger, 2006). Portanto, é a enzima-chave na síntese de fenóis, entre eles, a lignina, que aumenta o espessamento das células, principalmente as epidérmicas (Chaman et al., 2003).

O acúmulo de silício na cutícula das folhas permite a proteção às plantas e ameniza os efeitos de estresse hídrico, fitotóxico e ao ataque de pragas e doenças (Epstein & Bloom, 2006). O silício ocorre com maior frequência nas regiões de grande transpiração. Esses depósitos de sílica nos tecidos foliares,

junto às células-guarda dos estômatos e outras células epidérmicas, promovem a redução na taxa de transpiração (Braga et al., 2009).

Em cultura de tecidos, a composição do meio de cultura tem importante função nas respostas de crescimento de células e tecidos. Plantas ou explantes cultivados *in vitro* têm exigências nutricionais específicas e requerem meios nutritivos compostos por minerais, vitaminas e fontes de energia.

Diante do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar características da lâmina foliar de plântulas de *Laelia purpurata* ‘carnea’ e a atividade da enzima fenilalanina amônio-liase durante o cultivo *in vitro*, sob diferentes concentrações e fontes de silício.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado no Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

### 4.2 Cultivo *in vitro*

Plântulas de *Laelia purpurata* ‘carnea’ com 1 cm de comprimento, provenientes de germinação *in vitro*, foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) + 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado + 100 g.L<sup>-1</sup> de polpa de banana (nanica), solidificado com 6 g.dm<sup>-3</sup> de ágar, pH ajustado para 5,8 e autoclavado a 121°C e 0,1atm, por 20 minutos.

Os frascos com os explantes foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C, radiação de 52 W.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (LI-200SA; Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes. A intensidade da radiação foi mensurada diariamente por meio de três sensores de radiação acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Licor. Neb).

### **4.3 Fontes de silício**

Foram testados os silicatos de cálcio ( $\text{CaSiO}_3$ ) PM 115,2 g L<sup>-1</sup>, de sódio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) PM 156,3 g L<sup>-1</sup> e de potássio ( $\text{K}_2\text{SiO}_3$ ) PM 122,1 g L<sup>-1</sup> como fontes de silício, nas concentrações 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g L<sup>-1</sup>. O meio MS padrão foi utilizado como testemunha.

### **4.4 Avaliação e determinação da atividade de fenilalanina amônia-liase PAL (EC 4.3.1.24)**

Foi verificada a atividade da enzima fenilalanina amônio liase (PAL) em folhas, com base na técnica preconizada por Rhodes & Wooltorton (1971) e a absorbância foi determinada a 290 nm.

Amostras com 100 mg dos tratamentos foram maceradas com 1mL de tampão fosfato (pH 6,0) em gral de porcelana (Chiarotti) previamente resfriado. O macerado foi transferido para tubos eppendorf de 1,5 mL, identificados e centrifugados em microcentrífuga rotativa a 14.000 rpm, por 5 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para tubos plásticos, rotulados e armazenados à baixa temperatura. Na quantificação da PAL, utilizaram-se 6 µM de L-fenilalanina; 0,5 M de tampão TRIS-HCl (pH 8,0) e 200µL de extrato dos (esquema 1). Incubaram-se os extratos por 60 minutos, a 37°C, em banho-maria (Tecnal). Após esse período, adicionaram-se 0,05 mL de HCl 5 N e, em seguida, as concentrações de PAL foram medidas quantitativamente em 290 nm, em espectrofotômetro Shimadzu (modelo UV1601) (esquema 1) e os resultados expressos em µg/mL de ácido cinâmico.

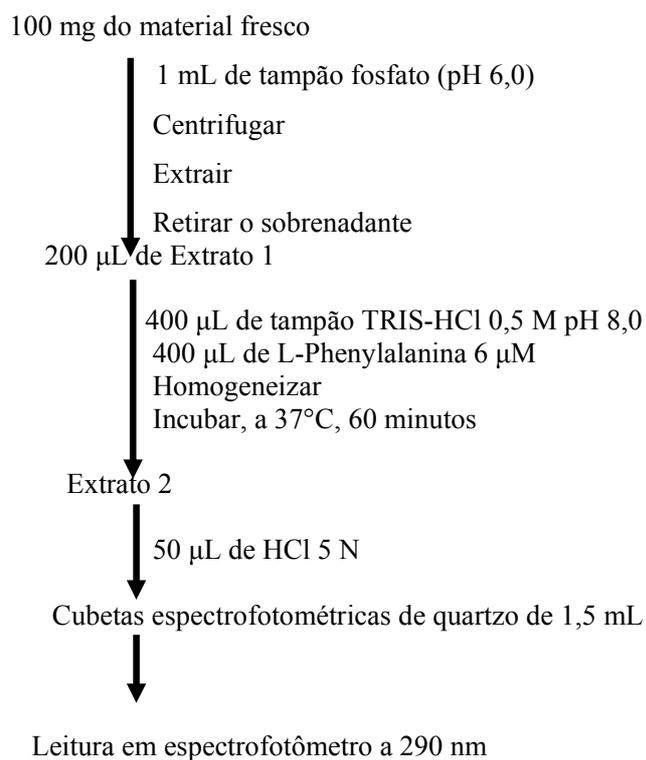
#### **Curva padrão**

A PAL teve como padrão o ácido cinâmico (Sigma). Pesaram-se 100 mg de ácido cinâmico e diluiu-se com tampão fosfato (pH 6), em balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se a solução estoque (SE) com 10 mg/mL de ácido cinâmico. Da solução estoque (SE) retirou-se a alíquota de 1mL e diluiu-se com tampão fosfato (pH 6), em balão volumétrico de 100 mL, constituindo a solução amostra

(SA) com 0,1 mg/mL ou 100 µg/mL, da qual foram retiradas alíquotas de 100 µL a 500 µL, com as concentrações de 10 µg a 50 µg, que foram adicionados a 6 µM de L-fenilalanina e 0,5 M de tampão TRIS-HCl (pH 8,0).

Procedeu-se à homogeneização e incubaram-se os extratos por 60 minutos, a 37°C, em banho-maria (Tecnal). Após esse período, adicionaram-se 0,05 mL de HCl 5 N e, em seguida, as concentrações foram quantificadas em 290 nm, em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV1601 (esquema 2) e os resultados expressos em µg.mL<sup>-1</sup>.mim<sup>-1</sup> de ácido cinâmico.

**ESQUEMA 1:** Metodologia de quantificação da atividade PAL (µg.mL<sup>-1</sup>.mim<sup>-1</sup> de ácido cinâmico) por doseamento espectrofotométrico.



## ESQUEMA 2: Curva de calibração de fenilalanina amônio liase (PAL)

PADRÃO: ÁCIDO CINÂMICO (C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>)  
PM = 148,2 (SIGMA)

CONCENTRAÇÃO DOS PADRÕES

$$C = \frac{M}{V} = 148,2 / 10 = 14,82 \text{ mg/mL}$$

148,2 mg (148,2/10 = 14,82 mg/mL)

↓  
10 mL de tampão TRIS-HCl 0,5 M, pH = 8,0  
Balão volumétrico de 10 mL  
Homogeneizar

**SOLUÇÃO ESTOQUE (14,82 mg/mL)**

↓  
Alíquota de 1 mL (14,82 mg)  
100 mL de tampão  
Balão volumétrico de 100 mL  
Homogeneizar

**SOLUÇÃO AMOSTRA (0,1482 mg/mL = 148,2 µg/mL)**

↓ Alíquotas

3,375 µL (0,5 µg)	6,75 µL (1,0 µg)	10,125 µL (1,5 µg)	13,5 µL (2 µg)	16,9 µL (2,5 µg)
100 µL (14,82 µg)	200 µL (29,64 µg)	300 µL (44,46 µg)	400 µL (59,28 µg)	500 µL (74,1 µg)
↓ PHE/Tris 498,3	↓ 496,6	↓ 494,9	↓ 493,25	↓ 491,55

↓  
Alíquotas da Solução Amostra  
ou 100 µL a 500 µL da Solução Amostra  
Tampão (C1=0 mg/mL)

B= 400 PHE+ 400 tampão + 200 tampão ou qsp amostra +50 µL HCl  
B= 400 PHE+ 400 tampão + 200 amostra ou qsp + 50 µL HCl  
B= 800 tampão + 200 amostra ou qsp + 50 µL HCl

↓  
400 µL de Tampão TRIS-HCl 0,5 M  
400 µL de L-Phenylalanina 6 µM  
Homogeneizar  
Incubar 37°C, 60 minutos

↓  
50 µL de HCL 5N  
Cubetas espectrofotométricas de quartzo de 1,5 mL

ABSORVÂNCIA  
290 nm

#### **4.5 Anatomia foliar**

As amostras dos tecidos foliares de *L. purpurata* 'carnea' foram fixadas em F.A.A. 70 (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 70), por 72 horas, após o que foram armazenadas em etanol 70%, até a data das análises (Pereira et al., 2008). Foram feitos cortes transversais nas folhas em micrótomo de mesa e coradas com solução safrablau (safranina 1% e azul de astra 1%, na proporção de 7:3). Foram feitas lâminas semipermanentes com os cortes montados em lâmina e lamínula com glicerina 50% e selados com resina de nitrocelulose. As lâminas foram observadas em microscópio óptico Olympus BX60 com câmera digital (Canon A630) acoplada.

Foram realizadas fotomicrografias e essas analisadas em software de análise de imagens UTHSCSA imagetool, em que foram medidas as espessuras da epiderme da face abaxial (EAB) e adaxial (EAD), espessura do mesofilo (MF) e do limbo foliar (LB) nas folhas e análise comparativa das estruturas radiculares (Pereira et al., 2008).

#### **4.6 Delineamento experimental**

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três tratamentos (três fontes de silício) e cinco concentrações (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g L<sup>-1</sup>), com vinte repetições, em que cada repetição foi composta por um frasco com cinco plântulas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o software estatístico Genes (Cruz, 2006).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferenças significativas na atividade da PAL frente às distintas fontes de silício estudadas. O aumento da concentração de  $\text{Ca}_2\text{SiO}_3$  exerceu incremento linear marcante na atividade da PAL, em que a maior atividade se deu quando foram adicionados  $2 \text{ g L}^{-1}$  ao meio de cultura MS. Tal aumento é de cerca de 69,4% com relação à menor concentração  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ . A adição de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  ao meio de cultura não alterou a atividade da PAL em nenhuma das concentrações testadas, indicando que a presença dessa fonte de silício ao meio de cultura não é preferencial para as plantas de *L. purpurata* 'carnea' (Figura 1).

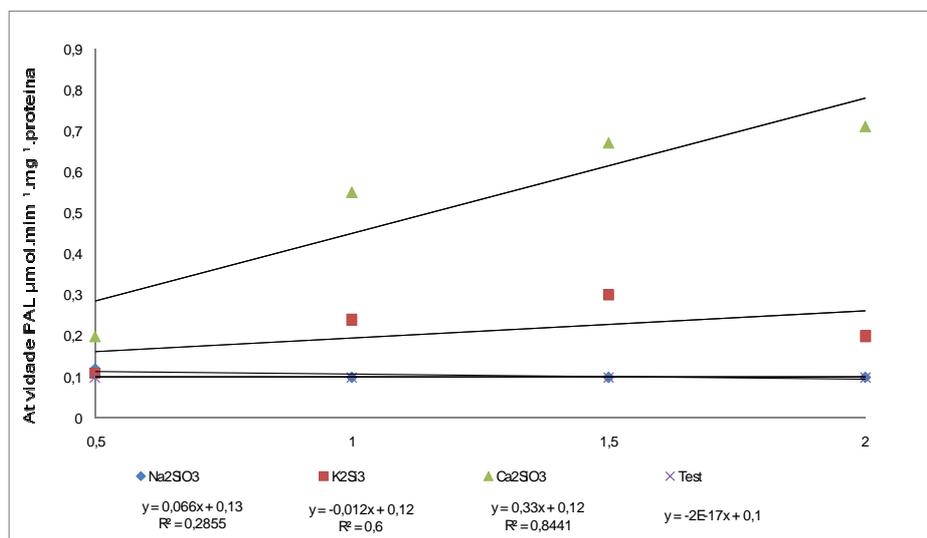


FIGURA 1 Atividade da enzima fenilalanina amônio-liase (PAL) em função de diferentes fontes e concentrações de silício, avaliada ao final de 120 dias de subcultivo ( $p \leq 0,05$ ).

A fonte  $\text{K}_2\text{SiO}_3$  promoveu efeito significativo linear, onde a maior atividade da PAL foi  $0,3 \mu\text{mol. mim}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  com  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  dessa fonte. A ausência de silício ao meio de cultura não alterou a atividade da PAL.

O silício (Si) vem sendo utilizado para a indução de resistência de plantas de batata à ação de *Myzus persicae*, pela elevação da atividade de PAL para a produção de maior conteúdo de fenóis, entre eles a lignina, impedindo, dessa forma, o ataque desse inseto. Os autores observaram que o uso de 1% de ácido silícico em adubações foliares ou adubação via solo não alterou a atividade da enzima PAL (Gomes et al., 2008). Os resultados do presente trabalho corroboram os encontrados por Gomes et al. (2005), nos quais o silício não aumentou a atividade da PAL em folhas de trigo.

Os fenóis são compostos químicos originados do metabolismo secundário das plantas que apresentam importância ecológica, visto que atuam na proteção das plantas contra herbívoros e contra patógenos (Strack, 1997). O aumento da atividade da PAL é frequentemente associado ao aumento da concentração de fenilpropanoides.

Na rota metabólica responsável pela síntese dos fenilpropanoides, os hidroxicinamatos oriundos da ação da PAL sobre o aminoácido fenilalanina alimentam várias vias metabólicas que geram diferentes compostos como lignina, flavonoides, fitoalexinas e taninos. Assim, pode ocorrer o aumento da concentração de determinado composto fenólico e a atividade da PAL se manter inalterada (Kofalvi & Nassuth, 1995). Porém, Kamida et al. (2000) verificaram que a indução de resistência em sorgo, que leva ao aumento de fitoalexinas, não aumentou a atividade da PAL. Além disso, em várias espécies vegetais, a regulação da atividade da PAL é bastante complexa, devido à existência de múltiplos genes que codificam esta enzima, alguns dos quais são expressos apenas em tecidos específicos ou sob certas condições ambientais (Taiz & Zeiger, 2006).

Quanto à espessura dos tecidos foliares, houve diferenças estatísticas para todas as variáveis analisadas, exceto para a epiderme abaxial (Tabela1). Com o aumento das concentrações de  $\text{Ca}_2\text{SiO}_3$  e  $\text{K}_2\text{SiO}_3$ , observou-se

incremento na espessura as células epidérmicas, exceto para o tratamento com  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , pois, em qualquer das concentrações testadas, não se observaram respostas no espessamento das células (Tabela 1).

Braga et al. (2009) verificaram que, com a utilização de  $1 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  adicionado ao meio de cultura na micropropagação de morangueiros, houve incrementos significativos na espessura do mesofilo de cerca de 41,1% com relação à testemunha (sem silício), 37,4% com relação ao tratamento  $\text{Ca}_2\text{SiO}_3$  e 16,8% com relação ao tratamento  $\text{K}_2\text{SiO}_3$ , todos na mesma concentração. Corroborando com os resultados desta pesquisa, Silva (2007), testando fontes de silício na micropagação de gérbera, verificou que os maiores espessamentos da epiderme adaxial foram verificados nos tratamentos com  $\text{K}_2\text{SiO}_3$  (52,12  $\mu\text{m}$ ) e  $\text{Ca}_2\text{SiO}_3$  (59,93  $\mu\text{m}$ ), quando comparados com o tratamento com  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  (51,06  $\mu\text{m}$ ).

Na epiderme foliar, o silício combina com a celulose (Silva et al., 2005) e pode estar presente nas células guarda dos estômatos e nos tricomas. Segundo esses autores, o silício também pode ser encontrado nos elementos vasculares. A deposição desse elemento na parede das células torna a planta resistente ao ataque de fungos e insetos, evita a perda excessiva de água e diminui a taxa de transpiração (Silva, 2007), o que pode elevar a taxa de sobrevivência durante o processo de aclimatização.

Não houve diferença significativa para a epiderme abaxial nem para as fontes e concentrações de silício. Aumentos na espessura das células epidérmicas da superfície abaxial foram observados por Braga et al. (2009), ao constatarem que a testemunha e o tratamento com  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  promoveram maiores espessamentos, quando comparados a outras fontes de silício no cultivo *in vitro* de morangueiro.

A espessura do mesofilo (MF) e a espessura do limbo foliar (LB) apresentaram maior espessura no tratamento  $\text{Ca}_2\text{SiO}_3$ , seguido pelo tratamento

$K_2SiO_3$ , o que era esperado, pois ambos apresentaram maior atividade da PAL (Figura 1 e Figura 2 A-D; 2 I-M).

Quando se aumenta a concentração de ambas as fontes de silício  $Ca_2SiO_3$  e  $K_2SiO_3$ , observam-se aumentos lineares nos tecidos MF e LB, dessa forma obtendo-se plantas rústicas, o que pode favorecer uma melhor adaptação da planta na fase de aclimatização. Observou-se, ainda, a presença de muitos espaços intercelulares com o aumento das concentrações de  $Ca_2SiO_3$  e  $K_2SiO_3$ . Provavelmente, o silício disponibilizado a partir desses sais ativa genes para a síntese de citocininas, cuja função é atuar nas divisões celulares (Taiz & Zeiger, 2006). Esse fato pode ser a explicação do maior aumento da espessura do limbo nessas plântulas.

Segundo Barboza et al. (2006) e Silva et al. (2008), maior espessura dos tecidos do limbo foliar confere à planta cultivada *in vitro* maior possibilidade de sobrevivência durante a transferência para ambiente *ex vitro*, o que é um fato importante para o sucesso da cultura de tecidos.

O tratamento com  $Na_2SiO_3$  não alterou a espessura do mesofilo (MF) e nem a espessura do limbo foliar (LB) em nenhuma das concentrações avaliadas (Tabela 1; Figura 2 E-H). Contrastando esses resultados, Braga et al. (2009) verificaram maiores espessamentos do mesofilo adicionando 1% de  $Na_2SiO_3$  ao meio de cultura na micropropagação de morangueiros

O que, provavelmente, pode ter ocorrido é que essa fonte de silício não é a preferencial de plântulas de *L. purpurata* 'carnea', visto que na maior concentração ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) não se observaram diferenças estatísticas, quando comparada à testemunha e a menor concentração ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) (Tabela 1; Figura 2 E-H).

Observa-se, na Figura 2 (A-D), que as concentrações de  $Ca_2SiO_3$ , promoveram melhor desenvolvimento dos feixes vasculares das células do mesofilo, as quais se apresentam em formato isodiamétrico de tamanhos

homogêneos. Isso se deve ao fato de o cálcio ser um dos principais elementos químicos constituintes da parede celular dos vegetais e por ser requerido como cofator enzimático para a maioria dos processos metabólicos (Taiz & Zeiger, 2006; Epstein & Bloom, 2006).

TABELA 1 Espessura dos tecidos e do limbo foliar de *Laelia purpurata* ‘carnea’ micropropagada em diferentes concentrações e fontes de silício.

Fontes	g L <sup>-1</sup>	EAD (µm)	EAB (µm)	MF (µm)	LB(µm)
K <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	0,5	29,87 a A	24,65 a A	89,02 bB	143,54 bB
	1,0	31,45 a A	23,63 a A	100,14 a A	155,22 bA
	1,5	33,56 a A	22,71 a A	110,43 a A	166,67 a B
	2,0	35,11 a A	23,57 a A	112,63 a A	171,31 a A
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	0,5	28,76 a A	22,66 a A	85,32 a B	136,74 aC
	1,0	29,98 a A	23,93 a A	84,53 a B	138,44 a B
	1,5	28,35 a B	24,58 a A	86,71 a B	139,64 a C
	2,0	30,45 a B	23,13 a A	85,53 a B	139,11 a B
Ca <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	0,5	30,23 a A	23,68 a A	97,43 b A	151,34 bA
	1,0	31,76 a A	21,92 a A	110,47 a A	164,15 bA
	1,5	31,65 a A	23,76 a A	117,53 a A	172,94 a A
	2,0	32,91 a A	24,49 a A	119,86 a A	177,26 a A
Test	0,0	26,82 B	23,87 <sup>a</sup>	84,88 B	135,57 C

EAD = epiderme da face adaxial, EAB = epiderme da face abaxial, MF = espessura do mesofilo, LB = espessura do limbo foliar. Teste Tukey 5% de significância. Letras minúsculas comparam a fonte de silício em diferentes concentrações e as letras maiúsculas comparam as diferentes fontes.

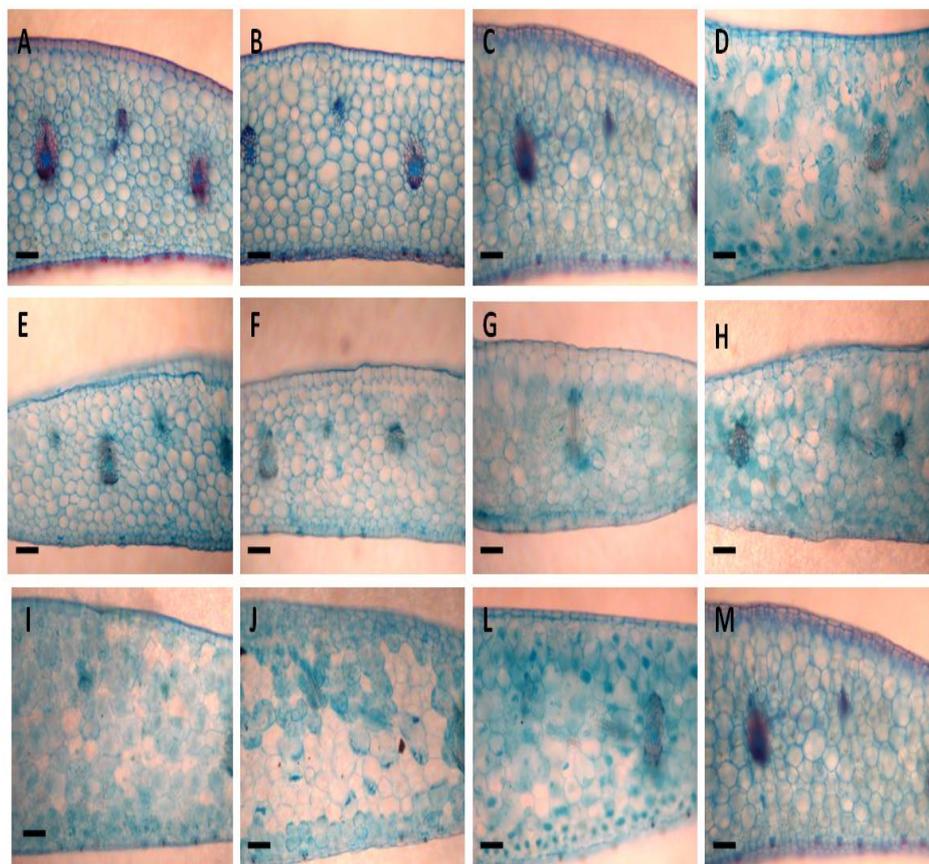


FIGURA 2. Secções transversais das lâminas foliares de *L. purpurata* 'carnea' micropropagadas em diferentes fontes e concentrações de silício. Concentrações de  $K_2SiO_3$ :  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  (A);  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  (B);  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  (C);  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  (D);  $Na_2SiO_3$ :  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  (E);  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  (F);  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  (G);  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  (H);  $Ca_2SiO_3$ :  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  (I);  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  (J);  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  (L);  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  (M). Barras  $30\mu\text{m}$ .

## **6 CONCLUSÕES**

As maiores atividades de PAL e as maiores espessuras da epiderme adaxial, do mesofilo e do limbo foliar foram verificadas nas fontes  $K_2SiO_3$  e  $Ca_2SiO_3$ , nas concentrações de 1,5 e 2,0 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A fonte de silício  $Na_2SiO_3$  não é a preferencial para a absorção.

## **7 AGRADECIMENTOS**

À Fapemig e ao CNPq, pelo auxílio financeiro para a realização do presente trabalho.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOZA, S. B. S. C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J. B.; PORTES, T. A.; SOUZA, L. A. C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 185-194, fev. 2006.

BRAGA, F. T.; NUNES, C. F.; FAVERO, A. C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G.; CASTRO, E. M. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 128-132, fev. 2009.

CHAMAN, M. E.; COPAJA, S. V.; ARGANDONÁ, V. H. Relationships between salicylic acid content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and resistance of barley to aphid infestation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 8, p. 2227-2231, Aug. 2003.

CRUZ, C. D. **Programa genes: biometria**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2006. v. 1. 382 p.

EPSTEIN, E.; BLOOM, J. A. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Planta, 2006. 403 p.

GOMES, F. B.; MORAES, J. C. de; SANTOS, C. D. dos; ANTUNES, C. S. Uso de silício como indutor de resistência em batata a *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 185-190, mar./abr. 2008.

GOMES, F. B.; MORAES, J. C. de; SANTOS, C. D. dos; GOUSSAIN, M. M. Resistance induction in wheat plants by silicon and aphids. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 6, p. 547-551, nov./dez. 2005.

KAMIDA, H. M.; PASCHOLATI, S. F.; BELLATO, C. M. Influência de *Saccharomyces cerevisiae* na expressão gênica da fenilalanina amônia-liase em tecido de sorgo protegido contra *Colletotrichum sublineolum*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 26, n. 1, p. 74-77, jan. 2000.

KOFALVI, S. A.; NASSUTH, A. Influence of wheat streak mosaic virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 47, n. 6, p. 365-377, 1995.

LUZ, J. M. Q.; GUIMARÃES, S. T. M. R.; KORNDÖRFER, G. H. Produção hidropônica de alface em solução nutritiva com e sem silício. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 295-300, jul. 2006.

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

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1649-1656, dez. 2008.

POLANCZYK, R. A.; PRATISSOLI, D.; PAYE, H. S.; PEREIRA, V. A.; BARROS, F. L. S.; OLIVEIRA, R. G. S.; PASSOS, R. R.; MARTINS FILHO, S. Indução de resistência à Mosca minadora em crisântemo usando composto silicatado. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 240-243, abr./jun. 2008.

RAMOS, S. J.; CASTRO, E. M.; PINTO, S. I. C.; FAQUIN, V.; OLIVEIRA, C.; PEREIRA, G. C. Uso do silício na redução da toxidez de zinco em mudas de eucalipto. **Interciência**, Caracas, v. 34, n. 3, p. 189-194, mar. 2009.

RHODES, M. J. C.; WOOLTORTON, L. S. C. Changes in the activity of enzymes of phenylpropanoid metabolism in tomatoes stored at low temperatures. **Phytochemistry**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 655-659, May 1971.

SILVA, A. B. da; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M. de; MIYATA, L. Y.; MELO, L. A. de; BRAGA, F. T. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr). **Interciencia**, Catanduva, v. 33, n. 11, p. 839-843, nov. 2008.

SILVA, D. P. **Meios de cultura e fontes de silício no desenvolvimento in vitro de gérbere**. 2007. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, L. P. da; SILVA, L. S. da; BOHNEN, H. Componentes da parede celular e digestibilidade in vitro de palha de arroz (*Oryza sativa*) com diferentes teores de silício. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1205-1208, set./out. 2005.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.). **Plant biochemistry**. London: Academic, 1997. p. 387-416.

TAIZ, L.; ZAIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.