

Anatomia foliar de plantas de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas

Leaf Anatomy of alfavaca-cravo plants cultivated under colored nets

Joeferson Reis Martins^I Amauri Alves Alvarenga^{II} Evaristo Mauro de Castro^{II}
Ana Paula Oliveira da Silva^{II} Cynthia Oliveira^{II} Eduardo Alves^{II}

RESUMO

No presente trabalho, foi avaliado o efeito do controle espectral da luz sobre características anatômicas de folhas em *Ocimum gratissimum* L. As plantas foram cultivadas por quatro meses sob malhas de 50% de sombreamento nas cores preta, vermelha e azul e a pleno sol. Plantas submetidas a pleno sol apresentaram maior espessura foliar, maior densidade estomática e maior densidade de tricomas tectores e glandulares na face adaxial. As plantas cultivadas sob malhas coloridas não exibiram diferenças quanto à espessura e à área foliar. As plantas mantidas sob malha vermelha tiveram a menor densidade estomática na face adaxial, já as plantas mantidas sob malhas azul e vermelha exibiram maior área foliar total. As plantas mantidas sob malha vermelha apresentaram a menor densidade estomática e as menores densidades de tricomas tectores e glandulares na face adaxial. Tais resultados mostram que tanto a intensidade como a qualidade espectral da luz pode ser modulada durante o cultivo de *Ocimum gratissimum* L. a fim de serem obtidas características anatômicas desejáveis.

Palavras-chave: *Ocimum gratissimum*, sombreamento, malhas coloridas, cloroplasto, tricomas.

ABSTRACT

In the present research, the effect of spectral control of light was evaluated on anatomical characteristics of *Ocimum gratissimum* L. leaves. The plants were cultivated during four months under black, red and blue nets with 50% of shade, and full sunlight. Plants grown under full sunlight showed higher leaf thickness, higher stomatal density and higher density of non-glandular and glandular trichomes on the adaxial epidermis. Plants cultivated under colored nets did not show differences in leaf thickness or leaf area. Plants maintained under red net had the lowest stomatal density in adaxial epidermis, as the plants cultivated under blue and

red nets exhibited the largest leaf area. The plants maintained under red net showed the smallest stomatal density and the smallest non-glandular and glandular trichomes density in the adaxial epidermis. Such results show that the spectral quality and intensity of light can be modulated during the cultivation of *Ocimum gratissimum* L. plants in order to obtain desirable anatomical characteristics.

Key words: *Ocimum gratissimum*, shading, colored nets, chloroplast, trichomes.

INTRODUÇÃO

A espécie *Ocimum gratissimum* Lineu, conhecida como alfavaca, alfavaca-cravo ou alfavacão, é um subarbusto aromático, originário da Ásia e África e subespontâneo em todo o território brasileiro (LORENZI & MATOS, 2002). Suas folhas são usadas na medicina popular. A bioatividade do óleo essencial encontrado nas folhas dessa espécie tem sido verificada sobre organismos de elevada patogenicidade, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus spp*, *Pseudomonas aeruginosae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Leishmania amazonensis* (UEDA-NAKAMURA et al., 2006; MATASYOH et al., 2007).

A anatomia foliar pode ser grandemente influenciada 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). A intensidade e a qualidade espectral da

^IDepartamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras (UFLA), 37200-000, Lavras, MG, Brasil. E-mail: joefersonreis@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

^{II}UFLA, Lavras, MG, Brasil.

radiação desempenham papel fundamental no desenvolvimento morfológico das plantas, visando uma melhor eficiência do aparato fotossintético na captação e na utilização da energia radiante.

As respostas das plantas às alterações na qualidade da luz são variáveis, por isso, torna-se necessário o conhecimento de quais porções do espectro estão envolvidas nas respostas de cada planta (MCMAHON & KELLY, 1995), principalmente, sobre a anatomia foliar de espécies que apresentam importância medicinal.

No presente estudo, objetivou-se avaliar o efeito da alteração da intensidade e da qualidade espectral da luz, utilizando malhas de transmissão de luz diferenciada, sobre características da anatomia foliar em plantas de *O. gratissimum*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de janeiro a junho de 2006, sob condições de viveiro. A altitude no município de Lavras (21°14'S e 45°00'W GRW), Minas Gerais, é de 918m e, segundo a classificação de Köppen, o clima regional é do tipo Cwa, mas apresenta características de Cwb com duas estações bem definidas, uma fria e seca, de abril a setembro, e outra quente e úmida, de outubro a março (BRASIL, 1992). As mudas de *O. gratissimum* foram produzidas a partir de sementes provenientes de plantas adultas do município de Lavras. A exsiccata foi identificada pelo botânico Eduardo Van Den Berg e está depositada no Herbário ESAL sob o registro número 20.0037.

As sementes foram semeadas em tubetes plásticos contendo substrato Plantmax® e mantidas em viveiro sob 50% de sombreamento durante 60 dias. A pleno sol, foi observada intensidade de $1500\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, correspondendo a 100% da radiação incidente medida por meio de radiômetro LICOR, modelo LI-185, Lincoln, USA. As mudas com aproximadamente 6cm de altura foram transplantadas para recipientes plásticos com capacidades para 6L contendo substrato à base de terra de subsolo e areia, na proporção de 2:1, sem adubação adicional, e mantidas por 120 dias sob os tratamentos com malhas coloridas de 50% de sombreamento nas cores preta, vermelha e azul e a pleno sol. Segundo OREN-SHAMIR et al. (2001), as malhas coloridas diferem nos espectros de transmitância da radiação fotossinteticamente ativa. A malha azul apresenta um pico principal de transmitância na região do azul-verde (400-540nm), enquanto que a malha vermelha possui maior

transmitância para comprimentos de ondas superiores a 590nm. As condições ambientais, o fotoperíodo e a temperatura sob os quais os tratamentos foram submetidos variaram de acordo com as condições climáticas de Lavras-MG no período do experimento. Os tratamentos foram irrigados diariamente, mantendo o solo próximo da capacidade de campo. Em cada tratamento foram empregadas 50 mudas de *O. gratissimum*.

A área foliar total por planta foi medida em cinco plantas por tratamento, utilizando-se um integrador de área foliar (LICOR, modelo LI-3100, Lincoln, USA). Para os estudos anatômicos, foram coletadas cinco folhas do quarto nó abaixo do ápice de plantas distintas, tomadas ao acaso em cada tratamento. As observações foram feitas na região mediana das folhas. Para a microscopia de luz, as folhas foram fixadas em álcool 70% e os cortes foram realizados a mão livre, sendo posteriormente clarificados em solução de hipoclorito de sódio 50%. Os cortes foram corados com solução de azul de astra 0,5% e safranina 0,5% (BUKATSCH, 1972) e dispostos em lâminas semipermanentes, com glicerina a 50%.

As espessuras das epidermes das faces adaxial e abaxial, dos parênquimas paliádico e lacunoso e do limbo foliar foram avaliadas em seções transversais com auxílio de ocular micrometrada. A densidade e a razão do diâmetro polar e equatorial dos estômatos foram determinadas em seções paradérmicas. Para cada tratamento, foram avaliadas cinco folhas, sendo que em cada uma delas foram observados quatro campos na região mediana.

Para avaliar a densidade de tricomas, foi retirado um fragmento com aproximadamente 0,3mm² da região mediana de cinco folhas para cada tratamento. Em cada fragmento, foram escolhidos aleatoriamente 10 campos de observação, totalizando 50 campos por tratamento. Os fragmentos foliares receberam os seguintes tratamentos: foram fixados em solução Karnovsky, lavados em tampão cacodilato, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, desidratados em gradiente progressivo de acetona e pelo ponto crítico (BAL-TEC, modelo CPD-030, *Principality of Liechtenstein*) e metalizados em evaporador de ouro *Sputtering* (BAL-TEC, modelo SCD-050, *Principality of Liechtenstein*) para exame em microscópio eletrônico de varredura (LEO, modelo EVO 40 XVP, Cambrigde-UK).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.3 (FERREIRA, 1999). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A folha de *O. gratissimum* foi caracterizada como dorsiventral e anfihipoestomática, sendo as epidermes adaxial e abaxial uniestratificadas e o parênquima paliçádico constituído por camada única de células, enquanto que o parênquima lacunoso apresentou variações de quatro a seis camadas. As espessuras das epidermes adaxial e abaxial não sofreram alterações entre os tratamentos estudados. Entretanto, em todos os tratamentos, a epiderme da face adaxial apresentou-se mais espessa que a epiderme abaxial (Tabela 1 e Figura 1).

Em todos os tratamentos, o parênquima lacunoso foi mais espesso que o parênquima paliçádico (Tabela 1). Nas plantas crescidas a pleno sol, tanto o parênquima paliçádico quanto o lacunoso apresentaram maior espessura que os parênquimas das plantas cultivadas sob malhas coloridas, resultando em maior espessura do limbo foliar. Em *O. selloi*, COSTA et al. (2007) também observaram maior espessura do limbo foliar nas plantas mantidas a pleno sol quando comparadas com aquelas submetidas a malhas coloridas.

A redução na espessura das folhas de plantas sombreadas deve-se, possivelmente, à diferença na distribuição e no consumo de fotoassimilados para expansão foliar, especialmente sob as malhas vermelha e azul, em que as plantas apresentaram folhas com maior área (Tabela 1). De acordo com TAIZ & ZEIGER (2004), esta é uma estratégia adaptativa que pode proporcionar melhor captura de luz e permitir maior eficiência fotossintética para maiores ganhos de carbono devido à maior área foliar para captação da energia luminosa.

Verificou-se a presença de tricomas tectores pluricelulares e tricomas glandulares captados e peltados na face adaxial e abaxial (Figura 1 e Figura 2). No entanto, a análise quantitativa dessas estruturas na superfície abaxial tornou-se impossível devido à

elevada quantidade de tricomas tectores. Na face adaxial, as plantas crescidas a pleno sol apresentaram as maiores quantidades de tricomas tectores e glandulares (Figura 3). Resultado semelhante foi encontrado em *O. selloi*, com maior número de tricomas glandulares nas duas faces foliares das plantas cultivadas a pleno sol (COSTA et al., 2007). De acordo com LARCHER (2004), a densa cobertura de tricomas sobre a superfície da folha age como um filtro capaz de modificar a radiação direta em luz difusa e aumentar a reflexão da mesma, minimizando assim o efeito da radiação intensa nos tecidos fotossintetizantes. Segundo WERKER (2000), os tricomas tectores densamente distribuídos em folhas podem servir como uma barreira mecânica contra temperaturas extremas, alta intensidade luminosa, perda excessiva de água, entre outros fatores.

As variações observadas na densidade de tricomas em decorrência do sombreamento com malhas coloridas evidenciam que a qualidade espectral da luz influencia a formação de tricomas, reduzindo o número dessas estruturas no ambiente com maior predominância de radiação vermelha. Como consequência, a produção de óleo essencial pode ser afetada, uma vez que este é preferencialmente produzido e armazenado nos tricomas glandulares peltados (GANG et al., 2001).

Nas secções paradérmicas, verificou-se a presença de estômatos anomocíticos posicionados ao nível das demais células epidérmicas. A maior densidade estomática na face abaxial das folhas de todos os tratamentos estudados revela que *O. gratissimum* é uma espécie de folha anfihipoestomática (Tabela 2). Na face adaxial das folhas das plantas submetidas a pleno sol, foi verificada maior densidade estomática. A radiação espectral transmitida pela malha vermelha resultou em menor densidade estomática na face adaxial, enquanto que na face abaxial as maiores densidades estomáticas foram verificadas nos tratamentos sob

Tabela 1 - Espessura do limbo e tecidos foliares de *O. gratissimum* L. após cultivo sob malhas coloridas. LF= limbo foliar; EpAd= epiderme da face adaxial; PP= parênquima paliçádico; PL= parênquima lacunoso; EpAb= epiderme da face abaxial; AF= área foliar por planta.

Tratamentos	LF	EpAd	PP	PL	EpAb	AF (cm ²)
	-----Espessura (µm) -----					
Pleno sol	233,28 a	24,84 a	71,55 a	120,81 a	16,08 a	152,18 b
Malha Preta	159,93 b	21,15 a	51,30 b	73,65 b	13,83 a	172,87ab
Malha Vermelha	164,67 b	22,65 a	54,96 b	73,05 b	14,01 a	220,20 a
Malha Azul	161,79 b	21,45 a	54,00 b	72,15 b	14,19 a	235,46 a
CV (%)	5,74	12,29	8,82	6,94	10,82	18,92

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a P=0,05.

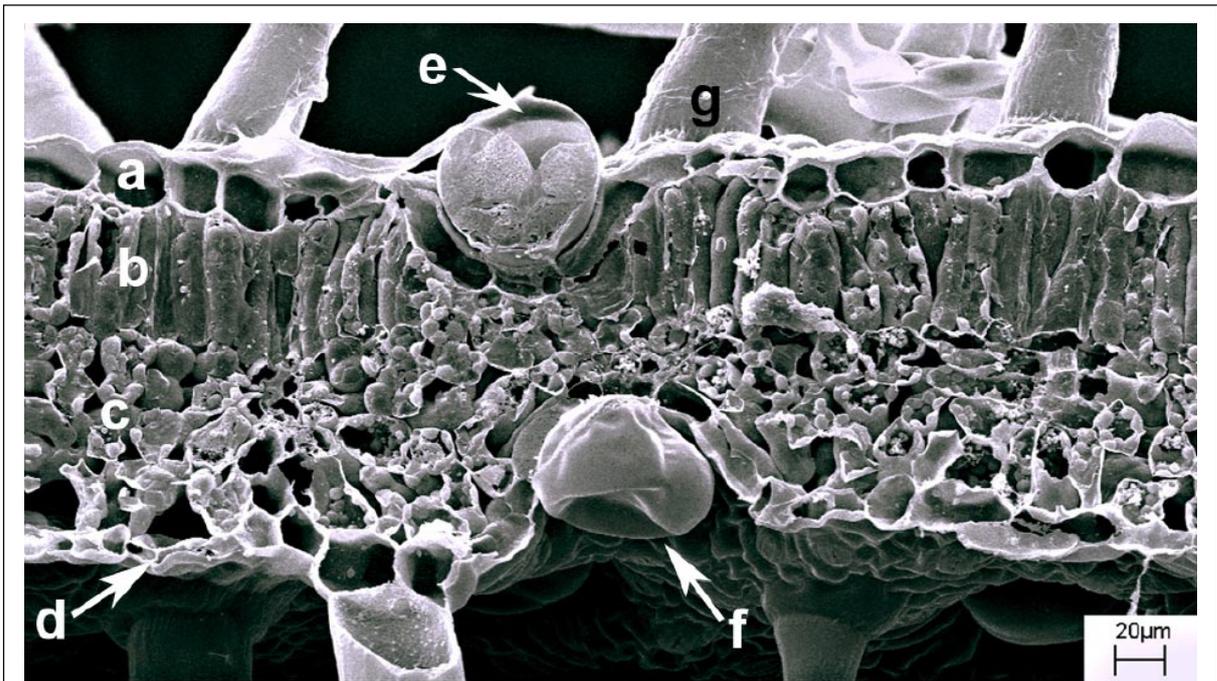


Figura 1 - Eletromicrografia de varredura: seção transversal de lâmina foliar de *O. gratissimum*, cultivada sob malha vermelha, sendo que a= epiderme adaxial; b= parênquima paliçádico; c= parênquima lacunoso; d= epiderme abaxial; e= seção de tricoma glandular peltado e espaço subcuticular; f= tricoma glandular peltado intacto; g= tricoma tector pluricelular.

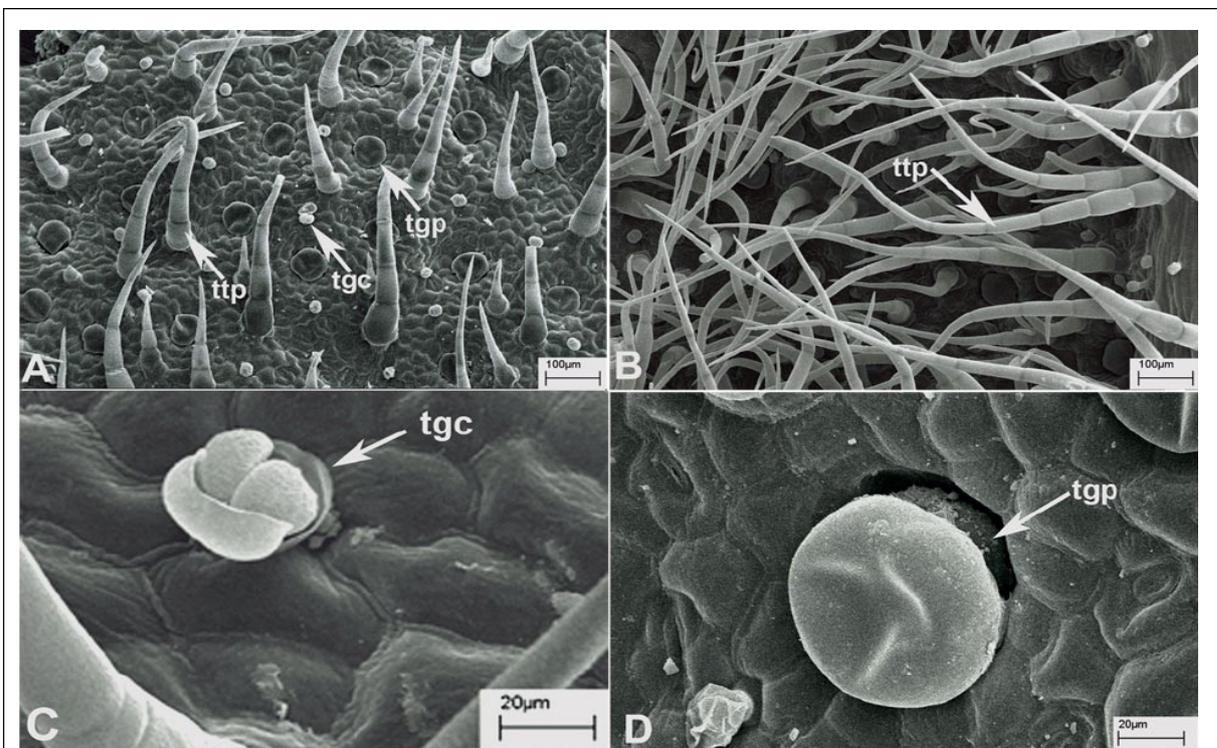
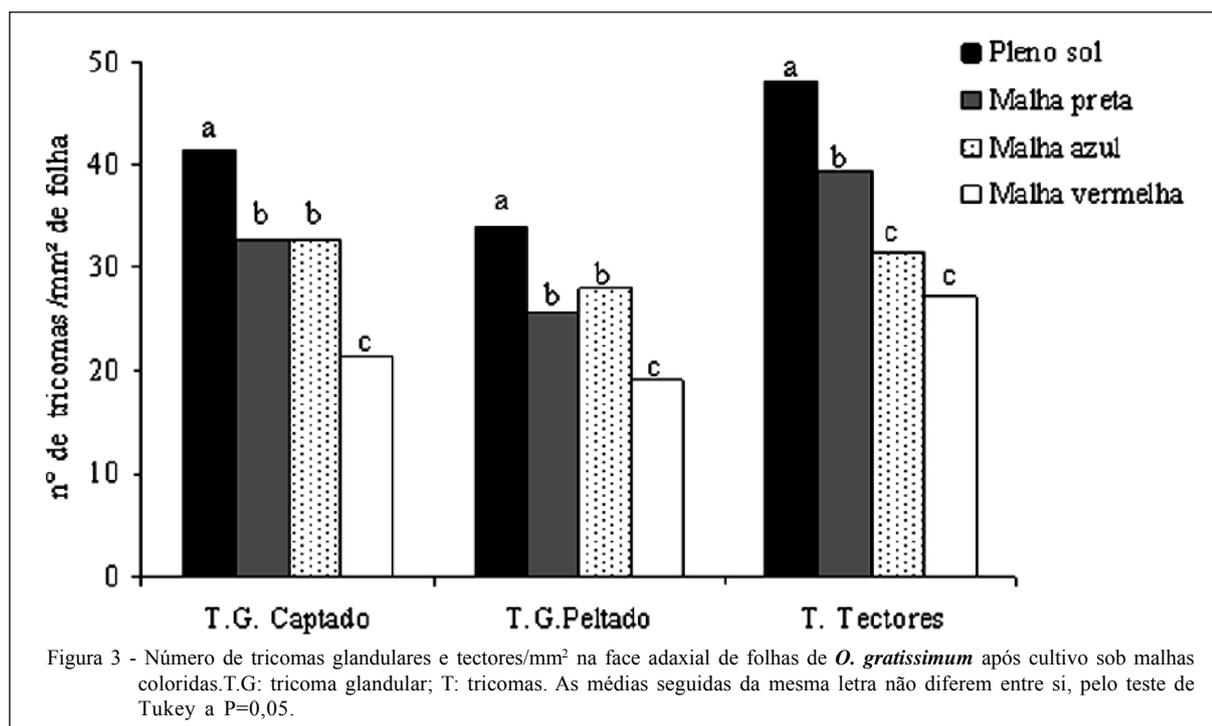


Figura 2 - Eletromicrografias de varredura de superfícies foliares de *O. gratissimum* cultivado a pleno sol, sendo que tgc= tricoma glandular captado, ttp= tricoma tector pluricelular, e tgp= tricoma glandular peltado. A= face adaxial, barra= 100µm; B= face abaxial, barra = 100µm; C= face adaxial, barra= 20µm e D= face adaxial, barra= Barra = 20µm.



malhas vermelha e preta. Contrariamente, em *O. selloi* não houve diferenças significativas quanto ao número de estômatos na face adaxial das folhas de plantas cultivadas sob malha vermelha e a pleno sol e a face abaxial das plantas submetidas a pleno sol exibiu a maior densidade estomática (COSTA et al., 2007).

As variações das densidades estomáticas na face adaxial e abaxial revelam a plasticidade anatômica de *O. gratissimum* em função do ambiente de cultivo. O aumento da densidade estomática está geralmente relacionado com uma maior condutância estomática (JUSTO et al., 2005), evitando que a

fotossíntese seja limitada sob condições adversas (LIMA JR. et al., 2006).

As plantas submetidas ao sombreamento com malha azul tiveram maior relação diâmetro polar/equatorial na face adaxial que as plantas cultivadas a pleno sol e sob malha preta. Diversos autores têm demonstrado estreita relação entre a luz azul e as respostas estomáticas (FRECHILLA et al., 2000; PARKS et al., 2001). De acordo com KHAN et al. (2002), quanto maior a relação diâmetro polar/equatorial, mais elipsóide é o estômato, podendo resultar em maior funcionalidade.

Tabela 2 - Densidade e razão dos diâmetros polar/equatorial de estômatos das faces adaxial e abaxial de folhas de *O. gratissimum* após cultivo sob malhas coloridas.

Tratamentos	-----Estômatos-----			-----Diâmetro Polar/Equatorial-----	
	-----Densidade (estômatos mm ²)-----			Adaxial	Abaxial
	Adaxial	Abaxial	Adaxial/Abaxial		
Pleno sol	102,12 a	242,72 b	0,34 c	1,66 b	1,50 b
Malha preta	62,90 c	298,96 a	0,25 b	1,67 b	1,93 a
Malha vermelha	40,70 d	285,64 a	0,14 a	1,77 ab	1,82 a
Malha azul	80,66 b	220,52 b	0,36 c	1,84 a	2,07 a
CV(%)	20,45	15,91	24,64	15,15	18,78

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a P=0,05.

CONCLUSÃO

As modulações na qualidade espectral da radiação podem proporcionar profundas alterações na anatomia foliar de *Ocimum gratissimum*, destacando-se o cultivo a pleno sol, o qual proporcionou maior espessura foliar e maior densidade de tricomas glandulares, produtores de óleo essencial. Entre os tratamentos sombreados, não houve diferença quanto à espessura foliar, porém, as plantas cultivadas sob malha vermelha apresentaram a menor densidade de tricomas glandulares. A quantidade e a qualidade da radiação solar podem ser moduladas a fim de se obterem características anatômicas desejáveis diretamente associadas à produção de óleo essencial em alfavaca-cravo, influenciando seu potencial medicinal e valor comercial.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Normais climatológicas de 1961- 1990**. Brasília, 1992. 84p.
- BUKATSCH, F. Benerkrugen zur doppelfarbung astrablausafranina. **Microkosmos**, v.61, p.255, 1972.
- COSTA, L.C.B. et al. Aspectos da anatomia foliar de *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae) em diferentes condições de qualidade de luz. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p.6-8, 2007.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR 4. 3** - Sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 1999. (Software estatístico).
- FRECHILLA, S. et al. Reversal of blue light-stimulated stomatal opening by green light. **Plant Cell Physiology**, v.41, n.2, p.171-176, 2000.
- GANG, D.R. et al. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. **Plant Physiology**, v.125, n.2, p.539-555, 2001.
- HANBA, Y.T. et al. The effects of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. **Plant Cell and Environment**, v.25, n.8, p.1021-1030, 2002.
- JUSTO, C.F. et al. Leaf anatomical plasticity of *Xylopia brasiliensis* Sprengel (Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.19, n.1, p.111-123, 2005.
- KHAN, P.S.S.V. et al. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, n.2, p.141-146, 2002.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMA Artes e Textos, 2004. 531p.
- LIMA JR., E.C. et al. Aspectos fisioanatômicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, v.30, n.1, p.33-41, 2006.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 512p.
- MATASYOH, L.G. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.6, p.760-765, 2007.
- MCMAHON, M.J.; KELLY, J.W. Anatomy and pigments of chrysanthemum leaves developed under spectrally selective filters. **Scientia Horticulturae**, v.64, p.203-209, 1995.
- OREN-SHAMIR, M. et al. Colored shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.76, n.3, p.353-361, 2001.
- PARKS, B.M. et al. Photocontrol of stem growth. **Current Opinion Plant Biology**, v.4, n.5, p.436-440, 2001.
- SCHLUTER, U. et al. Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.383, p.867-874, 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
- UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v.55, n.2, p.99-105, 2006.
- WERKER, E. Trichome diversity and development. In: HALLAHAN, D.L.; GRAY, J.C. **Plant Trichomes**. London: Academic, 2000. p.1-30.