



GABRIELLEN DE MARIA GOMES DIAS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E
CITOMÉTRICA DE GENÓTIPOS E RESPOSTA
DE SILÍCIO NO CULTIVO *IN VITRO* DE
ANTÚRIO**

LAVRAS - MG

2013

GABRIELEN DE MARIA GOMES DIAS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CITOMÉTRICA DE
GENÓTIPOS E RESPOSTA DE SILÍCIO NO CULTIVO *IN VITRO* DE
ANTÚRIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Dias, Gabrielen de Maria Gomes.

Caracterização morfológica e citométrica de genótipos e resposta de silício no cultivo *in vitro* de antúrio / Gabrielen de Maria Gomes Dias. – Lavras: UFLA, 2013.

117 p.: il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. *Anthurium* spp. 2. Araceae. 3. Silicatos. 4. Cultura de tecidos.
5. Micropropagação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.53

GABRIELEN DE MARIA GOMES DIAS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CITOMETRICA DE
GENÓTIPOS E RESPOSTA DE SILÍCIO NO CULTIVO *IN VITRO* DE
ANTÚRIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 20 de agosto de 2013.

Dr. Adriano Bortolotti da Silva	UNIFENAS
Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. Evaristo Moura de Castro	UFLA
Dra. Leila Aparecida Salles Pio	PNPD/CAPES/Embrapa

Dr. Moacir Pasqual
Orientador

Dra. Joyce Dória Rodrigues Soares
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2013**

*Aos meus queridos pais, **Dias e Gaby**;*

*Aos meus irmãos, **João Paulo, Adolfo e Giorgina**;*

*Aos meus avós, **Rufino e Conceição**;*

*Ao meu afilhado, **Caio**,*

por tanto amor, dedicação, confiança, incentivo e apoio,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida, iluminado e abençoando o meu caminho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Embrapa Agroindústria Tropical, pelo material vegetal cedido e, em especial, à pesquisadora Ana Cecília Ribeiro Castro, pelo apoio e contribuição.

Ao meu orientador, Moacir Pasqual, meu profundo agradecimento pela liberdade no desenvolvimento da minha tese. Muito obrigada pelos ensinamentos, paciência, confiança e carinho.

Aos pesquisadores Joyce Dória Rodrigues e Filipe Almendagna Rodrigues e à doutoranda Renata Lara Alves Silva, pela constante presença, incentivo, colaboração e ensinamentos transmitidos. Vocês já fazem parte da minha história.

Aos membros da banca examinadora, Adriano Bortolotti, Eduardo Alves, Evaristo Castro e Leila Salles Pio, que gentilmente aceitaram o convite para a avaliação deste trabalho.

Aos laboratoristas Vantuil e Claret, pelos ensinamentos, dedicação, prestatividade e por todos os momentos de descontração no laboratório.

À Marli, secretária da pós-graduação em Fitotecnia, pela atenção, apoio e amizade.

A todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, pelos bons momentos compartilhados no laboratório e na salinha do Necult. Em especial, a Joyce, Filipe, Renata, Suelen, Adalvan, João, Héliida, Mirielle,

Luciana, Camila, Flávia e Raíssa, com os quais tive constante compartilhamento de críticas e risadas, histórias, aprendizado, desenvolvimento de experimento, desabafos, alegrias, tristezas. Enfim, obrigada a todos.

Ao Ivan Júnior Ascari, pelo carinho, apoio, paciência e ajuda na elaboração dos dados e formatação da tese.

Ao Adriano Carvalho, que não mediu esforços em auxiliar nas análises estatísticas.

Às amigas queridas Mirella (Mi), Suelen (Su), Luciana (Lu) e Elisângela (Elis) que ocupam lugar especial em meu coração. Obrigada pela constante presença, ensinamentos e risadas. Vocês são muito importantes em minha vida.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia, em especial à laboratorista Eloísa (Elô), pela ajuda e disponibilidade durante a realização das análises de microscopia.

Ao Laboratório de Produtos Vegetais do Departamento de Ciência dos Alimentos, especialmente à laboratorista Constantina (Tina), pela ajuda e auxílio prestados.

Ao Laboratório de Nutrição Mineral de Ciências dos Solos, em especial ao laboratorista Adalberto e à doutoranda Viviane, pela ajuda e contribuição das análises.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia, em especial ao doutorando Luis Rodrigues, pela prontidão e apoio nas análises realizadas.

A todos, em especial aqueles que não foram citados e que de alguma forma estiveram presentes, que me ajudaram a crescer, como profissional e como pessoa, com a mais simples palavra, atitude ou auxílio, pois todos, independentemente de forma, contribuíram, direta ou indiretamente, nestes três anos de doutorado. **Muito Obrigada!**

“Nunca se vence uma guerra lutando sozinho.”

Raul Seixas

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo caracterizar 12 genótipos de *Anthurium*, por anatomia e citometria, e avaliar fontes e concentrações de silício na micropropagação de *Anthurium adraeanum* cv. Rubi, por meio de análises fitotécnicas, morfofisiológicas, ultraestruturais e anatômicas. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições (3 folhas/espécie). As análises de citometria de fluxo permitiram a diferenciação entre as espécies *A. andraeanum*, *A. affine*, *A. bomplandii*, *A. gracile* e o híbrido (*A. lidimanianum* x *A. guianensis*), bem como aproximou o grupo *A. raimundii*, *plowmanii* e *jemanii* do *A. sp.* IFT 258, em todas as análises. As espécies de *Anthurium* mostraram-se pouco distintas quanto à anatomia da folha, diferenciando apenas algumas espécies, *A. bomplandii* e o híbrido (*A. lidimanianum* x *A. guianensis*). A análise de agrupamento possibilitou a aproximação das espécies *A. raimundii* e *A. affine*, *A. bomplandii* e *A. gracile*, *A. jemani* e *A. plowmanii*, e as cultivares Astral e Rubi (*A. adraeanum*), e isolou o híbrido (*A. lidimanianum* x *A. guianensis*). Devido à anormalidade das plântulas nas fontes de silicato de cálcio e potássio, foram utilizados apenas dados obtidos pela fonte de silicato de sódio. O uso de silício no meio de cultura proporcionou maior teor de clorofila. Como também, maior crescimento em (número de folhas, massa seca da parte aérea e comprimento da parte aérea) na presença de silicato de sódio. Na anatomia, a densidade estomática, o meio com 1,0 mg L⁻¹ de silicato de sódio, foi o que apresentou maior número de estômatos. As concentrações de silicato de sódio demonstraram diferenças significativas para a taxa fotossintética, taxa transpiratória e condutância estomática. Já para concentração interna de CO₂ e razão entre concentrações interna e externa de CO₂, não houve diferença. A fonte de silício e a concentração têm que ser consideradas para evitar anomalias nas plântulas *in vitro*. O uso de silicato promoveu o aumento de massa seca em antúrio. Maior teor de clorofila foi obtido quando as plântulas de antúrio foram cultivadas em meio suplementado com silicato de sódio. O uso de silicato de sódio no meio de cultura proporcionou melhor qualidade de plântulas de antúrio cv. Rubi. A disponibilidade de silício no meio de cultura foi proporcional à sua absorção pelas plântulas de antúrio. A adição de silicato de sódio resultou no aumento da deposição de cera epicuticular e na formação de estruturas de depósito de reserva de cálcio em plântulas de antúrio. Em condições *in vitro*, a adição de silicato de sódio ao meio de cultura afetou o aparato fotossintético. Antúrio cv. Rubi tem características anatômicas e fisiológicas que contribuem para a sobrevivência em ambiente *ex vitro*.

Palavras-chave: Cultura de tecidos. Silicato. Araceae.

ABSTRACT

This study aimed to characterize 12 genotypes *Anthurium*, for anatomy and flow cytometry, and evaluate sources and concentrations of silicon in the micropropagation of *Anthurium adraeanum* cv. Rubi, through analysis phytotechnical, morphophysiological, ultrastructural and anatomical. The experiments were conducted in a completely randomized design with three replications (3 sheets / species). The flow cytometric analysis allowed the differentiation between the species *A. andraeanum*, *A. affine*, *A. bomplandii*, *A. gracile* and hybrid (*A. guianensis* x *A. lidimanianum*) and approached group *A. raimundii*, *plowmanii* and *jemanii*, *A. sp.* IFT 258 in all analyzes. The species of anthurium proved to be somewhat different as to the anatomy of the sheet, differing only some species *A. bomplandii* and hybrid (*A. guianensis* x *A. lidimanianum*). Cluster analysis allowed the approximation of species *A. raimundii* and *A. affine*, *A. bomplandii* and *A. gracile*, *A. jemani* and *A. plowmanii* and cultivars Astral and Rubi (*A. adraeanum*), and isolated hybrid (*A. guianensis* x *A. lidimanianum*). Due to the abnormality in the seedling sources of calcium and potassium silicate, only data obtained were the source of sodium silicate. The use of silicon in the culture medium showed higher chlorophyll content. Have higher growth (number of leaves, dry weight of shoots and shoot length) in the presence of sodium silicate. In anatomy, stomatal density, the medium with 1.0 mg L⁻¹ sodium silicate, showed the greatest number of stomata. The concentrations of sodium silicate showed significant differences for photosynthetic rate, transpiration rate, stomatal conductance, as to internal CO₂ concentration and ratio between internal and external concentrations of CO₂, there was no difference. The source and the concentration of silicon must be considered to avoid defects to the seedlings *in vitro*. The use of silicate promoted an increase in dry mass anthurium. Higher chlorophyll content was obtained when the seedlings are grown anthurium in medium supplemented with sodium silicate. The use of sodium silicate in the culture medium yielded better quality of anthurium seedlings cv. Rubi. The availability of silicon in the culture medium is proportional to its absorption by anthurium seedlings cv. Rubi. The addition of sodium silicate resulted in increased epicuticular wax deposition and formation of structures reservation deposit of calcium anthurium seedlings. Under *in vitro* conditions, the addition of sodium silicate to the culture medium affect the photosynthetic apparatus. Anthurium cv. Rubi has anatomical and physiological characteristics that contribute to the survival *ex vitro*.

Keywords: Tissue culture. Silicate. Araceae.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral.....	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Importância da floricultura	13
2.2	Família Araceae	14
2.3	<i>Anthurium</i> sp.	15
2.4	Toxicidade e cristais de oxalato de cálcio	15
2.5	Micropropagação de antúrio	16
2.6	Silício	18
2.6.1	Silício em plantas ornamentais	20
2.7	Anatomia foliar	22
2.8	Microscopia eletrônica	22
2.9	Microanálise de raios X	23
2.10	Citometria de fluxo	24
	REFERÊNCIAS	27
	CAPÍTULO 2 Citometria de fluxo e estudos anatômicos em genótipos de <i>Anthurium</i>	38
1	INTRODUÇÃO	41
2	MATERIAL E MÉTODOS	43
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65
	CAPÍTULO 3 Silício no crescimento <i>in vitro</i> de antúrio cv. Rubi ..	69
1	INTRODUÇÃO	71
2	MATERIAL E MÉTODOS	73
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	87
	CAPÍTULO 4 Fotossíntese e anatomia foliar de plântulas de antúrio <i>in vitro</i> , cultivadas com diferentes concentrações de silício.....	92
1	INTRODUÇÃO	95
2	MATERIAL E MÉTODOS	97
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
4	CONCLUSÕES	112
	REFERÊNCIAS	113

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o interesse pela floricultura e pelas plantas ornamentais evidenciou-se há alguns anos, quando as plantas começaram a ser apreciadas para a ornamentação, ocupando lugar de destaque no cotidiano brasileiro (LANDGRAF; PAIVA, 2009).

Com cerca de 1.100 espécies, *Anthurium* é o gênero mais representativo da família Araceae. Sua área de distribuição ocorre do México a Argentina e nas Ilhas do Caribe (COELHO; WAECHTER; MAYO, 2009; MAYO; BOGNER; BOYCE, 1997). São produzidos sob estufas, na Holanda e aproximadamente 90% deles são comercializados na Europa. No Brasil, a produção de antúrio concentra-se em regiões subtropicais, como na região sudeste (Vale do Ribeira e nas cidades de Holambra e Atibaia, no estado de São Paulo) e tropicais (região nordeste). Nos mercados interno e externo, a inflorescência de antúrio atinge o maior preço unitário quando comparada com a de outras flores tropicais (CABRAL, 2004; CUQUEL; GROSSI, 2004; TERAQ; CARVALHO; BARROSO, 2005).

Atualmente, a maioria das variedades de antúrio disponíveis para comercialização como plantas de vaso, no mercado internacional, é produzida por cultura de tecidos (MAIRA; ALEXANDER; VARGAS, 2010). O uso dessa técnica tem sido sugerido como alternativa para o aumento da produção de antúrio (JAHAN et al., 2009).

Durante os últimos anos, a micropropagação de *Anthurium* evoluiu, de um processo puramente científico, para uma ferramenta aplicada

comercialmente. Apesar do alto grau de aplicação prático atingido, existem considerações importantes a serem feitas quanto à eficiência das técnicas de micropropagação. Existe, ainda, uma quantidade significativa de genótipos nos quais não se obteve sucesso na indução de regeneração e, em alguns materiais, o desenvolvimento *in vitro* é muito lento e inconsistente para que possa ser utilizado na propagação em larga escala (CASTRO et al., 2012).

Tendo em vista a carência de estudos comparativos em diferentes espécies de antúrio, trabalhos nesta área são de extrema relevância, visando à distinção destas espécies e contribuindo para as pesquisas futuras.

Para uma maior eficiência na técnica de micropropagação de antúrio, a adição de silício ao meio de cultivo poderá auxiliar na obtenção de mudas mais vigorosas. Seu uso contribui para a qualidade final do vegetal, pois seu acúmulo na cutícula das folhas permite proteção às plantas, aumento da capacidade fotossintética, redução de perda de água e, ainda, promove maior crescimento, características estas desejáveis no processo de aclimatização de plantas micropropagadas. Isso porque, ao serem transferidas para o ambiente *ex vitro*, elas podem morrer, devido à perda d'água e à baixa funcionalidade dos estômatos.

O trabalho foi realizado com os objetivos de caracterizar diferentes genótipos de *anthurium* e avaliar o crescimento de antúrios em função de diferentes fontes e concentrações de silício na micropropagação, por meio de análises fitotécnicas, fisiológicas, ultraestruturais, microscópicas e anatômicas, visando melhorar a qualidade final das mudas produzidas *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da floricultura

A floricultura empresarial brasileira tem adquirido notável desenvolvimento e, nos últimos anos, vem se caracterizando como um dos mais promissores segmentos da horticultura intensiva, no agronegócio nacional (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008). Levando-se em conta a elevada mão de obra por área, quando comparada à agricultura extensiva, a floricultura contribui para a fixação da força de trabalho no campo, além de ser importante alternativa para pequenos produtores (ANEFALOS; TOMBOLATO; RICORDI, 2010).

Em 2012, os resultados das exportações brasileiras de flores e plantas ornamentais confirmaram o ciclo de retração recentemente experimentado pela floricultura nacional, decaindo 7,76% em relação ao total vendido ao exterior em 2011 e exibindo fechamento no valor global de US\$ 26,01 milhões. Tal fato continua refletindo o contexto econômico-financeiro recessivo prevalecente nos principais mercados importadores mundiais, o qual – deflagrado a partir do último trimestre de 2008, com a crise imobiliária dos EUA – permanece determinando reduções globais na demanda pelos produtos da floricultura (JUNQUEIRA; PEETZ, 2013).

O Brasil apresenta potencial para tornar-se grande produtor de flores e plantas ornamentais, destacando-se as espécies tropicais, devido à grande diversidade genética e ao clima propício para sua produção. A floricultura tropical, classificada como um negócio lucrativo, vem se expandindo e sendo considerada uma alternativa viável para pequenas áreas rurais (JUNQUEIRA; PEETZ, 2011).

Dentre as espécies tropicais, destaca-se o antúrio (Araceae), que tem apresentado boa aceitação, tanto no mercado interno como no externo.

Contribuem para isso não apenas a beleza natural, a coloração e o exotismo de suas flores, mas também sua elevada durabilidade e resistência ao manuseio pós-colheita, além da grande altura de hastes e suas linhas volumétricas e espaciais modernas que se harmonizam perfeitamente com o despojado *design* da arquitetura de interiores contemporânea (JUNQUEIRA; PEETZ, 2012). Dessa forma, existem perspectivas favoráveis para elevar a sua produção, comercialização e consumo, em ambos os mercados (ANEFALOS; TOMBOLATO; RICORDI, 2010).

2.2 Família Araceae

A família Araceae é um grande grupo de plantas herbáceas monocotiledôneas, compreendendo 110 gêneros e aproximadamente 4.000 espécies (VIÉGAS et al., 2006), dividindo-se em sete subfamílias: Gymnostachydoideae, Orontioideae, Pothoideae, Monsteroideae, Calloideae, Lasioideae e Aroideae. Tem ampla distribuição e é predominantemente tropical; apenas cerca de 10% dos gêneros estendem-se às zonas temperadas do norte. No Brasil, ela é representada por 30 gêneros, entre os quais está o gênero *Anthurium*, com mais de 1.100 espécies neotropicais (COELHO; WAECHTER, 2004), com vários genótipos novos para a ciência. Estes últimos autores citam, também, que este número é subestimado, pela dificuldade taxonômica de muitas espécies da secção *Urospadix*, um grupo complexo com espécies difíceis de serem distinguidas.

2.3 *Anthurium* sp.

O antúrio (*Anthurium* sp.) é uma importante espécie tropical, pertencente à família Araceae, originária das Américas do Sul e Central (COELHO; CATHARINO, 2005).

Anthurium Schott é o maior e o mais complexo gênero das aráceas, exclusivamente tropical e abundante em áreas florestais da América do Sul e da América Central. Pertence à subfamília Pothoidea, tribo Potheae e tem cerca de 1.100 espécies (COELHO; WAECHTER, 2004), das quais aproximadamente 105 ocorrem no Brasil (COELHO; CATHARINO, 2008). A diversidade dos antúrios é bem conhecida na América Central, na Venezuela, na Guiana, no Paraguai e na Bacia Amazônica, entretanto, pouco conhecida em áreas como o leste do Brasil, a região andina e o oeste da América do Sul (TEMPONI, 2006).

Pela beleza e imponência de suas folhagens, sua inflorescência pouco vistosa acaba sendo mascarada no habitat, contribuindo para que a escassez de dados nas coleções botânicas (VALADARES; MARTINS; COELHO, 2010).

2.4 Toxicidade e cristais de oxalato de cálcio

Apesar de a toxicidade ser uma das principais características da família Araceae, os constituintes químicos responsáveis pelos efeitos tóxicos ainda são, em sua maior parte, desconhecidos. Inicialmente, alguns autores atribuíram os mecanismos tóxicos à ação das ráfides de oxalato de cálcio (SANTOS, 2011). Hoje, já se sabe que esta substância participa do mecanismo tóxico, provocando uma lesão e expondo o organismo do indivíduo à substância tóxica.

Os efeitos ocasionados pela intoxicação por espécies da família Araceae, decorrentes do contato com a mucosa bucal, incluem queimação e dor na cavidade oral, acarretando o desenvolvimento de edema de lábios e língua, com

excessiva salivação. Em alguns casos, pode ocorrer dificuldade de respiração e da fala, podendo evoluir para um edema de glote e provocar a morte da vítima, por asfixia. Além disso, o contato com os olhos pode provocar dor intensa, lacrimejamento, inflamação da pálpebra, contração súbita do músculo ocular e posterior fotofobia (SANTOS, 2011).

Ráfides e drusas de oxalato de cálcio são abundantes na maioria dos tecidos e órgãos (ZUÑIGA et al., 2003). Os depósitos intracelulares, geralmente, estão nos vacúolos de células especializadas na formação do cristal chamadas de idioblastos (FRANCESCHI; NAKATA, 2005).

A formação dos cristais de CaC_2O_4 tem sido atribuída a necessidades funcionais diversas. Gourlay e Grime (1994) sugerem que os CaC_2O_4 são consequência da desintoxicação do ambiente radicular em alta concentração de Ca, danosa à célula, como nos solos calcários. Já em muitos ecossistemas naturais e perturbados, acidificação do solo, elevada precipitação, quantidade limitante de minerais essenciais e lixiviação de cátions podem levar à formação de CaC_2O_4 no tecido vegetal, como forma de estocar minerais para garantir o crescimento normal das plantas (CUMMING et al., 2001; ENTRY; ROSE; CROMACK, 1992).

2.5 Micropropagação de antúrio

A micropropagação vem sendo empregada comercialmente para a rápida propagação clonal e alta produção de mudas de novas variedades de antúrios (MARTIN et al., 2003), principalmente porque muitas dessas variedades são híbridas e a clonagem *in vitro* tem permitido a uniformização de características, tais como época de floração, coloração, tamanho e forma das flores (FUZITANI; NOMURA, 2004). Além disso, pelo método tradicional de propagação, é

reduzido o número de plantas que pode ser obtido anualmente (TOMBOLATO et al., 2004).

A maioria dos trabalhos de pesquisa com cultura de tecidos de antúrio tem sido desenvolvida na Holanda, na Alemanha e nos Estados Unidos (LIGHTBOURN; PRASAD, 1990), tendo o primeiro sido relatado por Pierik, Steegmans e Van Der Meys (1974) e, no Brasil, o primeiro registro é o de Castro et al. (1982). Embora, atualmente, existam outros grupos conduzindo ensaios nesta área, a técnica mais empregada ainda é a desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), isto é, a produção de mudas micropropagadas via organogênese indireta (TOMBOLATO et al., 2004).

Na micropropagação comercial, as mudas são obtidas por organogênese indireta, isto é, a partir da indução de calos, utilizando-se como explante inicial, na maioria das vezes, folhas, com posterior regeneração de gemas adventícias (ATAK; ÇELIK, 2009). Outras fontes de explantes têm sido utilizadas, tais como pecíolo, espádice, espata, brotações, gemas axilares e sementes, embora os melhores resultados tenham sido registrados em explantes foliares. Entretanto, esse método proporciona taxas de multiplicação relativamente baixas e inconsistentes, podendo ocorrer variação somaclonal nas mudas obtidas (BAUTISTA et al., 2008).

Carvalho et al. (2012) relatam que existem, na literatura, vários protocolos para a micropropagação de antúrio; entretanto, é importante ressaltar que, geralmente, são necessários alguns ajustes para a obtenção de resultados satisfatórios.

Segundo Puchooa (2005), de forma geral, os pesquisadores que trabalham com a cultura de tecidos têm constatado uma grande variação nas respostas obtidas *in vitro* em relação a diferentes genótipos estudados de antúrio. Conseqüentemente, ajustes ao meio de cultura resultam em pequenos efeitos compensadores, quando comparados à baixa capacidade de regeneração.

2.6 Silício

O silício (Si) é considerado um elemento agronomicamente benéfico para muitas monocotiledôneas, tais como arroz, cana-de-açúcar e cereais de inverno. Plantas que crescem em ambiente rico em silício diferem daquelas presentes em condições de deficiência, principalmente quanto à composição química, à resistência mecânica das células, às características da superfície foliar e à tolerância a vários tipos de estresses abióticos e ao ataque de pragas e patógenos (RODRIGUES, 2010).

O Si é um elemento benéfico para o crescimento da planta. Diversos benefícios do Si têm sido relatados, tais como melhora da resistência a pragas e a patógenos e à seca, e tolerância a metais pesados e melhoria da qualidade das culturas agrícolas e produtividade, em uma grande variedade de espécies de plantas (FAUTEUX et al., 2005; MA; YAMAJI, 2006, 2008; LIANG et al., 2007; RICHMOND; SUSSMAN, 2003). Tem sido demonstrado que o Si está relacionado ao aumento de clorofila e à melhoria no metabolismo da planta, e ao aumento na tolerância das plantas a estresses ambientais, como frio, calor e seca, reduzindo o desequilíbrio de nutrientes e a toxicidade dos metais na planta, reforçando as paredes celulares de plantas e aumentando a resistência a patógenos e a pragas (EPSTEIN, 2001).

As plantas das famílias Poaceae, Ciperaceae e Equisetaceae demonstram alto acúmulo de Si (>4% Si); Brassicaceae, Urticaceae e Commelinaceae demonstram acúmulo de Si intermediário (2-4% Si), enquanto a maioria das espécies demonstra acúmulo abaixo de 2% (HODSON et al., 2005; MA; MIYAKEY; TAKAHASHI, 2002). Segundo Mitani e Ma (2005), plantas consideradas não acumuladoras, como tomate, por exemplo, têm menor densidade de transportadores de Si do apoplasto para o simplasto e um defeito

nos transportadores de Si das células do córtex para o xilema, comparadas às plantas acumuladoras.

Fatores de estresse, tanto bióticos quanto abióticos, induzem distúrbios fisiológicos que conduzem à perda do rendimento e, em caso das plantas ornamentais, à perda de valor decorativo (DEBICZ; WRÓBLEWSKA, 2011). Embora o silício não seja um elemento essencial para o crescimento e o desenvolvimento de plantas superiores, de acordo com Epstein (1999), sob condições de estresse, o tratamento com silício pode causar notável diferença no seu desempenho. No caso de plantas ornamentais, este elemento é também aplicado na forma de silicatos, como, por exemplo, silicato de sódio e silicato de potássio como adubos líquidos ou aplicações foliares, e pode também ser adicionado ao meio na forma de cinza de casca de arroz (FRANTZ et al., 2005; KAMENIDOU; CAVINS; MAREK, 2008, 2010).

Por não ser considerado um elemento essencial às plantas, o Si não tem sido muito estudado na micropropagação. Contudo, do ponto de vista fisiológico, esse elemento tem demonstrado efeito benéfico sobre o aumento de produção de diversas culturas, segundo Gomes et al. (2008). Para estes mesmos autores, acredita-se que o Si possa interferir na arquitetura das plantas, ao proporcionar folhas mais eretas, o que significa maior eficiência fotossintética.

O Si é absorvido pelas raízes na forma de ácido monossilícico (H_4SiO_4), uma molécula de carga neutra e, nessa mesma forma, é transportado até a parte aérea, pelo xilema. Nas folhas, a perda de água por transpiração faz com que o ácido monossilícico se concentre e polimerize em sílica (SiO_2), depositando-se nos diferentes tecidos vegetais (MA; YAMAJI, 2006). O transporte de Si à longa distância, da raiz até a parte aérea, é realizado essencialmente via apoplasto. O transporte de Si nas paredes celulares e espaços intercelulares para o lúmen das células e citosol envolve difusão e fluxo de massa.

A absorção de Si está relacionada a alguma forma de defesa, seja ela contra estresse biótico ou abiótico. Assim, as plantas absorvem mais desse elemento nestas condições e, com isso, resistem melhor a esse distúrbio (DALLAGNOL et al., 2009). A concentração de sílica é maior na parte aérea que na raiz e é maior nas folhas velhas em relação às folhas novas (WIESE; NIKOLIC; ROMHELD, 2007).

O conteúdo de silício nas plantas varia de 0,1% a 10% em base seca, concentrando-se nos tecidos de suporte do caule e das folhas, mas pode ser encontrado também em pequenas quantidades nos grãos. Sendo assim, as plantas podem ser classificadas como acumuladoras, intermediárias e não acumuladoras de Si, e serem avaliadas de acordo com a relação molar Si:Ca encontrada nos tecidos. Nas relações acima de 1,0, as plantas são consideradas acumuladoras; entre 1,0 e 0,5, são consideradas intermediárias e menor do que 0,5, não acumuladoras (MA; MIYAKE; TAKAHASHI, 2001). Há também uma variação genotípica na concentração de Si dentro de cada espécie, embora a variação não seja tão grande quanto à observada entre espécies (HODSON et al., 2005).

2.6.1 Silício em plantas ornamentais

Até pouco tempo atrás, não era de conhecimento público o fato de as plantas ornamentais, a maioria das quais são dicotiledôneas, acumularem quantidades apreciáveis de Si em seus tecidos. Voogt e Sonnenfeld (2001) relataram absorção significativa em ornamentais como as gérberas, rosas e asters, e Voogt, Wubben e Strayer (2005) relataram a absorção de silício em violetas africanas. Frantz et al. (2005) relataram a absorção de silício na Nova Guiné *impatiens* (beijo-de-frade ou beijinho) e, mais tarde, Frantz et al. (2008) relataram concentrações de silício pelo tecido foliar de quatorze espécies vegetais ornamentais, variando de um mínimo de cerca de 200 mg kg⁻¹, em

petúnia, para uma alta de quase 1,3% ($13.000 \text{ mg kg}^{-1}$) de peso seco, em zínia. Mattson e Leatherwood (2010) também avaliaram quase duas dúzias de plantas ornamentais e encontraram cerca de metade do Si acumulado no tecido foliar acima de 1.000 mg kg^{-1} . Dada a grande variedade de plantas ornamentais cultivadas comercialmente, ainda são relativamente poucas as espécies avaliadas quanto ao seu potencial de absorção.

Os efeitos benéficos do Si estão bem documentados para muitas culturas e algumas plantas ornamentais. Os mais recentes trabalhos com Si na área de floricultura são com pós-colheita e produção, como, por exemplo, copo-de-leite (ALMEIDA et al., 2009), rosa (LOCARNO; FOCHI; PAIVA, 2011), gébera (GUERRERO; FERNANDES; LUDWIG, 2012), crisântemo (CARVALHO-ZANÃO et al., 2012; SIVANESAN et al., 2013) e girassol ornamental (CARVALHO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013). Os estudos sobre o efeito do Si *in vitro* no segmento da floricultura ainda são bastante restritos. Os únicos existentes são com orquídeas (SOARES et al., 2011; SOARES et al., 2012).

Assim, plantas ou explantes cultivados *in vitro* têm exigências nutricionais específicas, sendo os meios modificados de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e espécie. Assim, ao excisar parte da planta para o cultivo *in vitro*, observa-se que os explantes não são completamente autotróficos e requerem meios nutritivos suplementados com as necessidades exógenas da célula, considerando os elementos essenciais, constituintes orgânicos e energia (TORRES et al., 2001). Dessa forma, a adição do silício ao meio pode promover efeitos benéficos às plantas ao aumentar o conteúdo de hemicelulose e lignina e, conseqüentemente, a rigidez na parede celular, elevando as taxas de sobrevivência durante a aclimatização (CAMARGO; KORNDÖRFER; PEREIRA, 2007).

Para a melhor compreensão das características morfológicas, anatômicas e fisiológicas de plantas *in vitro*, são utilizadas técnicas diversas para auxiliar no entendimento da adaptabilidade desses órgãos vegetais.

2.7 Anatomia foliar

A anatomia vegetal é um ramo da botânica que se dedica a estudar a forma como as células, os tecidos e os órgãos das plantas se organizam (ANATOMIA..., 2013).

A análise das estruturas formadoras do corpo dos vegetais remete à teoria celular e a assumir a unidade básica do corpo vegetal como a célula. As células variam de forma apreciável quanto à sua morfologia, funções e relações com outras células. Estas variações possibilitam a organização de células com funções similares em grupos que são denominados tecidos e estes tecidos se organizam em sistemas com funções também semelhantes e que, por fim, se organizam em órgãos especializados das plantas (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

O estudo da estrutura interna dos vegetais pode auxiliar na compreensão de vários fenômenos relacionados ao corpo do vegetal, bem como nos estudos de identificação taxonômica. As respostas morfogenéticas obtidas na cultura de tecidos e células vegetais *in vitro* têm sido confirmadas mediante análise anatômica (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2012).

2.8 Microscopia eletrônica

O microscópio eletrônico de transmissão (MET) foi introduzido, como instrumento de pesquisa, por volta de 1950 e sua utilização trouxe contribuições marcantes para o conhecimento humano, ao mostrar detalhes jamais antes

visualizados nas áreas biológica e da ciência de matérias. Na mesma época, surgiu a microscopia eletrônica de varredura (MEV), a qual causou uma segunda revolução no estudo do mundo microscópico, devido à alta profundidade de campo, conferindo aspecto tridimensional às imagens (ALVES, 2004).

O MEV consiste num dos equipamentos mais versáteis da atualidade, no que diz respeito à análise microestrutural de materiais sólidos. Apesar do fato de ele envolver certa complexidade de mecanismos para a aquisição da imagem, o resultado final proporcionado consiste de imagens com uma aparência tridimensional característica de fácil interpretação, de grande utilidade para avaliar a estrutura superficial de uma dada amostra. Em termos de aumento máximo atingido com o MEV, observa-se que este se situa entre o microscópio de luz convencional (ML) e o MET. Todavia, a grande vantagem do MEV em relação ao ML consiste em seu alto poder de resolução, que se situa na ordem de 2 a 5 nm, ao passo que o ML atinge 0,5 μm . Já quando comparado com o MET, a grande vantagem que pode ser destacada para o MEV consiste na facilidade de preparação das amostras (ALVES; PERINA, 2012).

A microscopia eletrônica de varredura é muito utilizada na cultura de tecidos de plantas. Asmar et al. (2011) visualizaram, por microscopia de varredura, a presença de cera epicuticular em plântulas de bananeira *in vitro*, importante para a aclimatização.

2.9 Microanálise de raios X

A microanálise de raios X (MAX) consiste numa metodologia analítica aplicada no contexto do funcionamento do MEV, que possibilita obter informações qualitativas e quantitativas acerca da composição de elementos de amostras (orgânicas e inorgânicas) em escala microscópica, a partir da detecção da energia de raios X. Sendo assim, um MEV dotado de um sistema de detecção

de raios X consiste num dos mais importantes instrumentos para a análise de elementos químicos localizados em materiais orgânicos e inorgânicos.

Por meio da identificação dos raios X emitidos pela amostra quando da interação com o feixe eletrônico, é possível determinar a composição de regiões com até 1 µm de diâmetro. Esta metodologia consiste de uma técnica não destrutiva, podendo determinar quantidades de até 1%-2% dos elementos presentes em volumes micrométricos da amostra. A MAX fundamenta-se na descoberta de Moseley (1913), que observou que a frequência de emissão dos raios X característicos é função do número atômico dos elementos presentes na amostra e tem, portanto, valores de energia em 'padrões' específicos a cada átomo de um elemento em particular.

A comparação dos raios X obtidos com valores padrões permite identificar os elementos que emitiram os raios X detectados (ALVES; PERINA, 2012).

A microanálise de raios X é muito utilizada na comprovação da deposição de silício (Si) nas folhas, como também a presença do elemento entre as lâminas foliares da face adaxial e abaxial das plantas de arroz, trigo, café e uva (ANDRADE; ANDRADE; MIGLIORANZA, 2012; LEITE; ANDERSEN, 2009; POZZA et al., 2004; REZENDE et al., 2009).

2.10 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi desenvolvida no final da década de 1950, para a contagem e a análise de células sanguíneas (CÔRTE-REAL et al., 2002). No entanto, com a natural evolução técnica e com o aparecimento de novos marcadores fluorescentes, a utilização desta instrumentação generalizou-se para outras áreas e para estudos com outras células, como células vegetais e microbianas (DOLEŽEL, 1997).

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem numa suspensão líquida. Esta particularidade é uma das diferenças existentes entre a citometria de fluxo e outras técnicas de análise quantitativa de núcleos isolados ou cromossomos, que necessitam da fixação das partículas a uma superfície. A medição em fluxo permite análises em alta velocidade e garante que os citomas analisados sejam selecionados aleatoriamente de toda a população, sem qualquer subjetividade associada (DOLEŽEL, 1997).

A suspensão líquida, que contém os citomas a analisar, é introduzida no centro da câmara de fluxo que se encontra preenchida por um fluido envolvente (“sheath fluid”) e que tem velocidade muito superior à da suspensão líquida. Por meio de um fenômeno físico designado por focagem hidrodinâmica, as partículas são forçadas a moverem-se, em fluido laminar, uma a uma, no centro do fluxo (DOLEŽEL, 1997). Estas partículas interceptam um feixe de iluminação bastante intenso, com origem em uma ou mais fontes de iluminação (laser(s) e/ou lâmpada de vapor de mercúrio). Quando as partículas intersectam o feixe de luz, ocorre um processo de dispersão fotônica e/ou de emissão de fluorescência, cuja intensidade é dependente das características das partículas (CÔRTE-REAL et al., 2002). Os fótons que são dispersos frontalmente vão ser recebidos e analisados por um fotodiodo (detector da dispersão frontal) e os que são dispersos ortogonalmente (90°) são recebidos por uma série de filtros ópticos e analisados em tubos fotomultiplicadores (dispersão lateral e fluorescência) (CÔRTE-REAL et al., 2002). Os diferentes tipos de filtros ópticos (“long-pass”, “short-pass”, passagem de banda e espelhos dicróicos) dividem a emissão fluorescente, permitindo a medição simultânea de vários corantes fluorescentes (DOLEŽEL, 1991).

A citometria de fluxo é uma técnica rápida e conveniente que permite a determinação exata do conteúdo de DNA nuclear (DOLEŽEL, 1991; FOX;

GALBRAITH, 1990). A análise é baseada na utilização de fluorocromos específicos ao DNA e na análise da intensidade de fluorescência relativa emitida por núcleos corados. Para determinar o conteúdo de DNA nuclear em unidades absolutas, a intensidade da fluorescência dos núcleos é comparada com a intensidade da fluorescência de núcleos isolados de uma espécie com o tamanho do genoma nuclear conhecido.

Uma das vantagens da citometria sobre a tradicional técnica de contagem de cromossomos é que ela pode ser utilizada para a análise de muitas plantas em pouco tempo e pode ser aplicada a qualquer tecido vegetal (ROUX et al., 2003). Segundo Bakry et al. (2007), a contagem de cromossomos pode ser útil para a identificação de plantas poliploides, quando a citometria de fluxo não está disponível.

A análise com citometria de fluxo tem sido utilizada em um grande número de espécies, incluindo cereais e leguminosas de importância econômica, e está se tornando cada vez mais útil para a análise genômica e as diferenciações em plantas (DOLEŽEL et al., 2004).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E. F. A. et al. Efeito do silício no desenvolvimento e na nutrição mineral de copo-de-leite. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.15, n. 2, p. 103-113, 2009.

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88 p.

ALVES, E.; PERINA, F. J. **Apostila do curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raios x**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2012. 63 p.

ANATOMIA vegetal. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Anatomia_vegetal>. Acesso em: 7 ago. 2013.

ANDRADE, F. A.; ANDRADE, C. G. T. J.; MIGLIORANZA, É. Detecção de sílica em folha bandeira de trigo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, p. 2555-2562, 2012. Supl. 1.

ANEFALOS, L. C.; TOMBOLATO, A. F. C.; RICORDI, A. Panorama atual e perspectivas futuras da cadeia produtiva de flores tropicais: o caso do antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 107-111, 2010.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2012. 404 p.

ASMAR, S. A. et al. Fontes de silício no desenvolvimento de plântulas de bananeira 'Maçã' micropropagadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1127-1131, jul. 2011.

ATAK, Ç.; ÇELİK, Ö. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from leaf explants. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 43, n. 3, p. 1155-1161, 2009.

BAKRY, F. et al. Colchicine induces doubled-diploids in diploid banana clones **Fruits**, Paris, v. 62, n. 1, p. 3-12, 2007.

BAUTISTA, N. R. et al. Embriogénesis somática en (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad 'Lambada'. **Ra Ximhai**, México, v. 4, n. 1, p. 135-149, 2008.

CABRAL, J. B. Controle de produção industrial de plantas *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 10, n. 1/2, p. 22-23, 2004.

CAMARGO, M. S.; KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H. S. Solubilidade do silício em solos: influência do calcário e ácido silícico aplicados. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 637-647, 2007.

CARVALHO, A. C. P. P. Propagação. In: CASTRO, A. C. R. et al. **Antúrio**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 163.

CARVALHO, P. C. et al. Silício melhora produção e qualidade do girassol ornamental em vaso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2394-2399, nov. 2009.

CARVALHO-ZANAO, M. P. et al. Yield and shelf life of chrysanthemum in response to the silicon application. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 30, n. 3, p. 403-408, 2012.

CASTRO, A. C. R. et al. **Antúrio**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 163.

CASTRO, C. E. F. et al. Propagação vegetativa do antúrio *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 3., 1982, Salvador, **Anais...** Campinas: Instituto de Botânica, 1982. p. 13-25.

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

COELHO, M. A. N.; CATHARINO, E. L. M. Duas espécies novas de *Anthurium* (Aracea) endêmicas do litoral de São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 4, p. 829-833, 2008.

COELHO, M. A. N.; CATHARINO, E. L. M. Duas espécies novas de *Anthurium* Schott (Araceae) para o Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 88, p. 35-41, 2005.

COELHO, M. A. N.; WAECHTER, J. L.; MAYO, S. J. Revisão taxonômica das espécies de *Anthurium* (Araceae) seção *Urospadix* Subseção *Flavescentiviridia*. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 4, p. 799-864, 2009.

COELHO, M. A. N.; WAECHTER J. L. **Taxonomia e biogeografia de *Anthurium* Schott. (Araceae) seção *Urospadix* subseção *Flavescentiviridia***. 2004. 329 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

CÔRTE-REAL, M. et al. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, Lisboa, v. 71, p. 19-33, 2002.

CUMMING, J. R. et al. Organic acid exudation by *Laccaria bicolor* and *Pisolithus tinctorius* exposed to aluminium *in vitro*. Can. **Journal Forest Reserach**, Heidelberg, v. 31, p. 703-710, 2001.

CUQUEL, F. L.; GROSSI, M. L. Produção de antúrio no litoral do Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 10, n. 1/2, p. 35-37, 2004.

DALLAGNOL, L. J. et al. Defective active silicon uptake affects some components of rice resistance to brown spot. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, n. 1, p. 116-121, Jan. 2009.

DEBICZ, R.; WRÓBLEWSKA, K. The effect of silicon foliar application on the development of Seasonal ornamental plants: *Sanvitalia speciosa* 'Sunbini', *Verbena* 'Patio Blue' and *Portulaca umbraticola* 'Duna Red'. **Acta Agrobotanica**, Gdynia, v. 64, n. 4, p. 99-106, 2011.

DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Pozna, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

DOLEŽEL, J. et al. **Encyclopedia of Plant and Crop Science**, 2004.

DOLEŽEL, J. et al. Use of flow cytometry for rapid ploidy determination in *Musa* species. **Infomusa**, Montpellier, v. 6, n. 6/9, p. 35-39, 1997.

DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 2, n. 4, p. 143-154, 1991.

ENTRY, J. A.; ROSE, C.; CROMACK, K. Microbial biomass and nutrient concentrations in hyphal mats of the ectomycorrhizal fungus *Hysterangium setchellii* in a coniferous forest soil. **Soil Biology Biochemistry**, Brisbane, v. 5, p. 447-453, 1992.

EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 641-664, June 1999.

EPSTEIN, E. Silicon in plants: facts vs concepts. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. **Silicon in agriculture**. Netherlands: Elsevier Science, 2001.

FAUTEUX, F. et al. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 249, p. 1-6, 2005.

FOX, M. H.; GALBRAITH, D. W. Application of Flow Cytometry and Sorting to higher plant systems. In: MELAMED, M. R.; LINDMO, T.; MENDELSON, M. L. (Ed.). **Flow cytometry and sorting**. 2nd ed. Wiley-Liss, New York: Wiley-Liss, 1990. p. 633-650.

FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, n. 1, p. 41-71, 2005.

FRANTZ, J. M. et al. Detection, distribution, and quantification of silicon in floricultural crops utilizing three distinct analytical methods. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, London, v. 39, p. 2734-2751, 2008.

FRANTZ, J. M. et al. Silicon is deposited in leaves of New Guinea impatiens. **Plant Health Progress**, St. Paul, v. 217, p. 1, Feb. 2005. Disponível em: <<http://www.plantmanazementnetwork.org/sub/php/research/2005/silicon>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

FUZITANI, E. J.; NOMURA, E. S. Produção de mudas *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 10, n. 1/2, p. 14-17, 2004.

GOMES, F. B. et al. 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.

GOURLAY, I. D.; GRIME, G. W. Calcium oxalate crystals in African Acacia species and their analysis by scanning proton microprobe (SPM). **IAWA Journal**, Leiden, v. 2, p. 137-148, 1994.

GUERRERO, A. C.; FERNANDES, D. M.; LUDWIG, F. Acúmulo de nutrientes em gébera de vaso em função de fontes e doses de potássio. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 30, p. 201-208, 2012.

HODSON, M. J. et al. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. **Annals of botany**, London, v. 96, p. 1027-1046, 2005

JAHAN, M. T. et al. *In vitro* clonal propagation of anthurium (*Anthurium andreanum* L.) using callus culture. **Plant Tissue Culture & Biotechnology**, Rehovet, v. 19, n. 1, p. 61-69, 2009.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Comercialização de antúrios no Brasil: aspectos relevantes dos mercados interno e externo. In : CASTRO, A. C. R. et al. **Antúrio**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 163.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. **2010**: balanço do comércio exterior da floricultura brasileira. 2011. Disponível em: <http://www.hortica.com.br/artigos/2010_Balanco_do_Comercio_Exterior_da_Floricultura_Brasileira.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2012.

JUNQUEIRA, H. A.; PEETZ, M. S. **2012**: balanço do comércio exterior da floricultura brasileira. 2013. Disponível em: <http://www.hortica.com.br/artigos/2012_Balanco_do_Comercio_Exterior_da_Floricultura_Brasileira.pdf>. Acesso em: 1 jun. 2013.

JUNQUEIRA, H. A.; PEETZ, M. S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância sócio-econômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 37-52, 2008.

KAMENIDOU, S.; CAVINS, T. J.; MAREK, S. Silicon supplements affect floricultural quality traits and elemental nutrient concentrations of greenhouse produced gerbera. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, p. 390-394, 2010.

KAMENIDOU, S.; CAVINS, T. J.; MAREK, S. Silicon supplements affect horticultural traits of greenhouse-produced ornamental sunflowers. **HortScience**, Alexandria, v. 43, p. 236-239, 2008.

LANDGRAF, P. R. C.; PAIVA, P. D. O. Produção de mudas para jardim no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 127-131, 2009.

LEITE, B.; ANDERSEN, P. C. Localized accumulation of silicon (Si) in grape leaves affected by Pierce's disease. **Microscopy and Microanalysis**, New York, v. 15, p. 915-919, 2009. Suppl. 2.

LIANG, Y. et al. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. **Environmental Pollution**, Barking, v. 147, p. 422-428, 2007.

LIGHTBOURN, G. J.; PRASAD, P. V. D. *In vitro* techniques for rapid multiplication of four varieties of *Anthurium andraeanum*. **Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, Kingston, v. 34, p. 3-5, 1990.

LOCARNO, M.; FOCHI, C. G.; PAIVA, P. D. O. Influência da adubação silicatada no teor de clorofila em folhas de roseira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 2, p. 287-290, mar./abr. 2011.

MAIRA, O.; ALEXANDER, M.; VARGAS, T. E. Micropropagation and organogenesis of *Anthurium andraeanum* Lind cv. Rubrun. In: JAIN, S. M.; OCHATT, S. J. (Ed.). **Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants**. New York: Human, 2010. p. 3-14. (Methods in Molecular Biology, 589).

MA, J. F.; MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Silicon as a beneficial element for crop plant. In: DATNOFF, L. E.; KORNDÖRFER, G. H.; SNYDER, G. (Ed.). **Silicon in agriculture**. New York: Elsevier Science, 2001. p.17-39.

MA, J. F.; MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Silicon as a beneficial element for crop plants. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science, 2002. p. 17-39.

MA, J. F.; YAMAJI, N. Functions and transport of silicon in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 65, p. 3049-3057, 2008.

MA, J. F.; YAMAJI, N. A silicon transporter in rice. **Nature**, London, v. 440, p. 688-691, 2006.

MARTIN, K. P. et al. Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum*. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, Ohio, v. 39, p. 500-504, 2003.

MATTSON, N. S.; LEATHERWOOD, W. R. Potassium silicate drenches increase leaf silicon content and affect morphological traits of several floriculture crops grown in a peat-based substrate. **HortScience**, Alexandria, v. 45, p. 43-47, 2010.

MAYO, S. J.; BOGNER, J.; BOYCE, P. C. **The genera of Araceae**. London: Royal Botanical Garden, 1997. 370 p.

MITANI, N.; MA, J. F. Uptake system of silicon in different plant species. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 1255-1261, 2005.

OLIVEIRA, J. T. L. et al. Crescimento de cultivares de girassol ornamental influenciado por doses de silício no solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 2, p. 123–128, 2013.

PIERIK, R. L. M.; STEEGMANS, H. H. M.; VAN DER MEYS, J. A. J. Plantlet formation in callus tissues of *Anthurium andraeanum* Lindl. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 2, p. 193-198, 1974.

POZZA, A. A. A. et al. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 185-188, 2004.

PUCHOA, D. *In vitro* mutation breeding of *Anthurium* by gamma radiation / **International Journal of Agriculture & Biology**, Pakistan, v. 7, n. 1, p. 11-20, 2005.

REZENDE, D. C. et al. Effect of root foliar applications of silicone on brown spot development in rice. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 38, p. 67-73, 2009.

RICHMOND, K. E.; SUSSMAN, M. R. Got Silicon? The non-essential, beneficial plant nutrient. **Current Opinions in Plant Biology**, Cambridge, v. 6, p. 268-272, 2003.

RODRIGUES, F. A. **Silício na agricultura**. 5. ed. Viçosa, MG: UFV, 2010. p. 111-134.

ROUX, N. et al. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. **Plant Cell Report**, Heidelberg, v. 21, p. 483-490, 2003.

SANTOS, A. P. B. A Beleza, a Popularidade, a Toxicidade e a Importância Econômica de Espécies de Aráceas. **Revista Virtual Química**, Niterói, v. 3, n. 3, p. 181-195, 2011. Disponível em: <<http://www.uff.br/rvq>>. Acesso em: 22 jan. 2012.

SIVANESAN, I. et al. Silicon Supply through the Subirrigation System Affects Growth of Three Chrysanthemum Cultivars. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, Heidelberg, v. 54, n. 1, p. 14-19, 2013.

SOARES, J. D. R. et al. Fontes de silício na micropropagação de orquídea do grupo *Cattleya*. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 33, n. 3, p. 503-507, 2011.

SOARES, J. D. R. et al. Leaf anatomy of orchids micropropagated with different silicon concentrations. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 34, n. 4, p. 413-421, Oct./Dec. 2012.

TEMPONI, L. G. **Sistemática de *Anthurium* seção *Urospadix* (Araceae)**. 2006. 143 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

TERAO, D.; CARVALHO, A. C. P. P.; BARROSO, T. C. S. F. **Flores tropicais (Tropical Flowers)**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 225 p.

TOMBOLATO, A. F. C. et al. Antúrio: *Anthurium andraeanum* Lindl. In: _____. **Cultivo comercial de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2004. p. 61-94.

TORRES, A. C. et al. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa, 2001. 19 p. (Circular Técnica, 24).

VALADARES, R. T.; MARTINS, M. L. L.; COELHO, M. A. N. O gênero *Anthurium* Schott (Araceae) no Parque Estadual Paulo César Vinha, Guarapari, Espírito Santo. **Natureza on line**, Santa Tereza, v. 8, n. 3, p. 107-113, 2010.

VIÉGAS, J. et al. Taxonomic and cytogenetic analysis of species of the *Anthurium* (Araceae) genus native to the Brazilian Atlantic Forest. In: SILVA, J. T. (Ed.). **Floriculture, ornamental and plant biotechnology**. Middlesex: Global Science Books, 2006. v. 4, p. 669-677.

VOOGT, W.; SONNENFELD, C. Silicon in horticultural crops grown in soilless culture. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. **Silicon in agriculture**: studies in plant science. Amsterdam: Elsevier Science, 2001. p. 115-131.

VOOGT, W.; WUBBEN, J. P.; STRAYER, N. A. The effect of silicon application on some ornamental plants. In: SILICON IN AGRICULTURE CONFERENCE, 3., 2005, Uberlândia. **Proceedings...**Uberlândia: UFU, 2005. p. 128.

WIESE, H.; NIKOLIC, M.; ROMHELD, V. Silicon in plant nutrition. In: SATTELMACHER, B.; HORST, W. J. (Ed.). **The apoplast of higher plants**: compartment of storage, transport and reactions. Dordrecht: Springer, 2007. p. 33-47.

ZUÑIGA, D. et al. Cristalchemical characterization of calcium oxalate crystals isolated from seed coat of *Phaseolus vulgaris* and leaves of *Vitis vinifera*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 190, p. 239-245, 2003.

CAPÍTULO 2

Citometria de fluxo e estudos anatômicos em genótipos de *Anthurium*

RESUMO

No intuito de averiguar os caracteres anatômicos e o conteúdo de DNA de um banco de germoplasma, foram realizados estudos das folhas de 12 genótipos de *Anthurium*, aclimatizados em vasos e mantidos em sala de aclimatização controlada. Após 120 dias, foram coletadas três folhas totalmente expandidas de cada um dos genótipos, para a realização das análises anatômicas, ultraestruturais e citométrica. Observou-se grande amplitude genômica do gênero *Anthurium*, variando de 4,95-22,74 pg de DNA. As espécies de *Anthurium* avaliadas mostraram-se pouco distintas quanto à anatomia da folha, diferenciando-se apenas algumas espécies, sendo *A. bomplandii* e o híbrido (*A. lindmanianum* x *A. guianensis*). As análises de citometria de fluxo permitiram uma diferenciação entre as espécies *A. andraeanum*, *A. affine*, *A. bomplandii*, *A. gracile* e o híbrido (*A. lindmanianum* x *A. guianensis*), como também aproximou o grupo *A. raimundii*, *plowmanii* e *jemanii* do *A. sp.* (IFT 258), em todas as análises. As espécies de *Anthurium* têm epiderme uniestratificada com cutícula lisa; células epidérmicas, com paredes anticliniais retas ou sinuosas e paredes pericliniais retas, sinuosas ou convexas. Os estômatos são do tipo braquiparacítico na face abaxial, hipoestomáticos, com exceção das espécies *A. jemanii*, *A. affine*, *A. gracile*, *A. plowmanii* e *A. lindmaniarum* x *A. guianensis*, que têm estômatos em ambas as faces, ocorrem em menor densidade e são anfi-hipoestomáticas. O mesofilo é homogêneo, com a primeira camada abaixo da epiderme apresentando drusas, em especial na nervura principal, lâmina foliar e abaixo da epiderme. Ráfides não foram observadas nessas espécies. Todos os genótipos apresentaram cera epicuticular depositada na superfície da cutícula, com exceção do híbrido (*A. lindmanirum* x *A. guianensis*). Os genótipos que apresentaram maior número de estômatos foram *A. jemanii* e *A. raimundii*, ao contrário do *A. gracile*, que apresentou menor densidade. Já para diâmetro polar e equatorial, *A. gracile* foi numericamente superior, em ambos os diâmetros e, conseqüentemente, em sua relação. Na epiderme adaxial, o *Anthurium sp.* (IFT 255) apresentou espessura epidérmica superior à das demais espécies, enquanto, para a espessura da epiderme abaxial, o híbrido (*A. lindmanianum* x *A. guianensis*) e IFT 123 foram os que apresentaram maiores valores. *A. raimundii* e IFT 258 foram semelhantes em ambas as faces, apresentando os menores valores em espessura epidérmica. A análise de agrupamento possibilitou a aproximação das espécies *A. raimundii* e *A. affine*, *A. bomplandii* e *A. gracile*, *A. jemani* e *A.*

plowmanii, e as cultivares Astral e Rubi (*A. adraeanum*), e isolou o híbrido (*A. lidimanianum* x *A. guianensis*).

Palavras-chave: Araceae. Anatomia foliar. Antúrios. DNA.

ABSTRACT

In order to ascertain the anatomical characters and DNA content of a genebank, studies have been conducted of the leaves of 12 genotypes *Anthurium* plantlets in pots and kept in a room controlled acclimatization. After 120 days, we collected three fully expanded leaves of each genotype, for the realization of the anatomical, ultrastructural and flow cytometric. Observed large-scale genomics of the genus *Anthurium*, ranging from 4.95 to 22.74 pg DNA. *Anthurium* species evaluated were shown to be somewhat different as to the anatomy of the sheet, differing only some species *A. bomplandii* and hybrid (*A. guianensis* x *A. lindmanianum*). The flow cytometric analysis allowed the differentiation between the species *A. andraeanum*, *A. affine*, *A. bomplandii*, *A. gracile* and hybrid (*A. guianensis* x *A. lindmanianum*), but also approached group *A. raimundii*, *plowmanii* and *jemanii*, *A. sp.* (IFT 258) in all analyzes. *Anthurium* species have epidermis with cuticle smooth; epidermal cells with straight anticlinal walls and winding and periclinal walls straight, winding or convex. The stomata are of type braquiparacítico on the abaxial surface, hypostomatic, with the exception of the species *A. jemanii*, *A. affine*, *A. gracile*, *A. plowmanii* and *A. lindmaniarum* x *A. guianensis*, which have stomata on both sides occur at lower density and are anfihipoestomáticas. The homogeneous mesophyll, with the first layer below the epidermis presenting drusen, especially in the midrib, leaf and below the epidermis. Raphides were not observed in these species. All genotypes showed epicuticular wax deposited on the surface of the cuticle, with the exception of the hybrid (*A. guianensis* x *A. lindmanianum*). Genotypes with the highest number of stomata were *A. jemanii* and *A. raimundii*, unlike *A. gracile* with the lowest density. As for polar and equatorial diameter, *A. gracile* was numerically higher in both diameters, and consequently in their relationship. In the adaxial epidermis *Anthurium sp.* (IFT 255) showed epidermal thickness superior to other species as to the thickness of the lower epidermis, the hybrid (*A. guianensis* x *A. lindmanianum*) and IFT 123, presented the highest values. *A. raimundii* and IFT 258 were similar in both the sides, with the lowest values in epidermal thickness. Cluster analysis allowed the approximation of species *A. raimundii* and *A. affine*, *A. bomplandii* and *A. gracile*, *A. jemani* and *A. plowmanii* and cultivars Astral and Rubi (*A. andraeanum*), and isolated hybrid (*A. guianensis* x *A. lindmanianum*).

Keywords: Araceae. Leaf anatomy. Anthuriums. DNA.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Anthurium* é considerado taxonomicamente complexo, com muitas espécies pouco conhecidas, novas para a ciência e com poucos estudos sobre sua distribuição geográfica. A dificuldade na distinção taxonômica das espécies deve-se, acima de tudo, à sua plasticidade morfológica. Algumas são muito similares, com diferenças morfológicas e vegetativas sutis, dando margem à confusão taxonômica dentro do grupo. Tillich (2003) salienta que há muitas lacunas envolvendo a estrutura da plântula em Araceae e que, apesar da existência de trabalhos envolvendo 36 gêneros da família (incluindo *Anthurium*), importantes detalhes sobre a morfologia ainda não foram esclarecidos.

As publicações sobre a família Araceae incluem uma extensa lista sobre anatomia foliar, entretanto, são poucas as análises anatômicas realizadas no gênero *Anthurium*. Os mais recentes estudos anatômicos realizados em *Anthurium* foram com anatomia da lâmina foliar e da espata (MANTOVANI; FILARTIGA; COELHO, 2010; MANTOVANI; PEREIRA, 2005), e anatomia foliar de plantas jovens e adultas em habitat epífitas (LORENZO; MANTUANO; MANTOVANI, 2010).

O gênero *Anthurium* pertence à família Araceae, que é um grande grupo de plantas herbáceas monocotiledôneas, com 10 subfamílias, 110 gêneros e, aproximadamente, 4.000 espécies (GONÇALVES; SALVIANI, 2005; VIÉGAS et al., 2006). O gênero *Anthurium* pode ser reconhecido pela inflorescência (espádice) e uma bráctea vistosa ou não (espata) que abrigam flores hermafroditas, sésseis, geralmente muito pequenas e dispostas espiraladamente ao longo do eixo da inflorescência (COELHO; LEONI, 2004). De acordo com Coelho (2007), foram descritas 105 espécies do gênero *Anthurium* no Brasil.

Devido à sua facilidade, rapidez e precisão, a citometria de fluxo tem sido uma alternativa atraente aos métodos tradicionais (DOLEZEL; BARTOS,

2005). A análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA nuclear é uma excelente alternativa aos métodos clássicos de contagem cromossômica (LOUREIRO; SANTOS, 2004) e na distinção de espécies ainda não identificadas. Tanto a anatomia foliar quanto a citometria de fluxo podem prover vários caracteres para esclarecer as relações dentro de espécies de *Anthurium*.

Considerando-se o grande número de espécies, sua diversidade e complexidade, torna-se evidente a importância da utilização de tecnologias mais avançadas, a exemplo da anatomia e citometria de fluxo, objetivando o conhecimento do gênero *Anthurium*.

O trabalho foi realizado, portanto, com o principal objetivo de comparar as características anatômicas foliares, detectando caracteres que sejam potenciais para subsidiar e contribuir com os estudos taxonômicos do gênero *Anthurium*, além de aproximar espécies não identificadas por meio da quantificação do DNA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de junho a novembro de 2012.

Foram estudados 12 genótipos do gênero *Anthurium*, pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), coletados em diferentes regiões do Brasil, sendo *Anthurium gracile* (IFT 107), *A. bomplandii* (IFT 108), *A. raimundii* (IFT 109), *A. jemanii* (IFT 117), *A. plowmanii* (IFT 118), *Anthurium* sp. (IFT 123), *A. lindmaniarum* x *A. guianensis* (IFT 128), *A. affine* (IFT 129), *Anthurium* sp. (IFT 255), *Anthurium* sp. (IFT 258), *A. andraeanum* (cv. Astral IAC) e *A. andraeanum* (cv. Rubi IAC).

Esses genótipos, já estabelecidos *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa (CNPAT), foram enviados à Universidade Federal de Lavras (UFLA), tendo sido aclimatizados em vasos e mantidos, em sala de aclimatização, à temperatura de ± 28 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 120 dias, foram coletadas 3 folhas totalmente expandidas de 3 plantas, para cada análise.

Citometria de fluxo - utilizaram-se 3 repetições de 30 mg de folhas para cada espécie, acrescidas com a mesma quantidade de massa foliar de ervilha (*Pisum sativum*) (padrão de referência de quantidade de DNA – 9,09 pg) ou feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (padrão de referência de quantidade de DNA – 26,90 pg), que foram trituradas em placa de Petri, contendo 1 mL de tampão de extração de núcleos, Tris ou Marie (DOLEZEL; BINAROVA; LUCRETTI, 1989), dependendo da espécie. Foram realizadas leituras de 5.000 núcleos das amostras extraídas em 1 mL de tampão Tris ou Marie e corados com 25 μ L/mL de iodeto de propídeo. Os histogramas foram obtidos no citômetro FacsCalibur® (Becton Dickinson) com o programa Cell Quest (DICKINSON, 1998). O

conteúdo de DNA (pg) das plantas foi obtido por meio da equação: conteúdo de DNA (pg) = posição do pico G1 da amostra/posição do pico G1 de padrão x pg. A análise estatística dos dados foi realizada pelo programa WinMDI 2.8 (TROTTER, 2000).

Características anatômicas - folhas foram fixadas em F.A.A._{70%} e armazenadas em etanol 70%. Secções paradérmicas das faces abaxial e adaxial foram realizadas à mão livre, enquanto as secções transversais foram feitas em micrótomo de mesa. As secções foram colocadas em placas de Petri contendo hipoclorito de sódio 1%, durante 10 minutos e, em seguida, transferidas para água destilada, por 10 minutos e coradas com safranina 1,0% e safrablau (safranina 1% e azul de Astra 0,1%), para secções paradérmicas e transversais, respectivamente. Posteriormente, foram montadas lâminas semipermanentes. O material foi observado em microscópio Olympus CX41, acoplado à câmera digital Belcam DIV-3000, fotografado (15 campos) e as medidas foram realizadas no *software* ImageTool 3.0. Avaliaram-se mesofilo, densidade estomática, relação diâmetro polar e diâmetro equatorial dos estômatos e espessura da epiderme das faces abaxial e adaxial.

Características ultraestruturais - amostras constituídas de folhas foram imersas em solução fixadora Karnovsky (1965) (pH 7,2), por 24 horas, sob refrigeração. A seguir, foram lavadas em tampão cacodilato 0,056 M (três vezes), por 10 minutos cada e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, em tampão cacodilato 0,05 M, por 4 horas, em temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram lavadas, por três vezes, em água destilada e desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%), por 10 minutos e três vezes com 100%, por um minuto cada. Após a desidratação, para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram secas em aparelho de ponto crítico CDP 030, por meio de CO₂ líquido e, em seguida, montadas em *stubs* para a metalização com ouro. Os espécimes foram

observados em microscópio eletrônico de varredura (LEO Evo 040), operando entre 10 e 20 kV. Observou-se toda a estrutura da epiderme adaxial e abaxial de cada folha.

Delineamento experimental e análise estatística - os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com 12 tratamentos (genótipos) com 3 repetições (3 folhas/genótipo). Todos os dados foram submetidos à ANAVA no software R (DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008) e as médias comparadas, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Foram comparadas quanto ao potencial diagnóstico de similaridade dos respectivos caracteres anatômicos e de conteúdo de DNA, por meio de análises de agrupamento. Estabelecidos 12 caracteres para a folha, os dados foram descritos por uma análise de agrupamento, utilizando a distância euclidiana no software R (DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação à amplitude genômica, foi observada grande amplitude no gênero *Anthurium*, de 4,95-22,74 pg (Tabela 1). Houve aproximação dos genótipos, que foram divididos em sete grupos. No primeiro grupo, ficou apenas o acesso IFT 128 (híbrido *A. lindmanianum* x *A. guianensis*), com 4,95 pg e, no segundo grupo, os genótipos IFT 123 (*Anthurium* sp.) e IFT 255 (*Anthurium* sp.), materiais ainda não identificados, com aproximadamente o dobro da quantidade de DNA (8,61 pg) do primeiro grupo. No terceiro grupo observaram-se as cultivares comerciais (Rubi e Astral) pertencentes à espécie *A. andraeanum*, com 9,18 e 9,28 pg, respectivamente. No quarto grupo, observaram-se os genótipos IFT 109, IFT 118, IFT 117 e IFT 258, classificados como *A. raimundii* (10,04 pg), *A. plowmanii* (10,22 pg), *A. jemanii* (10,63 pg) e *Anthurium* sp. (10,93 pg). Nos três últimos grupos, com as maiores quantidades de DNA, apresentaram-se isolados com os respectivos conteúdos de DNA: 13,08 pg para *A. affine* (IFT 129), 21,54 pg para *A. gracile* (IFT 107) e 22,74 pg para *A. bomplandii* (IFT 108).

No experimento, o conteúdo de DNA das plantas foi determinado por citometria de fluxo, que aproximou estatisticamente as espécies de *A. raimundii*, *A. jemanii*, *A. plowmanii* e *Anthurium* sp. (IFT 258), como também o grupo de duas espécies ainda não identificadas, IFT 123 e 255. Confirmou-se também que as cultivares Astral e Rubi (IAC) pertencem à mesma espécie, tendo os mesmos resultados sido observados para Bliss e Suzuki (2012), como também isolou *A. bomplandii*, *A. gracile* e *A. affine* das demais espécies. Do ponto de vista prático, determinar o conteúdo de DNA nuclear pode substituir a contagem de cromossomos, principalmente quando se trabalha com um número grande de indivíduos, como um banco de germoplasma (SCHIFINO-WITTMANN, 2001).

A média dos coeficientes de variação (CV), neste estudo, para as amostras foliares, variou entre 0,34 e 0,73. Esses valores demonstraram a qualidade dos resultados obtidos e a confiabilidade nas estimativas de quantidade de DNA nos genótipos de *Anthurium* spp. (Tabela 1).

Tabela 1 Quantificação de DNA para genótipos de *Anthurium* spp. analisados por citometria de fluxo

Acesso	Nome científico	Tampão	Padrão	Conteúdo de DNA (pg) *	CV (%)
IFT 128	<i>Anthurium lindmanianum</i> x <i>A. guianensis</i>	Tris	<i>Phaseolus vulgaris</i>	4,95 g	0,58
IFT 255	<i>Anthurium</i> sp.	Marie	<i>Phaseolus vulgaris</i>	8,60 f	0,48
IFT 123	<i>Anthurium</i> sp.	Marie	<i>Phaseolus vulgaris</i>	8,60 f	0,46
cv. Astral	<i>Anthurium andraeanum</i>	Marie	<i>Phaseolus vulgaris</i>	9,28 e	0,40
cv. Rubi	<i>Anthurium andraeanum</i>	Marie	<i>Phaseolus vulgaris</i>	9,18 e	0,50
IFT 109	<i>Anthurium raimundii</i>	Marie	<i>Phaseolus vulgaris</i>	10,21 d	0,42
IFT 118	<i>Anthurium plowmanii</i>	Marie	<i>Phaseolus vulgaris</i>	10,22 d	0,34
IFT 117	<i>Anthurium jemanii</i>	Marie	<i>Phaseolus vulgaris</i>	10,64 d	0,73
IFT 258	<i>Anthurium</i> sp.	Marie	<i>Phaseolus vulgaris</i>	10,93 d	0,72
IFT 129	<i>Anthurium affine</i>	Marie	<i>Phaseolus vulgaris</i>	13,08 c	0,48
IFT 107	<i>Anthurium gracile</i>	Marie	<i>Phaseolus vulgaris</i>	21,55 b	0,34
IFT 108	<i>Anthurium bomplandii</i>	Tris	<i>Pisum sativum</i>	22,74 a	0,64

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas pertencem ao mesmo grupo e, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5%

Neste trabalho, utilizaram-se, como padrão interno, a ervilha (*Pisum sativum*) e o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), que têm um conteúdo de 2 C de DNA de 9,09 e 26,09 pg, respectivamente (Figura 1). Estes padrões foram escolhidos por possuírem conteúdo de DNA cujo valor situa-se no meio do valor médio para a maioria dos conteúdos de DNA vegetal, podendo, dessa forma, ser utilizados para avaliar tanto plantas com pequeno genoma quanto aquelas com genoma maior.

Ao contrário dos métodos convencionais, tais como contagem de cromossomos ou medições do comprimento dos estômatos, o uso da citometria de fluxo é mais preciso e mais rápido (CHEN et al., 2011; NGUYEN et al., 2003).

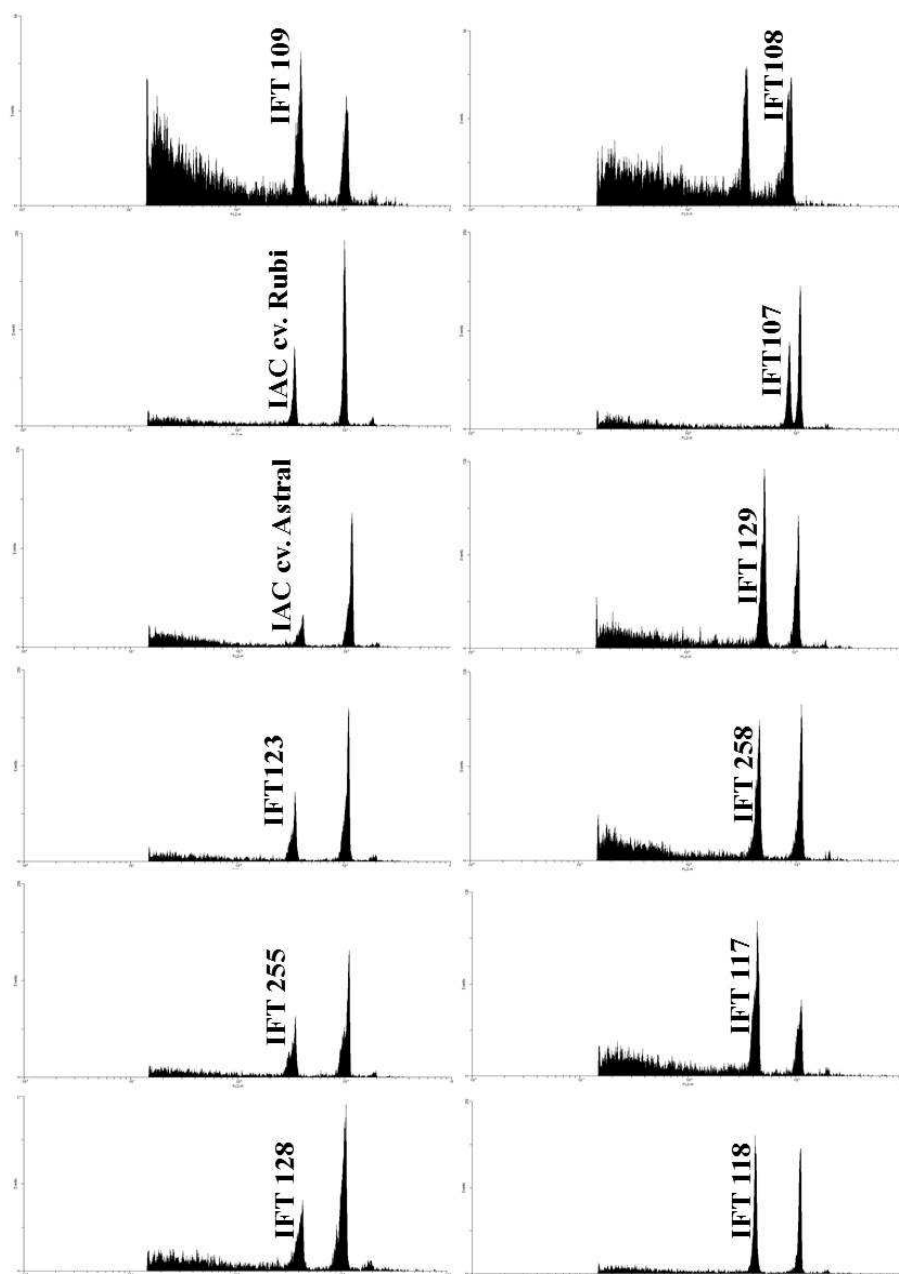


Figura 1 Histogramas obtidos pela análise de citometria de fluxo em genótipos de *Anthurium* spp.

As espécies de *Anthurium* têm lâmina foliar com cutícula lisa, células epidérmicas poligonais ou irregulares, com paredes anticlinais retas ou sinuosas e estômatos em ambas as faces ou apenas na abaxial (Figura 2). Todas as espécies de *Anthurium* estudadas neste trabalho apresentaram células epidérmicas da folha com paredes retas ou onduladas, corroborando os resultados obtidos por Keating (2002) e Mantovani, Filartiga e Coelho (2010), que chegaram aos mesmos resultados. Nas folhas, as células epidérmicas são curtas, com distribuição aleatória. Resultados estes, também encontrados por Mantovani, Filartiga e Coelho (2010) em trabalho realizado com nove espécies de *Anthurium*. Houve exceção apenas para *A. bomplandii*, que apresentou células mais alongadas, característica relevante para diferenciá-la das demais espécies.

A epiderme foliar das espécies analisadas apresentou, em ambas as faces, células com paredes periclinais variando de retas a convexas, com exceção do híbrido (*A. lindmanianum* x *A. guianensis*), que apresentou paredes anticlinais sinuosas e periclinais convexas, caráter distintivo para identificá-lo. Keating (2002) constatou que, em visão transversal, alguns gêneros de Araceae apresentam o contorno das paredes periclinais das células epidérmicas, bem como a proporção altura/largura, e considerou que são valores para diagnósticos taxonômicos.

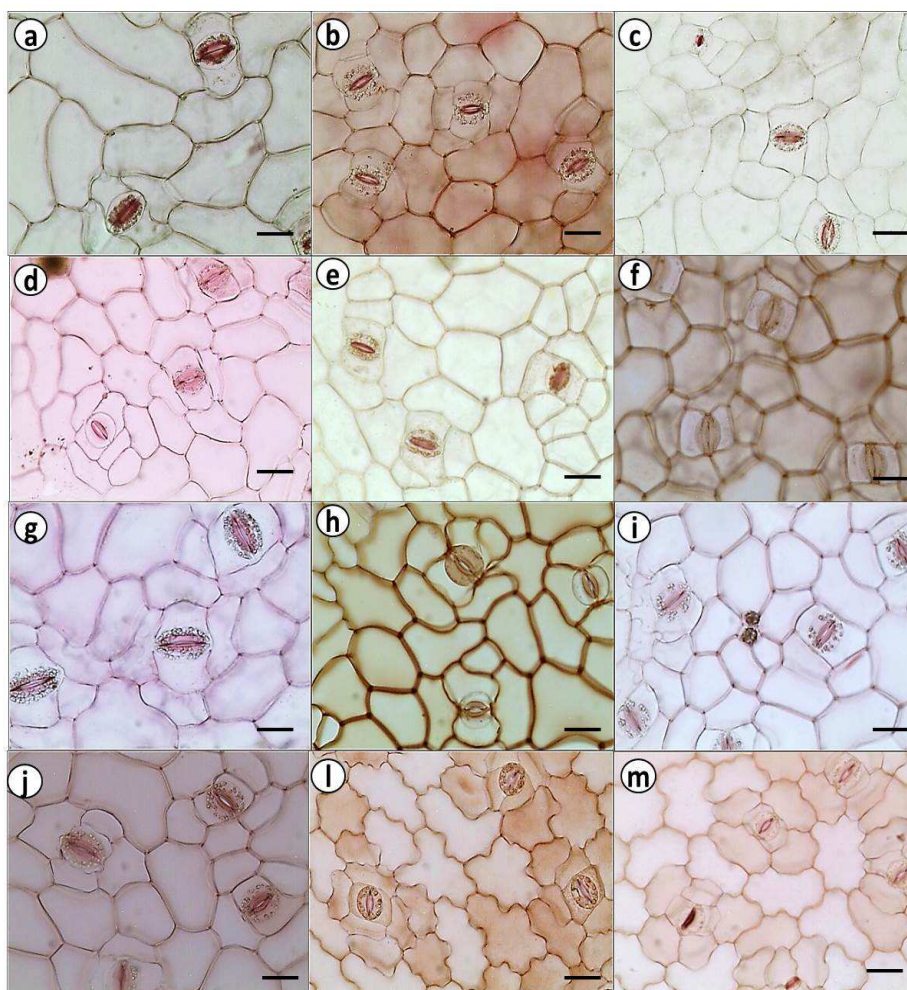


Figura 2 Fotomicrografias de seções paradérmicas da face abaxial de folhas de genótipos de *Anthurium* spp. a) IFT 108, b) IFT 117, c) IFT 128, d) IFT123, e) IFT 129, f) IFT255, g) IFT 107, h) IFT 258, i) IFT 109, j) IFT 118, l) IAC cv. Astral e m) IAC cv. Rubi. Barra= 1 mm (Lavras, 2013)

Secções paradérmicas da face abaxial das folhas são mostradas na Figura 2, indicando que as espécies têm estômatos na face abaxial, classificando-se como folhas hipoestomáticas. A exceção é para as espécies A.

jemanii, *A. affine*, *A. gracile*, *A. plowmanii* e *A. lindmanianum* x *A. guianensis*, que têm estômatos em ambas as faces e ocorrem em menor densidade, classificando-se como anfi-hipostomática (Figura 3). É característica destas espécies apresentar também estômatos na nervura central ou em sua proximidade. Estas informações estão de acordo com Keating (2002) (Tabela 1), de que a folha da maioria das espécies da família Araceae é hipoestomática e os estômatos são concentrados, principalmente, na superfície abaxial.

O estômato é a porta entre a planta e a atmosfera, podendo desempenhar importante papel nas respostas das plantas às condições ambientais (NILSON; ASSMANN, 2007). É encontrado, na maioria das plantas, predominantemente nas folhas e nos caules jovens e consiste, basicamente, de um poro circundado por duas células-guarda, que podem ser usadas também na distinção taxonômica em espécies.

Todos os estômatos, neste trabalho, foram identificados como braquiparacíticos, que são característicos de espécies de *Anthurium* (MANTOVANI; FILARTIGA; COELHO, 2010; MANTOVANI; PEREIRA, 2005). Os estômatos da face abaxial de *A. bomplandii* têm as células-guarda menos proeminentes que as células subsidiárias, que são mais alongadas, distinguindo-se das demais espécies, que apresentam células-guarda no mesmo nível das subsidiárias.

Todas as espécies estudadas apresentam estômatos acompanhados, de cada lado, por duas células subsidiárias e células-guarda com cloroplastos (Figura 3), classificando-se como braquiparacíticos. A maioria das espécies apresenta células epidérmicas com paredes retas ou sinuosas, com exceção de *A. andraeanum* (cv. Astral e Rubi), que apresenta paredes onduladas somente na face abaxial (Figura 2L e M).

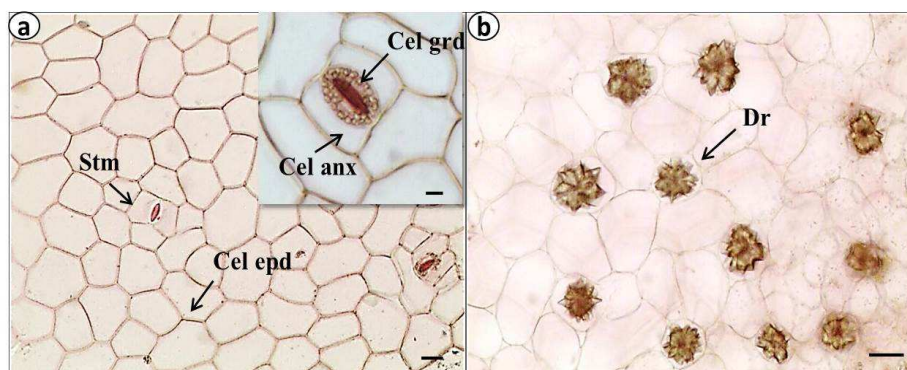


Figura 3 Fotomicrografias da folha de *Anthurium affine*. a) Epiderme da face adaxial com células epidérmicas (Cel epd), detalhe para o estômato (Stm), sendo Cel grd= célula guarda e Cel anx= célula anexa. b) Epiderme da face adaxial, evidenciando as drusas (Dr). Barra= 1 mm (Lavras, 2013)

O mesofilo homogêneo é indiferenciado, com a primeira camada abaixo da epiderme apresentando drusas em sua estrutura. Drusas de oxalato de cálcio também estão presentes na nervura principal, na lâmina foliar e abaixo da epiderme (Figura 4).

Apesar de amplamente difundida na família Araceae (KEATING, 2004), não foram observadas ráfides em qualquer das espécies. Por outro lado, drusas foram encontradas em todas as espécies estudadas (Figura 2B e Tabela1), destacando-se as espécies *Anthurium bomplandii*, *A. jemanii*, *A. gracile* e IFT 123, que apresentaram as maiores quantidades de drusas concentradas na face adaxial do limbo foliar e nervura principal (Figura 4), podendo ser uma característica distintiva para as espécies.

A epiderme foliar de todas as espécies é uniestratificada, constituída por células tabulares, quando observadas transversalmente. Os estômatos em secção transversal estão no mesmo nível das demais células epidérmicas (Figura 4).

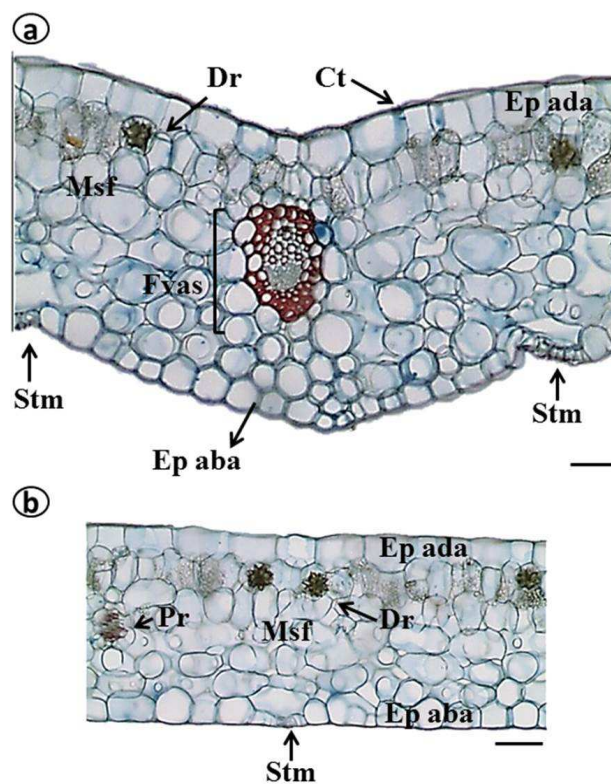


Figura 4 Fotomicrografias de secções transversais da folha de *Anthurium andraeanum* cv. Astral (IAC). a) Nervura principal e demais tecidos do limbo foliar. b) Limbo foliar, Ep ada = epiderme da face adaxial, Fvas = feixe vascular, Stm = estômato (com ondulações entre a nervura principal), Msf = mesofilo, Pr= periciclo, Dr = drusa, Ct = cutícula, Ep aba = epiderme da face abaxial. Barra = 5 mm. (Lavras, 2013)

Os cristais de oxalato de cálcio têm sido motivo de investigação, devido à sua importância ecológica, uma vez que a presença de cristais nas plantas é relacionada com o mecanismo de defesa contra a herbivoria (LUCAS et al., 2000; XIANG; CHEN, 2004) e pela importância fisiológica, pois os cristais regulam o nível de cálcio nos tecidos (VOLK et al., 2002), além de auxiliar na distribuição da luz para os cloroplastos com a dissipação do excesso de luz,

durante períodos de alta intensidade luminosa (FRANCESCHI, 2001). Adicionalmente, há estudos que evidenciam que o excesso de cálcio pode ser estocado na forma de oxalato de cálcio e que este cálcio pode ser remobilizado em certas condições (VOLK et al., 2002).

Segundo Keating (2004), a presença de idioblastos com cristais de oxalato de cálcio é uma característica definida para a família Araceae. Conforme o autor, em *Anthurium*, as células e os cristais têm características independentes, podendo ocorrer na lâmina foliar, no pecíolo, no caule e na raiz; ráfides são encontradas em todos os órgãos. No caso das espécies estudadas, foram encontradas somente drusas na nervura principal, na lâmina foliar e abaixo da epiderme, característica observada por Mantovani, Filartiga e Coelho (2010).

A nervura principal pode ter a mesma ou quase a mesma proeminência em ambas as faces, para as espécies *A. bomplandii*, *A. jemanii*, *A. lindmaniarum* x *A. guianensis*, *Anthurium* sp. (IFT 123 e 258), *A. raimundii*, *A. plowmanii*, *A. andraeanum* cv. Astral e *A. andraeanum* cv. Rubi (Figuras 5A, B, C e D), ou pode ser mais proeminente na face abaxial (*A. gracile*, Figura 5G), ou pode ser mais proeminente na face adaxial (*A. affine* e *Anthurium* sp. (IFT 255), (Figuras 3E e F). Dentre as espécies, a que apresentou maior proeminência da nervura principal foi *A. affine* (Figura 5E), enquanto *A. bomplandii*, *Anthurium* sp. (IFT 123) e *A. andraeanum* cv. Astral apresentaram menor proeminência da nervura principal (Figuras 3A, D e L, respectivamente). Estes resultados estão de acordo com as afirmações de Keating (2003) de que a nervura principal tem forma variável, podendo ser simétrica, arredondada ou com formato deltoide em ambas as superfícies; achatada ou largamente côncava, adaxialmente e convexa arredondada, abaxialmente.

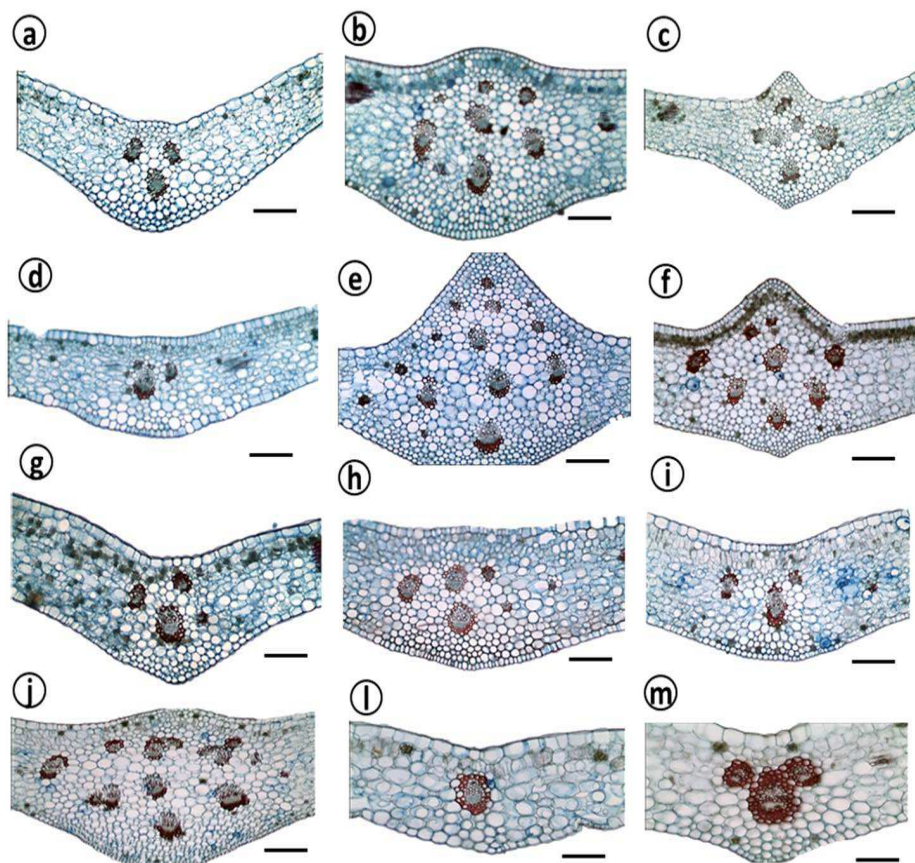


Figura 5 Fotomicrografias de seções transversais de folhas de genótipos de *Anthurium*. a) IFT 108, b) IFT 117, c) IFT 128, d) IFT 123, e) IFT 129, f) IFT 255, g) IFT 107, h) IFT 258, i) IFT 109, j) IFT 118, l) IAC cv. Astral e m) IAC cv. Rubi. Barra = 5 mm (Lavras, 2013)

O mesofilo é uniforme, não apresentando diferenciação entre os parênquimas paliçádico e esponjoso. As células do mesofilo apresentam disposição compacta em *A. lindmaniarum* x *A. guianensis* (Figura 6C), *Anthurium* sp. (IFT 255), *A. plowmanii*, *A. andraeanum* cv. Astral e cv. Rubi, com exceção de *A. bomplandii*, *A. jemanii*, *Anthurium* sp. (IFT 123) (Figura 5D), *A. affine*, *A.*

gracile, *Anthurium* sp. (IFT 258) e *A. raimundii*, nas quais podem ser encontrados espaços intercelulares.

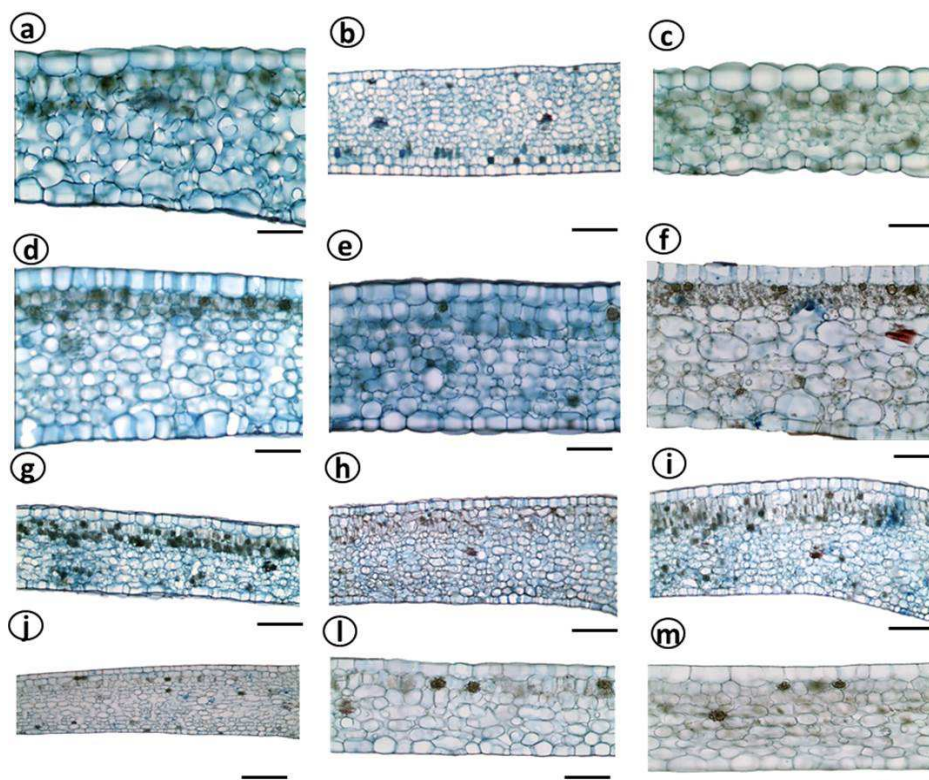


Figura 6 Eletromicrografias de secções transversais de folhas de genótipos de *Anthurium* sp. a) IFT 108, b) IFT 117, c) IFT 128, d) IFT 123, e) IFT 129, f) IFT 255, g) IFT 107, h) IFT 258, i) IFT 109, j) IFT 118, l) IAC cv. Astral e m) IAC cv. Rubi. Barra = 5 mm (Lavras, 2013)

Todas as espécies apresentaram cera do tipo epicuticular depositadas na superfície da cutícula e em formas diferenciadas. A cera pode apresentar, dentre outros, formatos de escamas (*Anthurium* spp. – IFT 258), capa contínua (*A. raimundii*) ou, como na maioria, em forma de grânulos (*A. jemanii*, *A. lindmanianum* x *A. guianensis* e todas as outras estudadas) (Figura 7). A forma

que a cera adquire ao se depositar na superfície dos órgãos é peculiar a cada espécie. A cera também funciona como barreira contra fungos, bactérias e insetos (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2012).

O híbrido *A. lindmanianum* x *A. guianensis* apresenta menor quantidade de cera na superfície epidérmica, concentrando o depósito de cera nos estômatos (Figura 7B). Isso pode ter ocorrido pela ausência de cutícula nessa espécie.

As espécies analisadas neste trabalho apresentam cutícula lisa em ambas as faces. Resultados similares foram obtidos por Mantovani, Filartiga e Coelho (2010), que constataram que a cutícula sem ornamentações é um caráter frequente na família Araceae.

A cera que se encontra na parte externa da cutícula é um polímero complexo, heterogêneo, resultante da interação de longas cadeias de ácidos graxos, álcoois alifáticos e alcanos, em presença de oxigênio. Os *Anthurium* apresentam cera epicuticular que pode ser depositada em uma variedade de formas físicas, como formando camadas finas, placas e cristais de diferentes tamanhos e formas que, segundo Alquini et al. (2003) e Appezzato-da-Glória e Carmello-Guerreiro (2012), é característica peculiar a cada espécie, podendo, assim, ser usada como caráter taxonômico na distinção de das espécies.

Devido à sua composição química, as ceras constituem uma película que atua como uma interface entre a célula vegetal e o meio, destacando-se como a principal barreira protetora contra a perda de água por transpiração excessiva, ação de patógenos, radiações solares e entrada de produtos químicos e contaminantes (FERREIRA et al., 2005).

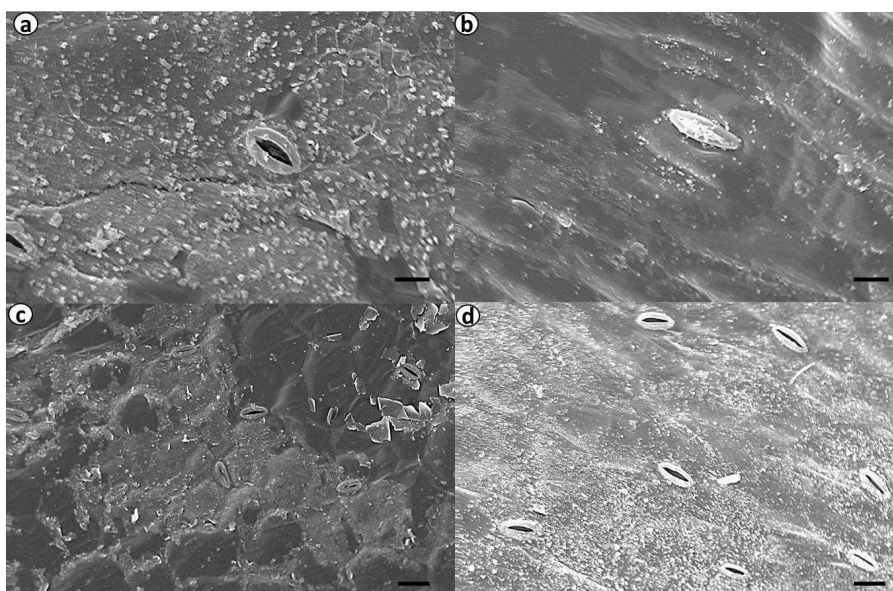


Figura 7 Eletromicrografias de varredura, da epiderme da face adaxial da folha de *Anthurium* spp., evidenciando os tipos de ceras. a) e b) Cera epicuticular em forma de grânulos em, *A. jemanii* e *A. lindmaniarum* x *A. guianensis*. Barra= 20 μm , c) Cera epicuticular em forma de escamas em *Anthurium* sp.- IFT258. d) Cera epicuticular em camada contínua em *A. raimundii*. Barra= 30 μm (Lavras, 2013)

Com relação à densidade estomática, os genótipos que apresentaram maior número de estômatos foram *A. jemanii* e *A. raimundii*, ao contrário do *A. gracile*, que apresentou menor densidade estomática. Para diâmetro polar e equatorial, *A. gracile* foi numericamente superior em ambos os diâmetros e, conseqüentemente, em sua relação. Os valores encontrados para densidade estomática foram aproximados entre os grupos, estando entre 5,71 e 17,07 estômatos/ mm^2 (Tabela 2). Neste estudo, *A. raimundii* e *A. jemanii* foram os que apresentaram estômatos maiores; já *A. gracile* apresentou estômatos menores. Geralmente, estômatos maiores são característicos de ambientes mesofíticos, propiciando um consumo maior de água (GALMES et al., 2007), enquanto

estômatos menores seriam encontrados em ambientes xéricos, propiciando um controle hídrico mais adequado (AASAMAA; SOBER; RRABI, 2001).

Na epiderme adaxial, *Anthurium* sp. (IFT 255) apresentou espessura epidérmica superior à das demais espécies, como também maior espessura do mesófilo (916,2 μm). Porém, para a epiderme abaxial, *A. lindmaninum* x *A. guianensis* e *Anthurium* sp. (IFT 123) foram os que apresentaram maior espessura. *Anthurium raimundii* e IFT 258 foram semelhantes em ambas as faces (adaxial e abaxial), apresentando os menores valores em espessura epidérmica. *Anthurium* sp. (IFT 258) apresentou a menor espessura em mesófilo, com 182,3 μm (Tabela 2).

Tabela 2 Caracteres anatômicos de folhas de *Anthurium* spp. Densidade estomática, diâmetro polar (DP), diâmetro equatorial (DE) dos estômatos e relação DP/DE, espessura dos tecidos foliares e presença (+) ou ausência(-) de estruturas (Lavras, 2013)

Genótipos	Nome científico	Lugar de coleta	Epiderme abaxial (µm)				Epiderme adaxial (µm)	Epiderme abaxial (µm)	Mesofilo (µm)	Presença de drusas	Estômatos epiderme adaxial
			Densidade estômatos (mm ²)	DP	DE	DP/DE					
IFT 108	<i>Anthurium bomplandii</i>	AM	7,47d*	43,84b	33,85a	1,29c	118,3b	105,0b	685,1b	+	-
IFT117	<i>Anthurium jemanii</i>	PA	15,27a	38,15d	33,48a	1,14c	45,7e	50,3c	508,5c	+	+
IFT 128	<i>A. lindmanianum</i> x <i>A. guianensis</i>	PA	10,80c	40,14c	29,92c	1,34b	118,6b	117,2a	484,5c	+	+
IFT 123	<i>Anthurium</i> sp.	PA	10,00c	33,53e	26,00c	1,28c	115,0c	128,8a	716,6b	+	-
IFT 129	<i>Anthurium affine</i>	PE	11,60b	38,30d	28,11c	1,36b	109,5c	112,0b	677,6b	+	+
IFT 255	<i>Anthurium</i> sp.	RJ	8,64d	38,45d	27,43c	1,40b	127,0a	100,0b	916,2a	+	-
IFT 107	<i>Anthurium gracile</i>	PB	5,71e	54,58a	34,59a	1,57a	45,1e	40,4c	359,0d	+	+
IFT 258	<i>Anthurium</i> sp.	ES	13,10b	41,78d	30,86b	1,36b	19,2f	16,0d	182,3f	+	-
IFT 109	<i>Anthurium raimundii</i>	BA	17,07a	39,96d	33,41a	1,19c	25,5f	21,2d	216,0e	+	-
IFT 118	<i>Anthurium plowmanii</i>	PA	12,71b	43,55b	34,20a	1,27c	43,3e	46,0c	523,2c	+	+
cv. Astral	<i>Anthurium andraeanum</i>	Cultivado	7,71d	38,17d	27,61c	1,38b	37,0e	36,3c	229,2e	+	-
cv. Rubi	<i>Anthurium andraeanum</i>	Cultivado	7,50d	34,35e	27,76c	1,23c	57,1d	48,6c	303,9d	+	-
CV%			22,22	9,61	10,68	13,41	16,25	24,47	14,43		

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5%

A análise de agrupamento aproximou as espécies *A. raimundii* e *A. affine*, *A. bomplandii* e *A. gracile*, como também aproximou *A. jemanii* e *A. plowmanii*, bem como isolou o híbrido (*A. lindmanianum* x *A. guianensis*), uma das poucas espécies que não contêm grande quantidade de cera em sua epiderme. O acesso ainda não identificado, como o IFT 258, se aproximou no agrupamento do ramo das espécies de *A. raimundii* e *A. affine*. Já os outros dois genótipos IFT 123 e 255 se aproximaram do ramo das espécies *A. bomplandii* e *A. gracile*. Esses dados podem confirmar que os genótipos não identificados pertencem à mesma secção destas espécies (Figura 8).

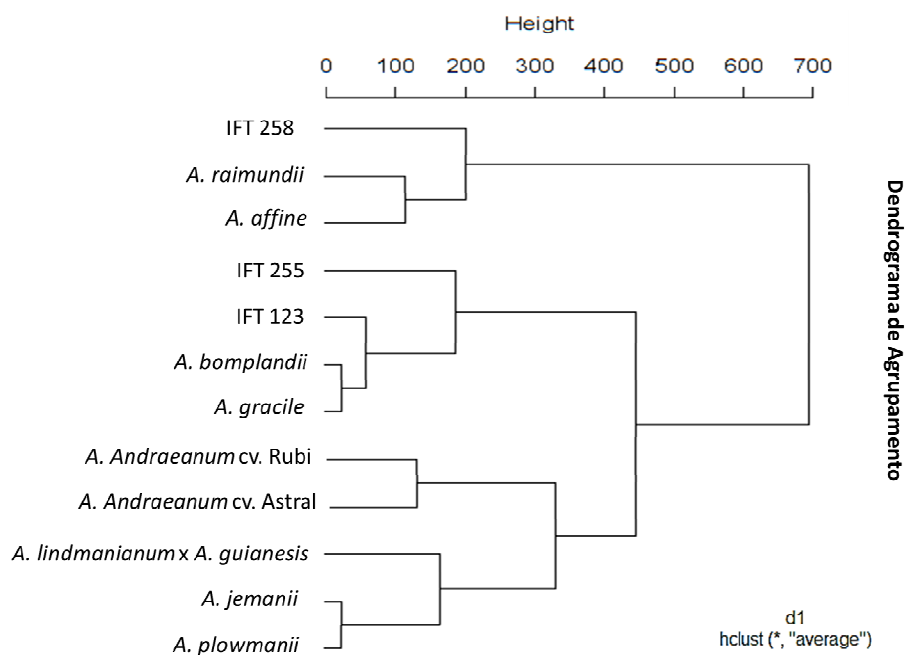


Figura 8 Dendrograma obtido pela análise de similaridade de caracteres anatômicos e conteúdo de DNA. Genótipos: 1 = IFT 108, 2 = IFT 117, 3 = IFT 128, 4 = IFT 123, 5 = IFT 129, 6 = IFT 255, 7 = IFT 107, 8 = IFT 258, 9 = IFT 109, 10 = IFT 118, 11 = IAC cv. Astral e 12 = IAC cv. Rubi. (Lavras, 2013)

Observou-se também que as espécies *A. adraeanum* representadas pelas cultivares Astral e Rubi se mantiveram próximas. Tais resultados reforçam o potencial anatômico e citométrico na aproximação e na distinção das espécies.

Os dados anatômicos e o conteúdo de DNA foram favoráveis à aproximação das espécies, como também na sua distinção, por meio da análise de agrupamento. Mantovani, Filartiga e Coelho (2010), utilizando análises de agrupamento de caracteres anatômicos de folha e espata, reforçaram a aproximação no diagnóstico de espécies de *Anthurium*.

4 CONCLUSÕES

Todas as espécies estudadas apresentam caracteres anatômicos comuns ao gênero *Anthurium*.

Por meio do estudo anatômico, verificou-se a aproximação das espécies *A. andraeanum* (cv. Astral e Rubi), como também distinguiu o híbrido (*A. lindmanianum* x *A. guianensis*) e *A. bomplandii* das demais espécies, com características anatômicas peculiares a cada espécie.

A variação no conteúdo de DNA, por citometria de fluxo, permitiu estabelecer uma diferenciação entre as espécies *A. andraeanum*, *A. affine*, *A. bomplandii*, *A. gracile* e o híbrido (*A. lidimanianum* x *A. guianensis*), como também aproximou o grupo *A. raimundii*, *plowmanii* e *jemanii* do *Anthurium* sp. (IFT 258), em todas as análises.

A análise de agrupamento possibilitou a aproximação das espécies *A. raimundii* e *A. affine*, *A. bomplandii* e *A. gracile*, *A. jemani* e *A. plowmanii*, e as cultivares Astral e Rubi (*A. andraeanum*), e isolou o híbrido (*A. lidimanianum* x *A. guianensis*).

REFERÊNCIAS

AASAMAA, K.; SOBER, A.; RRABI, M. Leaf anatomical characteristics associated with shoot hydraulic conductance, stomatal conductance and stomatal sensitivity to changes of leaf water status in temperate deciduous trees. **Australian Journal of Plant Physiology**, Davis, v. 28, p. 765-774, 2001.

ALQUINI, Y. C. et al. Epiderme. In: APPEZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2003. p. 1-438.

BLISS, B. J.; SUZUKI, J. Y. Genome size in *Anthurium* evaluated in the context of karyotypes and phenotypes. **AoB PLANTS**, Oxford, 2012.

CHEN, C. et al. Induction of *Anthurium andraeanum* “Arizona” tetraploid by colchicine in vitro. **Euphytica**, Wageningen, v. 181, p. 137-145, 2011.

COELHO, M. A. N. Araceae do estado de São Paulo. In: MAMEDE, M. C. H. et al. **Livro vermelho das espécies vegetais ameaçadas do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2007. p. 53-56.

COELHO, M. A. N.; LEONI, L. S. Duas espécies novas de *Anthurium* Schott (Araceae) para o Brasil. **Pabstia**, Campus, v. 15, n. 2, p. 1-9, 2004.

DICKINSON, B. **Cell quest software**: reference manual. San Jose: Becton Dickinson Immunocytometry Systems, 1998. 227 p.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA Flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, 2005.

DOLEZEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biol Plantarum**, Prague, v. 31, n. 2, p. 113-120, Mar. 1989.

FERREIRA, E. A. et al. Composição química da cera epicuticular e caracterização da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, Campinas, v. 23, p. 611-619, 2005.

FRANCESCHI, V. Calcium oxalate in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, p. 361-427, 2001.

GALMES, J. et al. Water relations and stomatal characteristics of Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits: responses to water stress and recovery. **Plant Soil**, Bethlehem, v. 290, p. 139-155, 2007.

GONÇALVES, E. G.; SALVIANI, E. R. Two new Andean genera for the tribe *Spathicarpeae* (Araceae). **Willdenowia**, Berlin, v. 35, p. 319-326, 2005.

KEATING, R. C. **Anatomy of the monocotyledons: IX Araceae and Acoraceae**. New York: Oxford University, 2002.

KEATING, R. C. Leaf anatomic characters and their value in understanding morphoclines in the Araceae. **The Botanical Review**, Cham, v. 68, n. 4, p. 510-523, 2003.

KEATING, R. C. Vegetative anatomical data and its relationship to a revised classification of the genera of Araceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 91, n. 3, p. 485-494, 2004.

LORENZO, N.; MANTUANO, D. G.; MANTOVANI, A. Comparative leaf ecophysiology and anatomy of seedlings, young and adult individuals of the epiphytic aroid *Anthurium scandens* (Aubl.) Engl. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 68, p. 314-322, 2010.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 77, p. 18-29, 2004.

LUCAS, P. W. et al. Mechanical defenses to herbivory. **Annals of Botany**, London, v. 86, p. 913-920, 2000.

MANTOVANI, A.; FILARTIGA, L. D. P.; COELHO, M. A. N. Anatomia comparada da folha e espata de espécies de *Anthurium* (Araceae) ocorrentes na Mata Atlântica **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 185-200, jan./ mar. 2010.

MANTOVANI, A.; PEREIRA, T. E. Comparative anatomy of leaf and spathe of nine species of *Anthurium* (section urospadix; subsection flavescentiviridia) (araceae) and their diagnostic potential for taxonomy. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 88, p. 145-160, 2005.

NGUYEN, X. D. et al. Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 275, n. 1/2, p. 57-68, 2003.

NILSON, S. E.; ASSMANN, S. M. The control of transpiration. Insights from Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 143, p. 19-27, 2007.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 22 jan. 2012.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, set./out. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782001000500028&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 23 jan. 2012.

TILLICH, H. J. Seedling diversity in Araceae and its systematic implications. **Feddes Repertorium**, Weinheim, v. 114, p. 454-487, 2003.

TROTTER, J. **WinMDI**©: version 2.8. La Jolla: The Scripps Research Institute, 2000. Disponível em: <<http://facs.scripps.edu/software.html>>. Acesso em: 14 nov. 2012.

VIÉGAS, J. et al. Taxonomic and cytogenetic analysis of species of the *Anthurium* (Araceae) Genus native to the Brazilian Atlantic Forest. In: TEIXEIRA DA SILVA, J. A. (Org.). **Floriculture, ornamental and plant biotechnology**: advances and topical issues. London: Global Science Books, 2006. v. 4, p. 669-677.

VOLK, G. et al. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 41, p. 34-45, 2002.

XIANG, H.; CHEN, J. Interspecific variation of plant traits associated with resistance to herbivory among four species of *Ficus* (Moraceae). **Annals of Botany**, London, v. 94, p. 377-384, 2004.

CAPÍTULO 3

Silício no crescimento *in vitro* de antúrio cv. Rubi

RESUMO

As características ornamentais agregam valor ao estudo do gênero *Anthurium*, pois consistem de materiais de importância para a produção e a comercialização. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes fontes de silício durante o desenvolvimento *in vitro* de *Anthurium andraeanum* cv. Rubi. Foram utilizados segmentos nodais de plântulas já estabelecidos *in vitro* e inoculados em meio Pierik adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 1,8 g L⁻¹ de PhytigelTM. Três fontes de silicato foram adicionadas ao meio Pierik: silicato de sódio (Na₂SiO₃), silicato de potássio (K₂SiO₃) e silicato de cálcio (CaSiO₃), nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ e o meio (sem adição de silicato) como testemunha. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quinze repetições. Os segmentos foram mantidos, por 100 dias, em sala de crescimento, sob condições controladas. Foram avaliadas as características fitotécnicas, fisiológicas, concentração de silício e microanálise de raios X. Devido à anormalidade das plântulas nas fontes de silicato de cálcio e potássio, utilizaram-se apenas os dados das plântulas obtidas pela fonte de silicato de sódio, que apresentou 100% de plântulas normais. O uso de silicato de sódio no meio de cultura proporcionou maior teor de clorofila. Plântulas de antúrio apresentaram melhor desenvolvimento (número de folhas, massa seca da parte aérea e comprimento da parte aérea) entre as concentrações de 0,5 e 2,0 mg L⁻¹ de silicato de sódio. Para o número de raízes, verificou-se significância para as concentrações de 0,5 mg L⁻¹ de silicato de sódio. A fonte de silício e a concentração devem ser consideradas para evitar anomalias nas plântulas produzidas *in vitro*. O uso de silicato de sódio promoveu o aumento de massa seca em plântulas de antúrio. Maior teor de clorofila é obtido quando as plântulas de antúrio são cultivadas em meio PIERIK suplementado com silicato de sódio. O uso de silicato de sódio no meio de cultura proporcionou melhor qualidade de plântulas de *Anthurium andraeanum* cv. Rubi a a disponibilidade de silício no meio de cultura foi proporcional à sua absorção pelas plântulas.

Palavras-chave: Antúrio. Micropropagação. Silicato de sódio.

ABSTRACT

The ornamental features add value to the study of the genus *Anthurium*, because they consist of materials of importance to production and marketing. This work was carried out to evaluate the effect of different sources of silicon during *in vitro* development of *Anthurium andraeanum* cv. Rubi. Nodal segments of seedlings established *in vitro* and inoculated in Pierik added 30 g L⁻¹ sucrose and solidified with 1.8 g L⁻¹ PhytigelTM. Three sources of silicate were added to the medium Pierik, sodium silicate (Na₂SiO₃), potassium silicate (K₂SiO₃) and calcium silicate (CaSiO₃) at concentrations (0.5, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹) and medium (without addition of silicate) as control. The experimental design was completely randomized, with fifteen repetitions. The segments were kept for 100 days in a growth chamber under controlled conditions. Characteristics were evaluated phytotechnical, physiological concentration of silicon and X-ray microanalysis. Due to the abnormality in the seedling sources of calcium and potassium silicate, using only data obtained by the seedling source of sodium silicate which showed 100% of normal seedlings. The use of sodium silicate in the culture medium showed higher chlorophyll content. *Anthurium* seedlings showed better growth (number of leaves, dry weight of shoots and shoot length) between concentrations of 0.5 and 2.0 mg L⁻¹ sodium silicate. For the number of roots, significance was found for concentrations of 0.5 mg L⁻¹ sodium silicate. The source and the concentration of silicon must be considered to avoid the defects produced in vitro plantlets. The use of waterglass promoted the increase in seedling dry weight of anthurium. Higher chlorophyll is obtained when the seedlings are cultivated in anthurium Pierik supplemented with sodium silicate. The use of sodium silicate in the culture medium yielded better quality of *Anthurium andraeanum* seedlings cv. Rubi. The availability of silicon in the culture medium is proportional to its absorption by *Andraeanum anthurium* seedlings cv. Rubi.

Keywords: *Anthurium*. Micropropagation. Sodium silicate.

1 INTRODUÇÃO

O antúrio é consensualmente apontado como um dos produtos de maior potencial de negócios, nos mercados interno e externo, na atualidade. Contribuem para isso não apenas sua beleza natural, a coloração e o exotismo de suas flores, mas também sua elevada durabilidade e resistência ao manuseio de pós-colheita (JUNQUEIRA; PEETZ, 2012).

Vários trabalhos têm sido conduzidos com cultura de tecidos em antúrio, visando à avaliação do seu potencial morfogênético na obtenção de mudas. De forma geral, o fator mais importante tem sido a especificidade da cultivar, resultando na necessidade do desenvolvimento de protocolos exclusivos para cada genótipo. Devem ser levados em conta o tipo e a idade do explante a ser utilizado (GANTAIT; MANDAL, 2010).

Puchoa (2005) ressalta que, de forma geral, os pesquisadores que trabalham com cultura de tecidos têm constatado uma grande variação nas respostas obtidas *in vitro* em relação aos diferentes genótipos estudados de antúrio. Conseqüentemente, os ajustes no meio de cultura são essenciais para a obtenção de plantas vigorosas e de qualidade comercial.

Os elementos minerais que estimulam o crescimento, mas não são essenciais, ou que são essenciais apenas para algumas espécies de plantas, ou sob condições específicas, são considerados elementos benéficos (FURLANI, 2004). São importantes no crescimento e no desenvolvimento normal de algumas plantas, mas sua ausência não é considerada um fator limitante. Dentre os elementos considerados benéficos, pode-se destacar o silício (KORNDÖRFER, 2006).

Apesar de o silício não ser considerado um elemento essencial, os benefícios da utilização desse elemento na agricultura vêm sendo cada vez mais reconhecidos e comprovados por cientistas do mundo inteiro. Dessa forma, o

uso de silicatos na agricultura, além dos efeitos diretos na produtividade, pode contribuir de maneira significativa para a potencialização e, conseqüentemente, a redução no uso de defensivos (REIS et al., 2008). A sua função estrutural na parede celular pode elevar os conteúdos de hemicelulose e lignina, aumentando a rigidez da célula (CAMARGO; KORNDÖRFER; PEREIRA, 2007).

Os estudos sobre o efeito do silício (Si) *in vitro* no segmento da floricultura ainda são bastante restritos. Os mais recentes trabalhos com Si na área de floricultura são com pós-colheita e produção, como, por exemplo, com copo-de-leite (ALMEIDA et al., 2009), rosa (LOCARNO; FOCHI; PAIVA, 2011), gérbera (GUERRERO; FERNANDES; LUDWIG, 2012), crisântemo (CARVALHO-ZANÃO et al., 2012; SIVANESAN et al., 2013) e girassol ornamental (CARVALHO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013). Os únicos trabalhos com Si *in vitro* são com orquídeas (SOARES et al., 2011, 2012).

Dada a grande variedade de plantas ornamentais cultivadas comercialmente, relativamente poucas espécies foram avaliadas quanto ao seu potencial de absorção de silício (FRANTS et al., 2010).

Considerando os benefícios observados para outras espécies, é necessário avaliar o efeito do silício no desenvolvimento das plantas produzidas *in vitro*, principalmente para espécies que apresentam importância comercial, como o antúrio. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o uso de silício no crescimento *in vitro*, bem como avaliar as características morfofisiológicas e as concentrações de silício nas folhas de plantas de *Anthurium andraeanum* cv. Rubi submetidas a diferentes fontes e teores de silício.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais.

Segmentos nodais de plântulas de antúrio estabelecidos *in vitro* foram inoculados em meio Pierik (PIERIK, 1976), adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 1,8 g L⁻¹ de PhytigelTM. Três fontes de silicato foram adicionadas ao meio de cultura, silicato de sódio (Na₂SiO₃), silicato de potássio (K₂SiO₃) e silicato de cálcio (CaSiO₃), nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹, sendo 15 repetições (2 segmentos/frasco) por tratamento. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e, em seguida, autoclavado, a 121 °C e 1,2 atm, durante 20 minutos.

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, segmentos nodais contendo uma gema foram inoculados em frascos de 400 mL, contendo 50 mL do meio de cultura com os respectivos tratamentos. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2 °C, com intensidade luminosa de 52,5W m⁻² s⁻¹.

Após 100 dias, foram avaliados os parâmetros descritos a seguir.

Características fitotécnicas – foram avaliadas visualmente todas as plântulas do experimento, quanto ao aspecto, se normais e anormais, além do número de folhas, número de raízes, comprimento de parte aérea (cm), massa fresca e seca de parte aérea (g), comprimento de raiz (cm) e massa fresca e seca de raiz (g). A massa seca do material vegetal foi realizada após secagem em estufa, a 60 °C, por 72 horas, até peso constante.

Características fisiológicas – realizada no Laboratório de Produtos Vegetais, no Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA. Teores de clorofila a, b e total foram quantificados segundo a metodologia de Arnon

(1949). Foram coletadas folhas de 10 plantas de cada tratamento e 0,1 g dos tecidos foliares foi macerado em nitrogênio líquido e colocado em acetona 80%. Em seguida, o material foi centrifugado, a 8.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado para a determinação em espectrofotômetro (663 nm e 645 nm) dos conteúdos de pigmentos.

Concentração de silício – análise realizada no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, no Departamento de Ciências do Solo da UFLA. Foram coletadas folhas de 12 plantas, que foram secas em estufa ventilada, a 60 °C, por 72 horas, até peso constante e moído separadamente. A determinação de silício foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Gallo e Furlani (1978).

Microanálise de raios X – realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica no Departamento de Fitopatologia da UFLA. Amostras do terço mediano de 2 folhas em 3 plantas foram fixadas em Karnovsky (1965), desidratadas em soluções crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo, então, submetidas à secagem ao ponto crítico, utilizando-se CO₂ como líquido de transição. Posteriormente, foram recobertas com carbono CED 020 Baltec e analisadas, ao microscópio eletrônico de varredura LEO-EVO, seguindo o protocolo de Alves (2004).

Delineamento experimental e análises estatísticas - o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 12 tratamentos, consistindo de 15 frascos, cada frasco contendo 2 explantes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011), sendo realizada regressão nos dados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram consideradas plantas normais aquelas cujo aspecto visual não proporcionava potencial para ornamentação e/ou valor comercial, especialmente enrolamento de folha e pecíolo (Figura 1). De acordo com os dados da Tabela 1, a maior porcentagem de plântulas normais foi observada nos tratamentos com silicato de sódio. Os tratamentos com silicato de cálcio e potássio apresentaram plântulas anormais. Recentemente, resultados semelhantes a estes foram observados em *arabidopsis* (MOONTPETIT et al., 2012) e em crisântemo (SIVANESAN et al., 2013), os quais mostraram que a absorção de Si causou necrose nas folhas e nanismo nas plantas.

Altas dosagens desses silicatos têm função fitotóxica dentro da planta, como observado por Sousa et al. (2010). Provavelmente, isso pode ter ocorrido devido ao fato de que todo nutriente em excesso provoca desbalanço nutricional, causado por sua maior concentração na planta ou por interações com outros elementos, provocando deficiência ou acúmulo excessivo (MALAVOLTA, 2006).

Levando-se em consideração os altos índices de anormalidade das plântulas nas fontes de silicato de cálcio e potássio, optou-se por utilizar apenas os dados das plântulas obtidas na fonte de silicato de sódio, que apresentou 100% de plântulas normais (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1 Porcentagem de plântulas normais e anormais de *Anthurium andraeanum* cv. Rubi, aos 100 dias (Lavras, 2013)

Fonte (Si)	Concentração (mg L ⁻¹)	Normais (%)	Anormais (%)
Testemunha	0,0	100	-
Silicato de sódio (Na ₂ SiO ₃)	0,5	100	-
	1,0	100	-
	2,0	100	-
Silicato de cálcio (Ca ₂ SiO ₃)	0,5	78,57	21,43
	1,0	48,57	51,43
	2,0	42,86	57,14
Silicato de potássio (K ₂ SiO ₃)	0,5	50	50
	1,0	14,29	85,71
	2,0	42,86	57,14

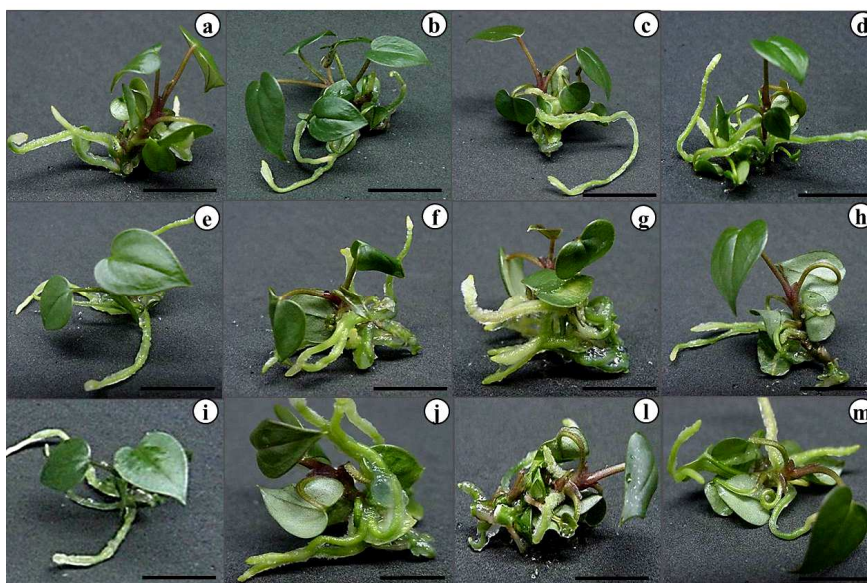


Figura 1 Fotos de *Anthurium andraeanum* cv. Rubi, aos 100 dias. Silicato de sódio: a) testemunha; b) 0,5 mg L⁻¹; c) 1,0 mg L⁻¹; d) 2,0 mg L⁻¹. Silicato de cálcio: e) testemunha; f) 0,5 mg L⁻¹; g) 1,0 mg L⁻¹; h) 2,0 mg L⁻¹. silicato de potássio: i) testemunha; j) 0,5 mg L⁻¹; l) 1,0 mg L⁻¹; m) 2,0 mg L⁻¹. Barra = 1 cm (Lavras, 2013)

As concentrações de silicato aplicadas ao meio de cultura Pierik influenciaram o crescimento e o desenvolvimento de plântulas de antúrio *in vitro*. Como se observa no Gráfico 1, houve efeito significativo apenas para as variáveis fitotécnicas número de folhas, comprimento da parte aérea, número de raízes e massa seca da parte aérea.

Com o incremento nas concentrações de silicato de sódio, verificou-se aumento na forma quadrática. O ponto máximo na função indica que ocorreu maior produção na concentração de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$, quando, então, ocorreu decréscimo acentuado no número de folhas com o aumento da concentração de silicato de sódio. Resultados semelhantes também foram observados por Braga et al. (2009), trabalhando com morangueiros *in vitro*. Diferentemente dos resultados deste trabalho, Pasqual et al. (2011), trabalhando com orquídeas *in vitro*, verificaram maior número de folhas na utilização de silicato de cálcio. Por outro lado, Asmar et al. (2011), trabalhando com bananeira *in vitro* e Oliveira et al. (2013), com girassol ornamental, não constataram diferença no número de folhas, quando da aplicação de silício ao meio de cultura.

Essas diferenças nos resultados, segundo Braga et al. (2009), podem ser explicadas pelo fato de o crescimento de plantas, órgãos, tecidos e células *in vitro* dependerem do desenvolvimento de meios de cultura otimizados para cada espécie e pela perfeita interação de componentes essenciais, como interação entre Si e Na, por exemplo.

Com o aumento na concentração de silicato de sódio ocorreu um aumento linear no comprimento da parte aérea das plântulas de antúrio, registrando-se, na concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, o comprimento máximo de 1,82 cm (Gráfico 1). Nessa mesma concentração, Pasqual et al. (2011) obtiveram o maior comprimento da parte aérea para orquídeas *in vitro*, utilizando $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de cálcio. Para Asmar et al. (2011), a utilização de silicato de sódio

proporcionou a melhor resposta em comprimento de parte aérea no desenvolvimento de bananeira *in vitro*.

A produção de massa seca da parte aérea mostrou aumento quadrático na medida em que houve o incremento da concentração de silicato de sódio. A produção máxima foi atingida na concentração de $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de sódio (Gráfico 1). De forma semelhante, Almeida et al. (2009) e Sivanesan et al. (2013) constaram que diferentes doses de silício proporcionaram aumento na massa seca em partes aéreas de plantas de copo-de-leite e crisântemo. Asmar et al. (2011), trabalhando com bananeira *in vitro*, obtiveram maior massa seca da parte aérea quando utilizaram silicato de sódio no meio de cultura. Dessa forma, pode-se concluir que plântulas de antúrio acumulam mais reservas na parte aérea com a utilização de silicato de sódio.

A absorção do silício (como ácido silícico) é um processo ativo, isto é, exige gasto de energia, mesmo quando as raízes estão em presença de altas concentrações do elemento. O sódio exerce funções na fotofosforilação, que é um processo de síntese de ATP a partir de $\text{ADP} + \text{fosfato}$ via ATP sintases da membrana do tilacoide, nos cloroplastos das células vegetais. O Na em baixas concentrações participou da síntese de energia para que o Si fosse absorvido e proporcionasse às plantas de antúrio influência sobre número de folhas, comprimento da parte aérea, número de raízes e massa seca da parte aérea.

Maior número de raízes foi verificado nas concentrações de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de sódio, com um comportamento quadrático até essa concentração, seguido de um decréscimo acentuado (Gráfico 1). Resultados semelhantes foram observados por Soares et al. (2008), quando trabalharam com silicato de sódio na aclimatização de orquídeas.

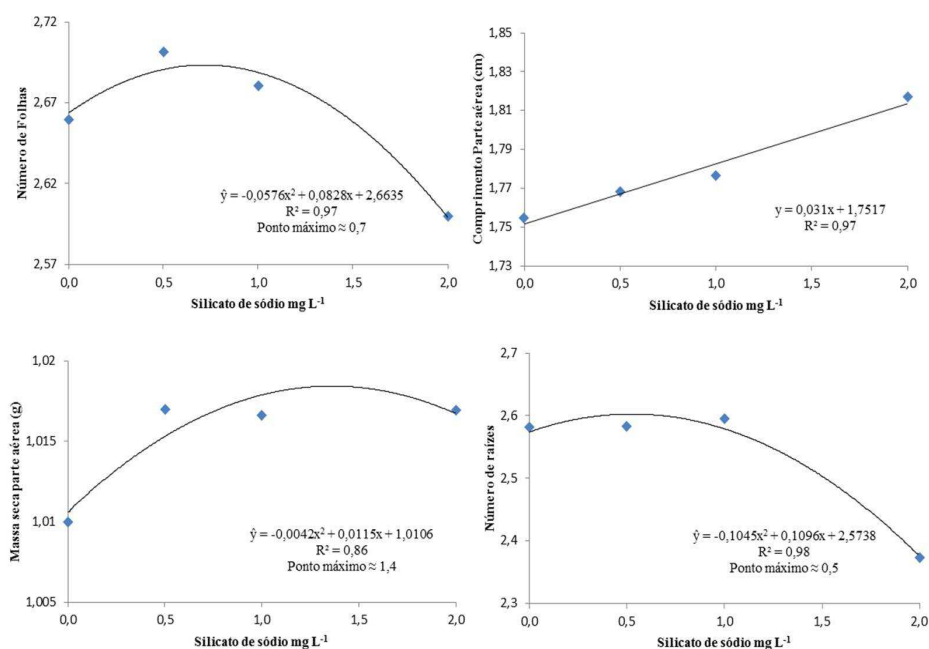


Gráfico 1 Características fitotécnicas em plântulas de *Anthurium andraeanum* cv. Rubi, aos 100 dias de cultivo, com diferentes concentrações de silicato de sódio (Lavras, 2013).

Observa-se, no Gráfico 2, que há tendência de aumento nos teores de clorofila a, b e total, na medida em que se eleva a concentração de silicato de sódio e o melhor resultado foi obtido com 2,0 mg L⁻¹. A maior relação clorofila a e b foi observada na testemunha, ou seja, no meio de cultura sem adição de silício.

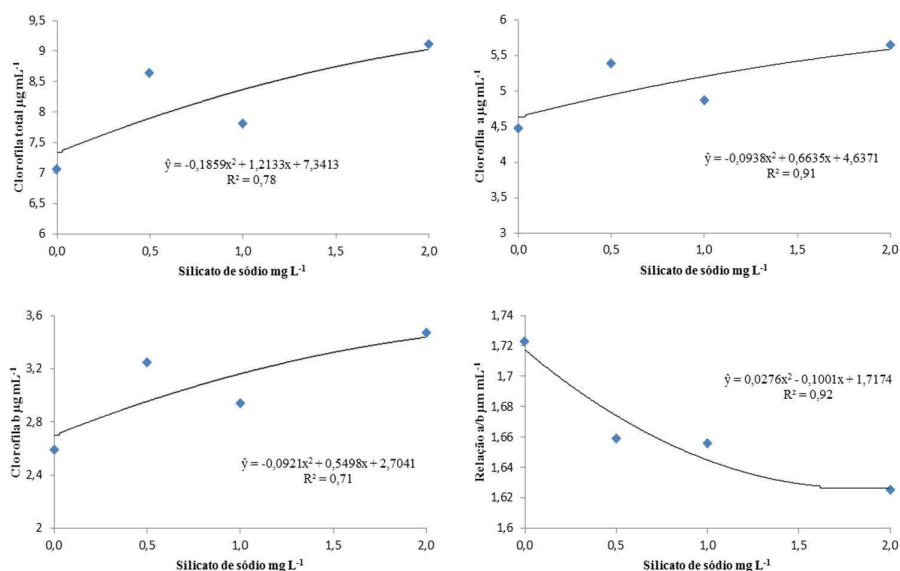


Gráfico 2 Teores de clorofila a, b, total e relação a/b em folhas de plântulas *Anthurium andraeanum* cv. Rubi cultivadas *in vitro*, por 100 dias, em meio de cultura contendo silicato de sódio (Lavras, 2013)

Os resultados obtidos neste estudo mostram a efetividade do uso de silício em antúrios sobre o teor de clorofila e corroboram dados de pesquisas realizadas por Gong et al. (2005), Locarno, Fochi e Paiva (2011), Sivanesam et al. (2013) e Sousa et al. (2010). Isso ocorre em razão de o silício estar associado à manutenção da fotossíntese, à proteção da distribuição de clorofila e à preservação da deterioração estrutural e funcional das membranas celulares (AGARIE; AGATA; KAUFMAN, 1998).

Aumento do teor de clorofila pelo fornecimento de Si às plantas também foi observado por Al-aghaby, Zhujun e Qinhua (2005), em tomateiro. Possivelmente, este comportamento está associado ao fato de o Si ser acumulado nas células epidérmicas da parte aérea das plantas, melhorando o ângulo de abertura das folhas, tornando-as mais eretas, diminuindo o autossombreamento e

favorecendo o melhor aproveitamento da luz, no momento da aclimatização das plantas de antúrio.

Os teores de silício nas folhas de antúrio foram influenciados significativamente pelas concentrações utilizadas de silicato de sódio. Observa-se, no Gráfico 3, que ocorreu incremento da concentração deste nutriente nas folhas das plântulas de antúrio, nas doses mais elevadas de silicato. Maior concentração foi em 1,5 mg L⁻¹ de silicato de sódio, verificando-se um acréscimo quadrático. Resultados semelhantes foram observados por Almeida et al. (2009), quando trabalharam com copo-de-leite.

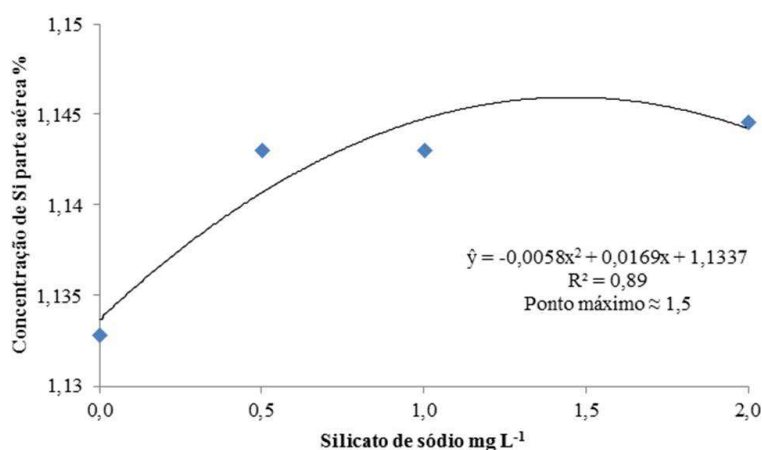


Gráfico 3 Concentração de silício na parte aérea de *Anthurium andraeanum* cv. Rubi cultivada *in vitro*, por 100 dias. (Lavras, 2013)

A presença de silício na testemunha pode ser explicada pelo fato de o silício ser um elemento abundante na natureza, estando presente em toda parte, inclusive na água (LUZ et al., 2006). O Si identificado nos tratamentos que não receberam silicato de sódio, provavelmente, foi originário da água utilizada na condução do experimento, na qual, embora fosse deionizada, algumas formas neutras de Si presentes não podem ser totalmente eliminadas. No entanto,

ressalta-se que esse Si foi absorvido em quantidades irrelevantes, quando comparado aos tratamentos que receberam silicato de sódio.

Na microanálise de raios X (MAX) foi detectada diferença na parte abaxial das folhas tratadas com silicato de sódio (Tabela 2). A detecção do elemento Si foi observada em todos os tratamentos, inclusive a testemunha. Os dados confirmam a análise química das folhas, na qual também se constatou o elemento silício em todos os tratamentos analisados.

Tabela 2 Microanálise de raios X, na discriminação do elemento silício (Si) analisado em folhas com diferentes concentrações de silicato de sódio (Lavras, 2013)

Fonte (Si)	Concentração (mg L⁻¹)	Detectabilidade do Si (%)
Testemunha	0,0	1,01
Silicato de sódio (Na ₂ SiO ₃)	0,5	1,16
	1,0	1,21
	2,0	1,50

A absorção do Si presente no meio de cultura foi confirmada pela localização do elemento (Si) nas folhas de *A. andraeanum* cv. Rubi, por meio do mapeamento. Verificou-se a distribuição evolutiva relacionada diretamente à concentração aplicada no meio de cultura (Figura 2B, C e D). A presença de silício na testemunha também foi detectada no mapeamento na parte abaxial da folha (Figura 2A).

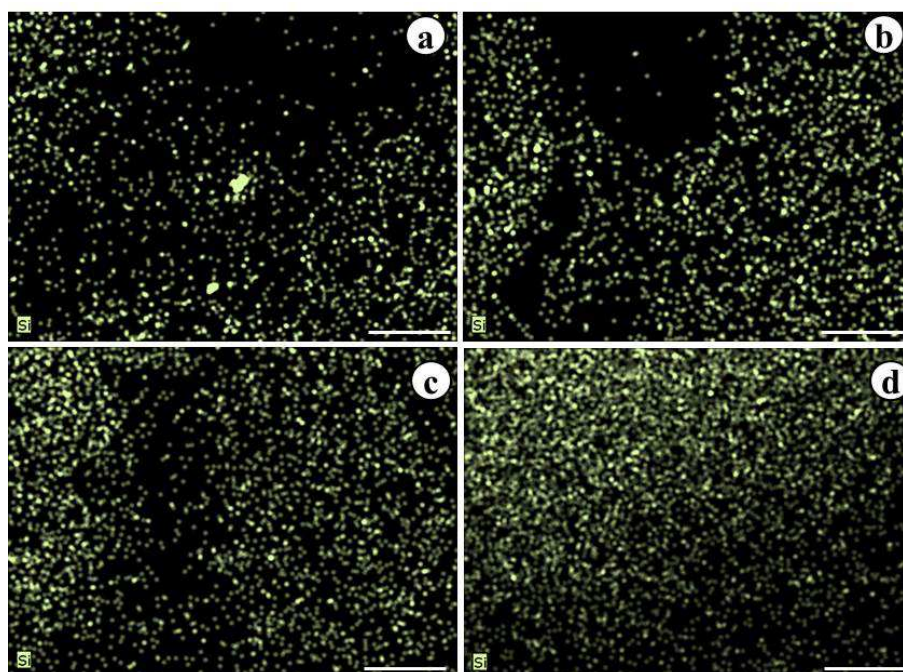


Figura 2 Mapeamento para Si da epiderme abaxial de folhas de plântulas *Anthurium andraeanum* cv. Rubi cultivada *in vitro*, por 100 dias, mostrando uma evolução da presença e da distribuição do elemento. Silicato de sódio: a) Testemunha; b) 0,5 mg L⁻¹; c) 1,0 mg L⁻¹; d) 2,0 mg L⁻¹. Barra = 20µm. (Lavras, 2013)

A polimerização de silício na superfície inferior da folha, processo denominado silicificação, é comum em gramíneas (LUX et al., 2002) e pode ocorrer em dicotiledôneas, como o cafeeiro (POZZA et al., 2004). Até então, não havia relatos na literatura sobre a deposição de Si em antúrio. Foi observado, por meio do MAX, que o Si encontra-se posicionado principalmente na epiderme, pois, quando analisada em corte transversal da folha, a quantidade foi inferior até mesmo na testemunha.

Além do Si, as amostras com 0,5 mg L⁻¹ de silicato de sódio (Figura 3), apresentaram maior quantidade de fósforo e enxofre, o que não foi verificado

nos outros tratamentos e nem na testemunha. A maior quantidade desses elementos pode estar associada à resistência e ao balanço nutricional.

Segundo Taiz e Zeiger (2009), espécies C3 beneficiam-se, igualmente, de uma exposição a baixos níveis de íons sódio, estimulando o crescimento, além de poder, em parte, substituir o potássio como um soluto osmoticamente ativo.

Resultados semelhantes foram observados por Miranda et al. (2002), em que a interação entre silício e sódio influenciou os teores de P, Ca e K em plantas de moringa (*Moringa oleifera*) e os teores de S sofreram influência na presença de Si. Os autores atribuíram o aumento da absorção desses nutrientes à maior seletividade da membrana promovida pelo Si.

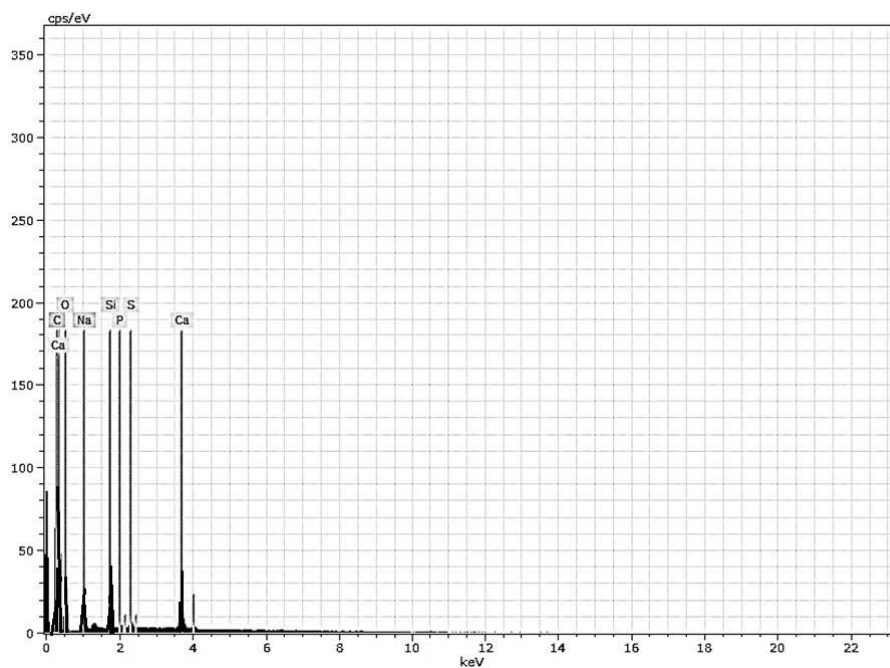


Figura 3 Microanálise de raios X da superfície inferior de folhas de plântulas *Anthurium andraeanum* cv. Rubi cultivada *in vitro*, por 100 dias. Presença de Si no tratamento com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ silicato de sódio. Escala dos gráficos: Total na vertical 350 cps (capturas por segundo). (Lavras, 2013)

Sivanesan et al. (2013) relatam que a aplicação de Si em crisântemos aumentou a concentração de P na cultivar Gaya Pink e diminuiu nas cultivares Lemmon Tree e White Angel. Os autores relataram também a redução na concentração de B, Cu, Fe e Mn no tecido foliar e concluíram que o Si pode diminuir a toxicidade por esses elementos. Resultado semelhante foi observado por Inal et al. (2009), trabalhando com cevada. Faquin (2005) relata que o macronutriente S destaca-se pela função na produção de proteínas e aminoácidos, que são essenciais ao desenvolvimento da planta.

Apesar de os antúrios serem monocotiledôneas, são classificados como plantas não acumuladoras, resultado também observado por Almeida et al. (2009), trabalhando com silício na nutrição mineral de copo-de-leite. Assim, plântulas de antúrio não têm capacidade de acumular o silício na parte aérea em alta concentração, mas podem se beneficiar desse elemento, mesmo em pequenas quantidades.

4 CONCLUSÕES

A fonte de silício e a concentração têm que ser considerada para evitar anomalias nas plântulas de antúrio cv. Rubi produzidas *in vitro*.

O uso de silicato de sódio ao meio de cultura proporcionou melhor qualidade com o aumento da massa seca em plântulas de antúrio.

Maior teor de clorofila foi obtido quando as plântulas de antúrio foram cultivadas em meio de cultura suplementado com silicato de sódio.

A disponibilidade de silício no meio de cultura foi proporcional à sua absorção e deposição nas folhas de plântulas de antúrio.

REFERÊNCIAS

- AGARIE, S.; AGATA, W.; KAUFMAN, P. B. Involvement of silicone in the senescence of Rice leaves. **Plant Production Science**, Shinkawa, v. 1 n. 2, p. 104-105, Apr. 1998.
- AL-AGHABARY, K.; ZHUJUN, Z.; QINHUA, S. Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. **Journal of Plant Nutrition**, v. 27, n. 12, p. 2101-2115, 2005.
- ALMEIDA, E. F. A. et al. Efeito do silício no desenvolvimento e na nutrição mineral de copo-de-leite. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 103-113, 2009.
- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88 p.
- ALVES, E.; PERINA, F. J. **Apostila do curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raios x**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2012. 63 p.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolates choroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 24, n. 1, p. 1-15, Jan. 1949.
- ASMAR, S. A. et al. Fontes de silício no desenvolvimento de plântulas de bananeira 'Maçã' micropropagadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1127-1131, jul. 2011.
- BRAGA, F. T. et al. Anatomical characteristics of the strawberry seedlings micropropagated using different sources of silicon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, p. 128-132, 2009.

CAMARGO, M. S.; KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H. S. Solubilidade do silício em solos: influência do calcário e ácido silícico aplicados. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 637-647, 2007.

CARVALHO, P. C. et al. Silício melhora produção e qualidade do girassol ornamental em vaso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2394-2399, nov. 2009.

CARVALHO-ZANAO, M. P. et al. Yield and shelf life of chrysanthemum in response to the silicon application. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 30, n. 3, p. 403-408, 2012.

FAQUIN, V. **Nutrição de plantas**. Lavras: UFLA / FAEPE, 2005. 183 p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência Agroteclogia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./Dec. 2011.

FURLANI, A. M. C. Nutrição mineral. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 40-75.

GALLO, J. R.; FURLANI, P. R. Determinação de silício em material vegetal pelo método colorimétrico do azul de molibdênio. **Bragantia**, Campinas, v. 37, n. 2, p. 5-11, 1978.

GANTAIT, S.; MANDAL, N. Tissue culture of *Anthurium andraeanum*: a significant review and future prospective. **International Journal of Botany**, Pakistan, v. 6, n. 3, p. 207-219, 2010.

GONG, H. J. et al. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. **Plant Science**, Limerick, v. 169, n. 2, p. 313-321, Aug. 2005.

GUERRERO, A. C.; FERNANDES, D. M.; LUDWIG, F. Acúmulo de nutrientes em gébera de vaso em função de fontes e doses de potássio. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 30, p. 201-208, 2012.

INAL, A. et al. Silicon increases tolerance to boron toxicity and reduces oxidative damage in barley. **Journal of Plant Nutrition**, Local, v. 32, p. 112-128, 2009.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Comercialização de antúrios no Brasil: aspectos relevantes dos mercados interno e externo. In : CASTRO, A. C. R. et al. **Antúrio**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 163.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

KORNDÖRFER, G. H. Elementos benéficos. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: SBCS, 2006. p. 355-374.

LOCARNO, M.; FOCHI, C. G.; PAIVA, P. D. O. Influência da adubação silicatada no teor de clorofila em folhas de roseira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 2, p. 287-290, mar./abr. 2011.

LUX, A. et al. Silicification in sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars with different drought tolerance. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 115, p. 87-92, 2002.

LUZ, J. M. Q. et al. Produção hidropônica de alface em solução nutritiva com e sem silício. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 295-300, Sept. 2006.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição de plantas**. Piracicaba: Ceres, 2006. 638 p.

MIRANDA, A. R. P. et al. Silício e cloreto de sódio na nutrição mineral e produção de matéria seca de plantas de moringa (*Moringa oleífera* LAM). **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, MG, v. 26, p. 957-965, 2002.

OLIVEIRA, J. T. L. et al. Crescimento de cultivares de girassol ornamental influenciado por doses de silício no solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 2, p. 123-128, 2013.

PASQUAL, M. et al. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 29, p. 324-329, 2012.

PIERIK, R. L. M. *Anthurium andraeanum* Lindl. Plantles produced from callus tissues cultivated *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 37, p. 80-82, 1976.

POZZA, A. A. A. et al. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 185-188, 2004.

PUCHOA, D. *In vitro* mutation breeding of anthurium by gamma radiation / **International Journal of Agriculture & Biology**, Pakistan, v. 7, n. 1, p. 11- 20, 2005.

REIS, T. H. P. et al. Efeito da associação silício líquido solúvel com fungicida no controle fitossanitário do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 76-80, jan./jun. 2008.

SIVANESAN, I. et al. Silicon Supply through the Subirrigation System Affects Growth of Three Chrysanthemum Cultivars. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, Heidelberg, v. 54, n. 1, p. 14-19, 2013.

SOARES, J. D. R. et al. Adubação com silício via foliar na aclimatização de um híbrido de orquídea. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 626-629, 2008.

SOARES, J. D. R. et al. Fontes de silício na micropropagação de orquídea do grupo *Cattleya*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 3, p. 503-507, 2011.

SOARES, J. D. R. et al. Leaf anatomy of orchids micropropagated with different silicon concentrations. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 34, n. 4, p. 413-421, Oct./Dec. 2012.

SOUSA, J. V. et al. Silicato de potássio via foliar no milho: fotossíntese, crescimento e produtividade. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 502-513, July/Aug. 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

CAPÍTULO 4

Fotossíntese e anatomia foliar de plântulas de antúrio *in vitro*, cultivadas com diferentes concentrações de silício

RESUMO

Estudos sobre as modificações anatômicas decorrentes do cultivo *in vitro* são fundamentais para o melhor entendimento no desenvolvimento das plantas micropropagadas. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar diferenças morfológicas nas plantas, em consequência do uso do silício adicionado ao meio para o cultivo *in vitro* de *Anthurium adreaenum* cv. Rubi. Foram utilizados segmentos nodais de plântulas já estabelecidos *in vitro* e inoculados em meio Pierik adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 1,8 g L⁻¹ de PhytigelTM. Foi adicionado ao meio silicato de sódio (Na₂SiO₃), nas concentrações (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quinze repetições, sendo realizada a regressão dos dados. Os segmentos foram mantidos, por 100 dias, em sala de crescimento, sob condições controladas. Foram avaliadas características anatômicas, ultraestruturais e fotossintéticas. A densidade estomática, no meio contendo 1,0 mg L⁻¹ de silicato de sódio foi o que apresentou maior densidade estomática. Para o diâmetro dos estômatos, maior diâmetro polar e equatorial da superfície abaxial ocorreu no tratamento com 2,0 mg L⁻¹. Maior relação diâmetro polar e diâmetro equatorial foi observada para o ponto máximo, na concentração de 1,2 mg L⁻¹. O acréscimo na concentração do silicato de sódio provocou diminuição da espessura da epiderme abaxial, enquanto, para a epiderme adaxial, a espessura aumentou de forma quadrática, na concentração de 0,4 mg L⁻¹. Na espessura da nervura central, observou-se um decréscimo acentuado até a concentração de 1,3 mg L⁻¹. Para o mesofilo, a testemunha apresentou maior espessura, observando-se que a adição de silicato de sódio ao meio de cultura promove decréscimo em sua espessura. As plântulas cultivadas em silicato de sódio demonstraram diferenças significativas para a taxa fotossintética, a taxa transpiratória, a condutância estomática e a concentração interna de CO₂. Já para a razão entre concentrações interna e externa de CO₂, não se observou diferença estatística. A adição de silicato de sódio resultou no aumento da deposição de cera epicuticular e na formação de estruturas de depósito de reserva de cálcio em plântulas de antúrio. Em condições *in vitro*, a adição de silicato de sódio ao meio de cultura afetou o aparato fotossintético. Antúrio cv. Rubi apresenta

características anatômicas e fisiológicas que contribuem para a sobrevivência em ambiente *ex vitro*.

Palavras-chave: Antúrio. Silicato. Alterações estruturais.

ABSTRACT

Studies on the anatomical changes resulting from *in vitro* culture are key to better understanding the development of micropropagated plants. This study was to evaluate morphological differences in plants as a result of the use of silicon added to the medium for the *in vitro* culture of *Anthurium adreaenum* cv. Rubi. Nodal segments of seedlings established *in vitro* and inoculated in Pteris added 30 g L⁻¹ sucrose and solidified with 1.8 g L⁻¹ PhytigelTM. Were added to the medium, sodium silicate (Na₂SiO₃), at different concentrations (0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹). The experimental design was completely randomized, with fifteen repetitions being performed regression data. The segments were kept for 100 days in a growth chamber under controlled conditions. Were evaluated anatomical, ultrastructural and photosynthetic. The stomatal density, the medium containing 1.0 mg L⁻¹ sodium silicate showed the highest stomatal density. For the diameter of the stoma, the more polar and equatorial diameter of the abaxial surface was observed in treatment with 2.0 mg L⁻¹. Polar greater diameter ratio and diameter was observed to peak at a concentration of 1.2 mg L⁻¹. The increase in the concentration of sodium silicate to the reduction of thickness of the lower epidermis, while that for the adaxial, the thickness increased quadratically in a concentration of 0.4 mg L⁻¹. The thickness of the central rib, there was a marked decrease until the concentration of 1.3 mg L⁻¹. For the mesophyll, the control showed a higher thickness, observing that the addition of sodium silicate to the culture medium promotes a decrease in its thickness. Seedlings grown in sodium silicate showed significant differences in photosynthetic rate, transpiration rate, stomatal conductance, internal CO₂ concentration. As for the ratio between internal and external concentrations of CO₂ there was no statistical difference. The addition of sodium silicate resulted in increased epicuticular wax deposition and formation of structures reservation deposit of calcium anthurium seedlings. Under *in vitro* conditions, the addition of sodium silicate to the culture medium affect the photosynthetic apparatus. *Anthurium* cv. Rubi has anatomical and physiological characteristics that contribute to the survival *ex vitro*.

Keywords: *Anthurium*. Silicate. Structural changes.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção comercial de antúrios costumava ser oriunda de mudas obtidas por meio da propagação sexuada. As plantas propagadas dessa forma produzem flores com grande variabilidade de cores, formatos e tamanhos das espatas, dificultando a colheita de flores de mesmo padrão. O cultivo de cultivares nacionais resultantes da pesquisa desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), aliado às técnicas de propagação *in vitro*, refletiu na melhoria da qualidade de produção, possibilitando a utilização da classificação das flores de acordo com os padrões desejados (DIAS et al., 2012).

Assim, técnicas de cultura de tecidos vêm sendo empregadas para a rápida propagação clonal de novas variedades de antúrios. A produção de grande quantidade dessas plantas só é possível pela cultura *in vitro*, uma vez que, pelos métodos tradicionais de propagação, divisão de touceiras e estaquia, apenas algumas unidades de novas mudas podem ser obtidas anualmente (TOMBOLATO et al., 2004).

Diversas alterações na estrutura da folha de plantas mantidas *in vitro* têm sido reportadas, como aumento no tamanho e na densidade dos estômatos e a redução no controle estomático, na quantidade de cera epicuticular e na espessura do mesofilo, com alta proporção de espaços intercelulares (HAZARIKA, 2006; KHAN et al., 2003). Segundo Santana et al. (2008), a intensidade dessas alterações é bastante variável, em função de características próprias de cada espécie e sua quantificação poderá auxiliar na melhoria das condições de cultivo para cada grupo de plantas.

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

A anatomia foliar pode contribuir para a compreensão da condição fisiológica e das modificações estruturais de plantas micropropagadas, fornecendo informação aplicável à planta na adaptação ao novo ambiente *ex vitro* (MARIN, 2003).

A adição de silício adicionado ao meio de cultura pode beneficiar as plantas por aumento da hemicelulose e lignina, aumentando, assim, o grau de dureza da parede celular. Estas modificações aumentam a taxa de sobrevivência das plantas durante a aclimatização. Os efeitos diretos de silício são acompanhados por vários efeitos indiretos, incluindo aumento na capacidade fotossintética, redução de taxas transpiratórias, maior crescimento das plantas e aumento da resistência mecânica das células (VALENTE et al., 2004).

Em face do exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de mensurar os tecidos foliares de *A. andreaenum* cv. Rubi, visando identificar as alterações anatômicas, ultraestruturais e fotossintéticas em plântulas cultivadas *in vitro*, na presença de silicato de sódio, em diferentes concentrações.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos, no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais.

Segmentos nodais de plântulas de antúrio estabelecidas *in vitro* foram inoculados em meio Pierik (PIERIK, 1976) adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 1,8 g L⁻¹ de PhytigelTM. Silicato de sódio (Na₂SiO₃) foi adicionado ao meio de cultura nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹, sendo 15 repetições (2 segmentos/frasco) por tratamento. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e, em seguida, autoclavado, a 121°C e 1,2 atm, durante 20 minutos.

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais contendo uma gema foram inoculados em frascos de 400 mL, contendo 50 mL do meio de cultura Pierik com os respectivos tratamentos. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento convencional, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2 °C e intensidade de 52,5W m⁻² s⁻¹.

Após 100 dias, foram avaliados os parâmetros descritos a seguir.

Características anatômicas – utilizou-se o terço médio da segunda folha completamente expandida, coletada de 4 plantas diferentes por tratamento, previamente fixada em FAA 70% (formaldeído - ácido acético glacial - álcool etílico 70%) (JOHANSEN, 1940), por 72 horas e, posteriormente, conservada em etanol 70% (v/v⁻¹). As secções transversais foram obtidas em micrótomo de mesa tipo LPC e as secções paradérmicas à mão livre, com uso de lâmina de aço, que foram submetidas à clarificação com hipoclorito de sódio (1%-1,25% de cloro ativo), tríplice lavagem em água destilada, coloração com solução safrablau (azul de astra 0,1% e safranina 1%), para as secções transversais e

safranina 1%, para as secções paradérmicas, sendo, posteriormente, montadas em lâminas semipermanentes com água glicerinada (KRAUS; ARDUIN, 1997).

As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio óptico modelo Olympus BX 60 acoplado à câmera digital Canon A630. As imagens foram analisadas em software para análise de imagens UTHSCSA Imagetool, com a medição de cinco campos por repetição, para cada variável analisada. Foram medidas a espessura da epiderme da face abaxial, a espessura da epiderme da face adaxial e a espessura do mesofilo. Para a caracterização dos estômatos, analisaram-se densidade estomática (número de estômatos por mm^2) e diâmetros polar e equatorial, obtidos em microscópio Olympus CBB e Ken-a-vision 2100.

Características ultraestruturais – a análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica, no Departamento de Fitopatologia da UFLA. Amostras do terço mediano de 4 folhas foram fixadas em Karnovsky (1965), pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO_4) e, em seguida, desidratadas em soluções crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo, então, submetidas à secagem ao ponto crítico, utilizando-se CO_2 como líquido de transição (ROBARDS, 1978). Posteriormente, foram recobertas com ouro (20 nm) e analisadas, ao microscópio eletrônico de varredura LEO-EVO, seguindo o protocolo de Alves (2004).

Características fisiológicas - As taxas fotossintética e transpiratória das plantas foram avaliadas com analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA) modelo LI-6400. Para a avaliação dessas variáveis foram selecionadas folhas completamente expandidas em sete plantas por tratamento, a partir das 10h00min, tendo a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos sido fixada na câmara do aparelho para $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Delineamento experimental e análise estatística - o delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com 4 tratamentos sendo 4 repetições e 20

campos para as secções transversais e paradérmicas. Os dados obtidos foram analisados por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011), sendo realizada regressão nos dados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as observações anatômicas, as folhas de antúrio apresentam estômatos do tipo braquiparacíticos. Todas as células têm estômatos acompanhados, de cada lado, por duas células subsidiárias e célula-guarda com cloroplastos (Figura 1A e B). Os estômatos estão distribuídos na superfície da epiderme abaxial, classificando-os como folhas do tipo hipoestomáticas, estando de acordo com Mantovani, Filartiga e Coelho (2010) e Saito e Lima (2009).

Na caracterização da superfície foliar, maior deposição de cera epicuticular foi visualizada na epiderme adaxial das folhas de antúrio submetidas aos tratamentos com silicato de sódio, em relação à testemunha (Figura 1C, F, I, M).

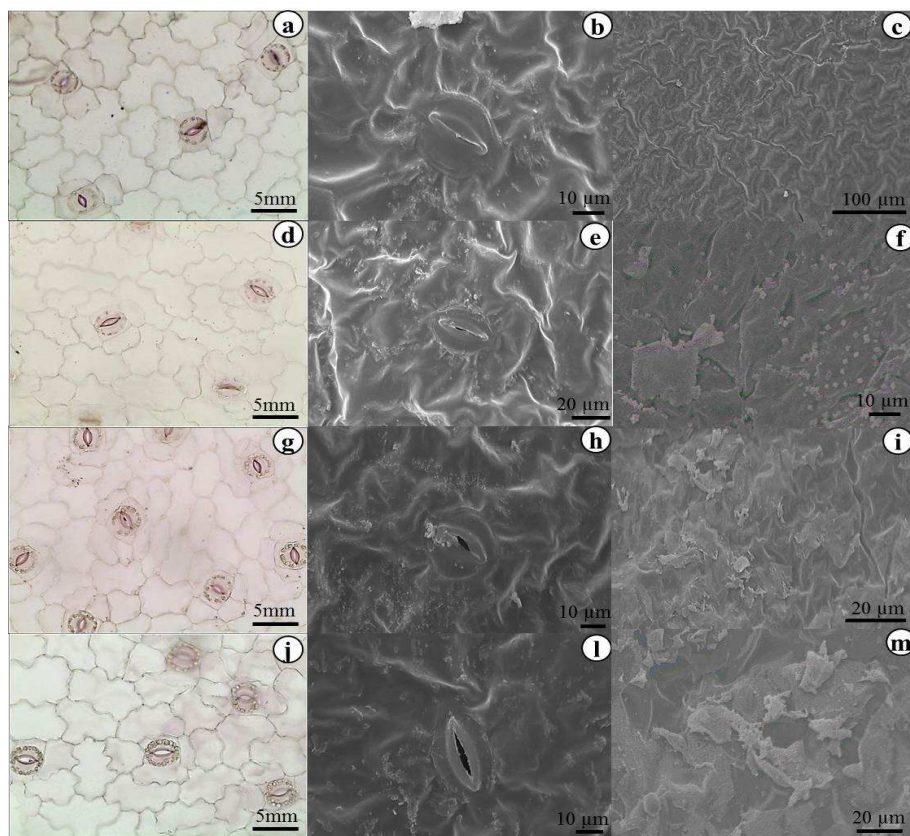


Figura 1 Secções paradedmicas evidenciando estômatos, da face abaxial de folhas de *Anthurium andraeanum* cv. Rubi cultivada *in vitro*, por 100 dias, em meio de cultura contendo concentrações de silicato de sódio. a) e b) Testemunha; d) e e) 0,5 mgL⁻¹; g) e h) 1,0 mgL⁻¹ e j) e l) 2,0 mgL⁻¹, e da face adaxial c) Testemunha; f) 0,5 mgL⁻¹; i) 1,0 mgL⁻¹ e m) 2,0 mgL⁻¹ (Lavras, 2013)

Quanto à densidade estomática por mm², o meio contendo 1,0 mg L⁻¹ de silicato de sódio (60 mm²) foi o que apresentou maior número de estômatos, comparado aos outros tratamentos. Posteriormente, ocorreu um decréscimo para a concentração de 2,0 mg L⁻¹ (Gráfico 1). O aumento na densidade estomática nas folhas *in vitro*, comparado ao de folhas de plantas mantidas em ambiente natural, tem sido reportado em diversas espécies, estando associado,

principalmente, à elevada umidade relativa no interior dos recipientes de cultivo e à reduzida intensidade de luz (KHAN et al., 2003).

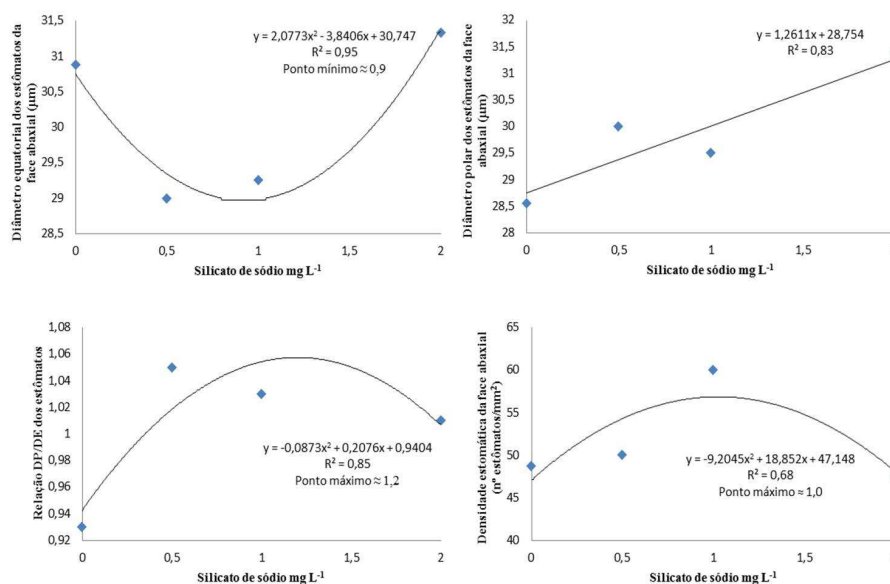


Gráfico 1 Características anatômicas em plântulas de *Anthurium andraeanum* cv. Rubi, aos 100 dias de cultivo, com diferentes concentrações de silicato de sódio (Lavras, 2013)

Segundo Hazarika (2006), a baixa intensidade de luz utilizada durante o cultivo *in vitro*, aliada ao acúmulo de etileno e à elevada concentração de sacarose no meio de cultura, é um dos principais responsáveis pela elevação na densidade de estômatos, acompanhada da reduzida capacidade de fechamento dos ostíolos.

Para o diâmetro dos estômatos, maior diâmetro polar e equatorial da superfície abaxial ocorreu no tratamento com 2,0 mg L⁻¹ de silicato de sódio. No entanto, maior relação diâmetro polar e diâmetro equatorial foi observado para o ponto máximo na concentração de 1,2 mg L⁻¹ de silicato de sódio (Gráfico 1).

Khan et al. (2002) afirmam que a relação diâmetro polar e equatorial (DP/DE) está associada ao formato das células-guarda e constitui uma importante particularidade sobre a funcionalidade dos estômatos, visto que a forma elíptica (maior DP/DE) é característica de estômatos funcionais, ao passo que a forma arredondada (menor DP/DE) está associada a estômatos que não apresentam funcionalidade normal. No entanto, cada espécie e condição de cultivo podem apresentar um resultado específico.

O mesofilo é homogêneo, não apresentando diferenciação entre os parênquimas paliçádico e esponjoso, o que foi observado em todos os tratamentos nesse trabalho (Figura 2), característica também relatada por Mantovani, Filartiga e Coelho (2010).

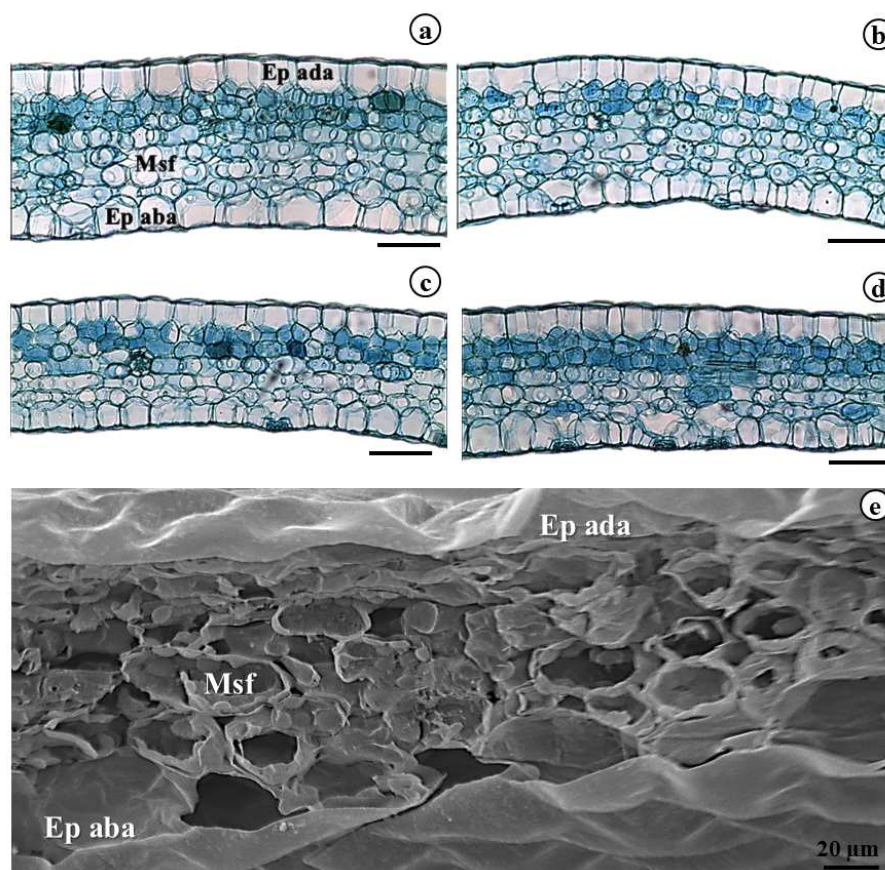


Figura 2 Fotomicrografias de secções transversais da lâmina foliar de *Anthurium andraeanum* cv. Rubi aos 100 dias, com diferentes concentrações de silicato de sódio. a) Testemunha; b) 0,5 mg L⁻¹ de silicato de sódio; c) 1,0 mg L⁻¹; d) 2,0 mg L⁻¹. e) Eletromicrografia da secção transversal da lâmina foliar com 0,5 mg L⁻¹. Barra = 5mm (Lavras, 2013)

Para o mesofilo, a testemunha apresentou maior espessura, observando-se que a adição de silicato de sódio ao meio de cultura promove decréscimo em sua espessura (Gráfico 2), podendo ter ocorrido devido ao fato de silício promover a compartimentação em vacúolos, citoplasma ou na parede celular (LIANG et al., 2007). Alves, Giusti e Domingos (2001), trabalhando com um híbrido de *Trandescantia*, no qual ocorreu a redução da espessura do mesofilo, possivelmente

em função da redução dos espaços intercelulares, dificultando assim o deslocamento de gases nos tecidos. Esse comportamento não foi observado em nenhum dos trabalhos realizados com o silício *in vitro* (ASMAR et al., 2011; BRAGA et al., 2009; SOARES et al., 2012).

O acréscimo na concentração do silicato de sódio provocou diminuição da espessura da epiderme abaxial, enquanto para a epiderme adaxial a espessura aumentou de forma quadrática, na concentração de 0,4 mg L⁻¹ de silicato de sódio, posteriormente registrando decréscimo em concentrações mais elevadas (Gráfico 2).

Na espessura da nervura central, observou-se um decréscimo acentuado até a concentração de 1,3 mg L⁻¹ de silicato de sódio, quando, então, teve início um acréscimo na espessura, na concentração de 2,0 mg L⁻¹ (Gráfico 2).

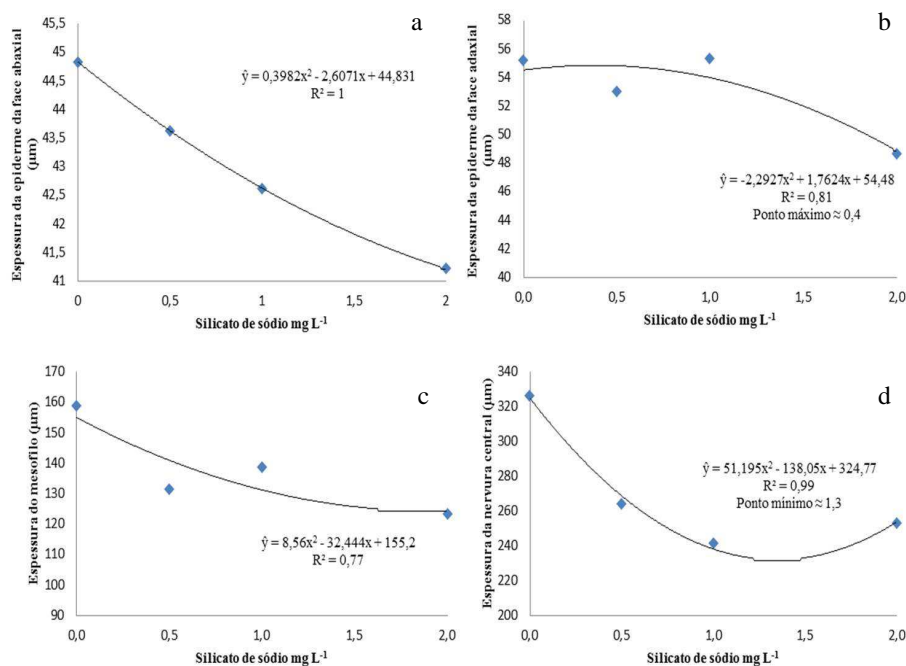


Gráfico 2 Características anatômicas em plântulas de *Anthurium andraeanum* cv. Rubi, aos 100 dias de cultivo, com diferentes concentrações de silicato de sódio (Lavras, 2013)

Observa-se, nos Gráficos 2B, C e D, que, com o acréscimo na concentração de silicato de sódio, houve diminuição em sua espessura. Essa diminuição pode ser devido à adição de silicato de sódio ao meio de cultura, concordando com Nwugo e Huerta (2008), que afirmam que o acúmulo de silício torna a folha mais ereta e rígida e com maior interceptação da luz, aumentando, assim, a eficiência fotossintética e o uso da água e da luz.

A nervura central nas Araceae tem forma variável, podendo ser simétrica, arredondada ou com formato deltoide, em ambas as superfícies, ou achatada ou largamente côncava adaxialmente, e convexa a arredondada abaxialmente (KEATING, 2003).

O *Anthurium andreaenum* cv. Rubi, em condições de cultivo *in vitro*, apresenta nervura mais proeminente na face abaxial, como observado na testemunha (Figura 3A). Com a adição de silicato de sódio ao meio de cultura, observou-se uma mudança visível em seu formato e espessura (Figura 3).

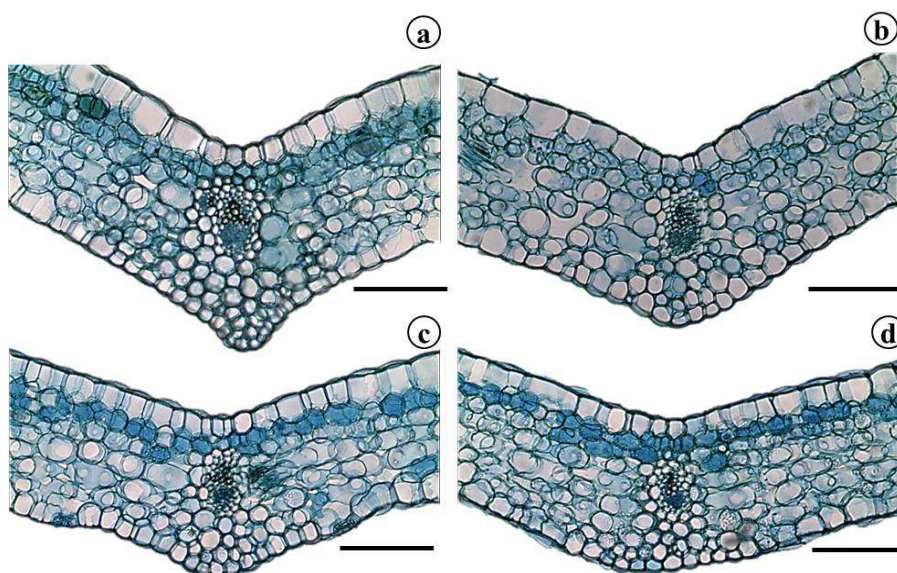


Figura 3 Fotomicrografias de secções transversais da lâmina foliar de *Anthurium andraeanum* cv. Rubi, evidenciando a nervura central. a) Testemunha; b) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de sódio; d) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$; e) $2,0 \text{ mg L}^{-1}$. Barra = 5 mm (Lavras, 2013)

Em todos os tratamentos foram encontrados cristais de oxalato de cálcio, que são representados por drusas e ráfides (Figura 4), presentes no mesófilo e na epiderme da folha, característica citada por Mantovani, Filartiga e Coelho (2010) e por Mantovani e Pereira (2005). A ocorrência de diferentes tipos de cristais de oxalato de cálcio (drusas, ráfides, areia, prismáticos e, embora raros, estiloides) é citada para Araceae (KEATING, 2003). Keating (2002) demonstrou que dois tipos ou mais de cristais podem ocorrer simultaneamente no mesmo órgão em Araceae, como ráfides e drusas ocorrendo nas espécies de *Anthurium*.

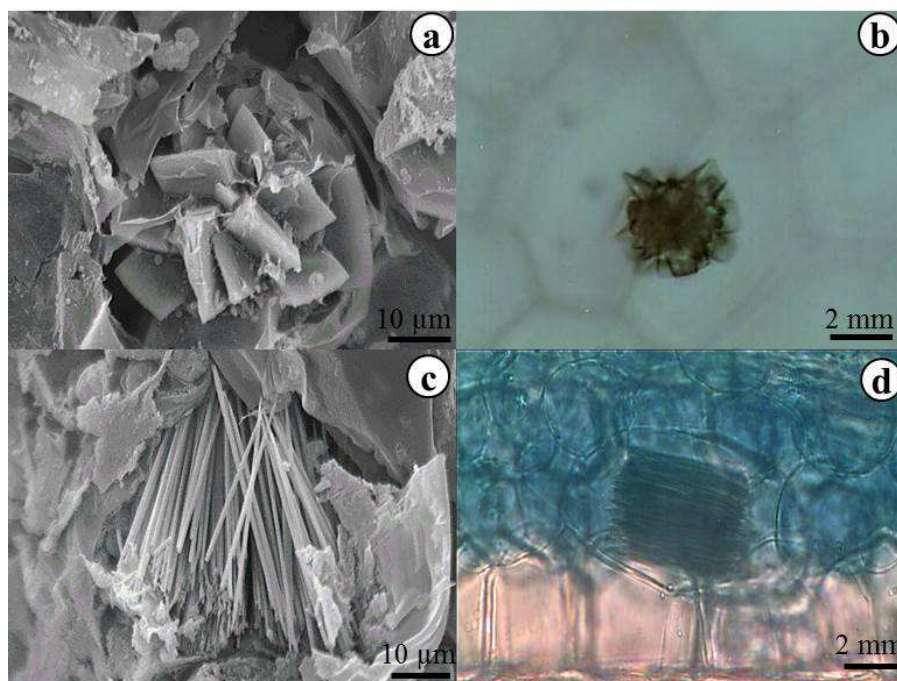


Figura 4 Eletromicrografias e fotomicrografias, evidenciando cristais de oxalato de cálcio em *Anthurium andraeanum* cv. Rubi *in vitro*. a) e b) Cristais do tipo drusa, no tratamento com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de sódio, c) e d) cristais do tipo ráfide, no tratamento com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de sódio (Lavras, 2013).

Os cristais de oxalato de cálcio têm sido motivo de investigação pela sua importância ecológica, uma vez que a sua presença nas plantas é considerada como mecanismo de defesa contra a herbivoria (LUCAS et al., 2000; XIANG; CHEN, 2004), além da sua importância fisiológica, pois eles regulam o nível de cálcio nos tecidos (VOLK et al., 2002), além de auxiliar na distribuição da luz para os cloroplastos com a dissipação do excesso de luz durante períodos de alta intensidade luminosa (FRANCESCHI, 2001). Adicionalmente, há estudos que evidenciam que o excesso de cálcio pode ser estocado na forma de oxalato de

cálcio e que este cálcio pode ser remobilizado em certas condições (VOLK et al., 2002).

Neste trabalho, demonstrou-se que a baixa disponibilidade de Ca no meio de cultura Pierik induziu o armazenamento de Ca pelas plântulas *in vitro* em forma de cristais de oxalato de cálcio, como drusas e ráfides.

A fotossíntese corresponde à entrada básica de energia para as plantas e é essencial para o crescimento do vegetal, sendo ligada diretamente à estrutura das folhas (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). A fotossíntese pode variar conforme o ambiente de cultivo da planta e as duas principais limitações ambientais para a taxa fotossintética são a disponibilidade de CO₂ e a radiação (ZHOU; HAN, 2005).

As plântulas cultivadas nas diferentes concentrações de silicato de sódio demonstraram diferenças significativas para a taxa fotossintética, taxa transpiratória, condutância estomática e concentração interna de CO₂. Já para a razão entre concentrações interna e externa de CO₂, não se observou diferença estatística (Tabela 1).

Tabela 1 Taxa fotossintética (A), carbono interno (Ci), transpiratória (E), condutância estomática (Gs) e relação carbono interno e externo (Ci/Ca), em folha de antúrio cultivada *in vitro*, por 100 dias, em meio de cultura contendo diferentes concentrações de silicato de sódio (Lavras, 2013)

Silicato de sódio (mg L ⁻¹)	A (μmol m ⁻² s ⁻¹)	Ci (μmol)	E (μmol m ⁻² s ⁻¹)	Gs (μmol m ⁻² s ⁻¹)	Ci/Ca
Testemunha	1,37 a	263,59 b	0,35 b	0,02 b	1,29 a
0,5	0,86 b	266,01 a	0,41 a	0,03 a	1,29 a
1,0	1,47 a	99,06 d	0,10 c	0,01 b	1,04 a
2,0	0,84 b	202,09 c	0,24 c	0,01 b	1,56 a

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

O carbono interno, a taxa de transpiração e a condutância estomática foram favoráveis na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de sódio, seguidos de uma redução em suas taxas com o incremento do silicato ao meio de cultura.

As taxas fotossintéticas foram maiores na testemunha e na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de sódio.

A fotossíntese pode variar conforme o ambiente de cultivo da planta e as duas principais limitações ambientais para a taxa fotossintética são a disponibilidade de CO_2 e a de radiação (ZHOU; HAN, 2005). Como a quantidade de radiação foi fixada na câmara do IRGA ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$), o aumento na taxa fotossintética observado para as plântulas cultivadas com silicato de sódio pode estar relacionado com adaptações morfológicas que favoreçam a captação de CO_2 e o aproveitamento da radiação incidente nas folhas. Dessa forma, a adição de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de sódio pode ter promovido um aumento na taxa fotossintética, por promover um aumento na densidade estomática (Gráfico 1) que favoreceu o fluxo de CO_2 para o interior da folha, permitindo maior aproveitamento da radiação incidente. Esses resultados demonstram que a adição de silicato de sódio é importante na melhoria na estrutura interna das folhas de antúrio cv. Rubi.

Com os resultados apresentados, pode-se inferir que a adição de silício ao meio de cultivo é benéfica para as características anatômicas, em que os fatores que regulam a perda de água na planta são favorecidos quando se acrescenta silicato ao meio.

Adicionalmente, as alterações que ocorrem na estrutura interna das folhas constituem aspectos determinantes na capacidade de aclimatização das espécies (HANBA; KOGAMI; TERASHIMA, 2002).

Para as outras concentrações, houve um aumento na presença de cera nas folhas *in vitro* de antúrio. Segundo Mohammadian, Watling e Hill (2007),

ceras epicuticulares podem diminuir a temperatura da folha, diminuindo a transpiração, que está intimamente ligada com a fotossíntese.

4 CONCLUSÕES

A adição de silicato de sódio ao meio de cultura resultou no aumento da deposição de cera epicuticular e na formação de estruturas de depósito de reserva de cálcio em plântulas de antúrio.

Em condições *in vitro*, a adição de silicato de sódio ao meio de cultura afetou o aparato fotossintético.

Anthurium andreanum cv. Rubi tem características anatômicas e fisiológicas que contribuem para a sobrevivência em ambiente *ex vitro*.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88 p.

ALVES, E. S.; GIUSTI, P. M.; DOMINGOS, M. Anatomic studies on *randescantia* hibrid clone 4430 leaves: changes caused by urban air pollution. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, p. 561-566, 2001. Suppl.

ASMAR, S. A. et al. Fontes de silício no desenvolvimento de plântulas de bananeira 'Maçã' micropropagadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1127-1131, jul. 2011.

BRAGA, F. T. et al. Anatomical characteristics of the strawberry seedlings micropropagated using different sources of silicon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, p. 128-132, 2009.

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

DEBERG, P. C.; MAENE, L. J. Pathological and physiological problems related to in vivo culture of plant. **Parasítica**, Bruxelles, v. 40, n. 1. p. 69-75, 1984.

DIAS, G. M. et al. Pós- colheita. In: CASTRO, A. C. R. et al. **Antúrio**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 163.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./Dec. 2011.

FRANCESCHI, V. Calcium oxalate in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, p. 361-427, 2001.

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

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, p. 105-120, 2006.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill, 1940. 523 p.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, n. 15, p. 137-138, Apr. 1965.

KEATING, R. C. **Anatomy of the monocotyledons: IX Araceae and Acoraceae**. New York: Oxford University, 2002.

KEATING, R. C. Leaf anatomic characters and their value in understanding morphoclines in the Araceae. **The Botanical Review**, Local, v. 68, n. 4, p. 510-523, 2003.

KHAN, P. 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**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 141-146, Nov. 2002.

KHAN, P. S. V. et al. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 46, n. 2, p.161-166, 2003.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 1997. 198 p.

LIANG, Y. et al. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. **Environ. Pollut.**, v. 147, p. 422-428, 2007.

LUCAS, P. W. et al. Mechanical defenses to herbivory. **Annals of Botany**, London, v. 86, p. 913-920, 2000.

MANTOVANI, A.; FILARTIGA, L. D. P.; COELHO, M. A. N. Anatomia comparada da folha e espata de espécies de *Anthurium* (Araceae) ocorrentes na Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 185-200, jan./mar. 2010.

MANTOVANI, A.; PEREIRA, T. E. Comparative anatomy of leaf and spathe of nine species of *Anthurium* (section urospadix; subsection flavescentiviridia) (araceae) and their diagnostic potential for taxonomy. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 88, p. 145-160, 2005.

MARIN, J. A. High survival rates during acclimatization of micropropagated fruit tree rootstocks by increasing exposures to low relative humidity. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 616, p.139-142, 2003.

MOHAMMADIAN, M. A.; WATLING, J. R.; HILL, R. S. The impact of epicuticular wax on gas-exchange and photoinhibition in *Leucadendron lanigerum* (Proteaceae). **Acta Oecologica**, Local, v. 31, p. 93-101, 2007.

NWUGO, C. C.; HUERTA, A. J. Effects of silicon nutrition on cadmium-uptake, growth and photosynthesis of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings exposed to long-term low level cadmium. **Plant and Soil**, Bethlehem, v. 311, p. 73-86. 2008.

PIERIK, R. L. M. *Anthurium andraeanum* Lindl. Plantles produced from callus tissues cultivated *in vitro*. **Physiologia Platarum**, Sweden, v. 37, p. 80-82, 1976.

ROBARDS, A. W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: HALL, J. L. (Ed.). **Electron microscopy and cytochemistry of plant cells**. New York: Elsevier, 1978. p. 343-444.

SAITO, S. R. M.; LIMA, V. F. G. A. P. Estudo anatômico e variação na concentração de idioblastos com ráfides em folhas de Araceae, mantidas sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Saúde**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 1-9, 2009.

SANTANA, J. R. F. et al. Anatomia foliar de seis espécies de anonáceas cultivadas in vitro e em casa de vegetação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2362-2365, nov. 2008.

SOARES, J. D. R. et al. Leaf anatomy of orchids micropropagated with different silicon concentrations. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 34, n. 4, p. 413-421, Oct./Dec. 2012.

TOMBOLATO, A. F. C. et al. Antúrio: *Anthurium andraeanum* Lindl. In: _____. **Cultivo comercial de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2004a. p. 61-94.

VALENTE, A. et al. Modeling, simulation and testing of a silicon soil moisture sensor based on the dual-probe heat-pulse method. **Sens and Actuators A**, Warsaw, v. 115, n. 2, p. 434-439, 2004.

VOLK, G. et al. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 41, p. 34-45, 2002.

XIANG, H.; CHEN, J. Interspecific variation of plant traits associated with resistance to herbivory among four species of *Ficus* (Moraceae). **Annals of Botany**, London, v. 94, p. 377-384, 2004.

ZHOU, Y. M.; HAN, S. J. Photosynthetic response and stomatal behaviour of *Pinus koraiensis* during the fourth year of exposure to elevated CO₂ concentration. **Photosynthetica**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 445-449, Sept. 2005.