



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE  
E AGROECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS**

**LIGIA EBURNEO**

**Desenvolvimento de plântulas e anatomia foliar  
comparada de *Catasetum x apolloi* Benelli &  
Grade (Orchidaceae) submetidas a diferentes  
doses de silicato de potássio e fontes de luz.**

**Dissertação de Mestrado**

**ALTA FLORESTA-MT**

**2014**



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE  
E AGROECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS**

**LIGIA EBURNEO**

**Desenvolvimento de plântulas e anatomia foliar  
comparada de *Catasetum x apolloi* Benelli &  
Grade (Orchidaceae) submetidas a diferentes  
doses de silicato de potássio e fontes de luz.**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos.

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Vieira da Silva

**ALTA FLORESTA-MT**

**2014**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO, CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

### Catálogo na publicação

Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Roberta Maria Miranda Caetano - CRB 1 / 2914

E16d Eburneo, Ligia

Desenvolvimento de plântulas e anatomia foliar comparada de *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade (*Orchidaceae*) submetidas a diferentes doses de silicato de potássio e fontes de luz / Ligia Eburneo. Alta Floresta-MT, 2014.  
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos) – Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias da Universidade do Estado de Mato Grosso.  
Orientadora: Profa. Dra. Ivone Vieira da Silva.

1. Catasetineae. 2. Luminosidade. 3. Morfoanatomia. 4. Sílicio. 4. Vitrocultura. I. Título.

**Desenvolvimento de plântulas e anatomia foliar comparada de *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade (Orchidaceae) submetidas a diferentes doses de silicato de potássio e fontes de luz.**

**Ligia Eburneo**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos.

Aprovada em: 27/03/2014

---

Profa. Dra. Ivone Vieira da Silva  
Orientadora – UNEMAT/ PPGBioAgro

---

Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi  
UNEMAT/ PPGBioAgro

---

Profa. Dra. Shirley Martins Silva  
UNIOESTE

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu Filho amado Jayme Eburneo Queiroz, pela dedicação e amor incondicional em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pois sem Ele nada podemos fazer. A Ele toda Honra e Glória!

Ao meu amado filho Jayme Eburneo Queiroz. Por estar presente, me ouvindo, sendo paciente, me aconselhando, me dando muito amor e força para sempre continuar. Você é minha razão de viver.

À Profa Dra Ivone Vieira da Silva pela oportunidade de vivenciar experiências tão ricas. Por sua orientação segura, atenção, confiança e compromisso. Pela sua maneira simples e inteligente de ser. Por acreditar nesse projeto desde o início, pela paciência e atenção durante as orientações e pelo crescimento que me proporcionou durante esse período. Agradeço a amizade e apoio em todos os momentos.

À professora Dra Isane Vera Karsburg pelas valiosas contribuições, disponibilidade e colaboração, fundamentais para a consecução deste trabalho.

À Professora Dra Ana Aparecida Bandini Rossi pela ajuda em todos os momentos que precisei.

À minha futura nora Gabriela Pangnocelli, por toda compreensão e carinho.

Ao Professor Dr. Ostenildo Ribeiro Campos.

Aos professores do Programa de Mestrado: Pelos ensinamentos e competência.

Aos colegas do Mestrado. Pelo apoio e companheirismo durante essa etapa de formação.

Aos bolsistas dos laboratórios de Cultura de Tecidos e Biologia Vegetal, pela ajuda incondicional, sem a qual não teria tempo hábil para realizar essa pesquisa: Aleson, Viviane, Ailton, Adriano, Daniel, Jaqueline, Kátia, Angelita, Cleonete, Norberto e Sylvana.

Aos amigos Ricardo Gallo, Felipe Sakamoto, Marcos José Gomes Pessoa, Cleverson Rodrigues, Juliana Encinas Dardengo e Alan Carlos Batistão.

Aos meus pais Jaime Eburneo e Elza Theodoro Eburneo. Exemplos vivos de sabedoria, perseverança, ética e amor. Obrigada por sempre me apoiarem em meus projetos.

Aos meus irmãos, Nivaldo Eburneo, José Antonio Eburneo, Rildo Eburneo, Elza e em especial minha irmã Ivone Eburneo Souza. Pela paciência, confiança, admiração, incentivo e ajuda em todos os momentos.

Às amigas Alcina Alves de Araújo, Márcia Elisabete Klein e Ivone Nishi. Com quem pude partilhar meus momentos de angústia e de conquistas.

Por suas palavras de incentivo e carinho quando precisei.

À minha amiga Beatriz Peres da Cruz, por todos os cuidados e apoio.

À Apolonia Grade pela cedência do material botânico pesquisado.

À Universidade Estadual de Mato Grosso- UNEMAT. Pela oportunidade concedida.

Agradecimentos ao PPGBioAGRO.

Aos vigilantes do período noturno e diurno pela colaboração.

A todas as pessoas, que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

## EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

*Albert Einstein*

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE SIGLAS .....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	7
3. CAPÍTULOS .....	10
3.1 MORFOMETRIA DE VITROPLANTAS DE <i>Catasetum x apolloi</i> Benelli & Grade COM ADIÇÃO DE SILICATO DE POTÁSSIO EM MEIO ALTERNATIVO EM DIFERENTES FONTES DE LUZ <sup>1</sup> .....	10
Resumo.....	10
Abstract.....	11
Introdução .....	12
Material e Métodos.....	15
Resultados e Discussão.....	18
Conclusões.....	31
Referências Bibliográficas .....	33
3.2 ANATOMIA E ANÁLISE MICROMORFOMÉTRICA FOLIAR DE <i>Catasetum x apolloi</i> Benelli & Grade COM ADIÇÃO DE SILICATO DE POTÁSSIO EM MEIO ALTERNATIVO E DIFERENTES FONTES DE LUZ.....	38
Abstract.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Introdução .....	39
Material e Métodos.....	44
Resultados e Discussão.....	48
Conclusões.....	66
Referências Bibliográfica.....	67
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	72

## LISTA DE TABELAS

TABELAS	Página
CAPÍTULO 1	
Tabela 1. Porcentagem de pseudobulbos de <i>Catasetum x apolloi</i> mediante aplicação de diferentes concentrações de silicato de potássio. ....	23
CAPÍTULO 1	
Tabela 1. Peso da Massa Fresca de <i>Catasetum x apolloi</i> mediante aplicação de diferentes concentrações de silicato de potássio em ambiente com luminosidade artificial e natural. ....	29
Tabela 2. Índice (IE) e Densidade Estomática (DE) de <i>Catasetum x apolloi</i> cultivadas in vitro com diferentes luminosidades e concentrações de silicato de potássio. ....	58
Tabela 3. Diâmetro equatorial (DIE), Diâmetro polar (DP), Limbo foliar (LF) de vitroplantas em diferentes ambientes, luz natural/luz artificial e concentrações de silicato de potássio ao meio alternativo. ....	61

## LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Página
CAPÍTULO 1	
Figura 1. Número de raízes de <i>Catasetum x apolloi</i> cultivadas in vitro com diferentes concentrações de silicato de potássio e com luminosidade natural.	18
Figura 2. Comprimento da maior raiz (cm) de <i>Catasetum x apolloi</i> cultivadas in vitro com diferentes concentrações de silicato de potássio e com luminosidade natural e artificial. ....	20
Figura 3. Vitroplantas com meio alternativo/luz natural; B- Meio alternativo/luz artificial; C- Meio alternativo com 0,5 mL L <sup>-1</sup> /luz natural; D- Meio alternativo com 0,5 m L L <sup>-1</sup> /luminosidade artificial; E- Meio alternativo com 1m L <sup>-1</sup> /luz natural; F- Meio alternativo com 1mL L <sup>-1</sup> /luminosidade artificial. Barra = 2,5 cm (A-F). ....	21
Figura 4. Média do comprimento total (cm) de <i>Catasetum x apolloi</i> cultivadas in vitro com diferentes concentrações de silicato de potássio e com luminosidade natural (A) e artificial (B). ....	27
Figura 5. Clorofila total de <i>Catasetum x apolloi</i> cultivadas in vitro com diferentes concentrações de silicato de potássio com luminosidade artificial. ....	30
CAPÍTULO 2	
Figura 1A-B. Fotomicrografia de secções paradérmicas da epiderme de <i>Catasetum x apolloi</i> . 1A (Face abaxial), 1B (Face adaxial) da planta adulta; esa-estômato anomocítico, CE- células epidérmicas, est-estômato teracítico,ESA-estômatos tetracíticos. Barra = 40 µm (A, B). ....	48
Figura 2A-E. Fotomicrografias de secções transversais de <i>Catasetum x apolloi</i> : nervura central e mesofilo AN (planta adulta/ ambiente natural). (csc- câmara subestomática; m- mesofilo; eab- epiderme abaxial;ead-epiderme adaxial, x- xilema; f- floema; fff- feixe de fibras floemáticas; ff-(feixe de fibras,ra,ffx). Barra = 120 µm (A, B); 80 µm (C, D, E). ....	49

Figura 3A-F. Fotomicrografia de secções paradérmicas da epiderme de *Catasetum x apolloi*; B- TAN (Tratamento ambiente natural com meio alternativo/luz natural); A- TAA (Tratamento c/ luz artificial em meio alternativo); D- TAN c/ silicato de potássio 0,5 mL L<sup>-1</sup>; C- TAA c/ silicato de potássio 0,5 mL L<sup>-1</sup>; F- TAN c/ silicato de potássio 1 mL L<sup>-1</sup>; E- TAA c/ silicato de potássio 1 mL L<sup>-1</sup>.(CE- células epidérmicas; EST- Estômato tetracítico, ESA- Estômato anomocítico). Barra = 40 µm (A- F)..... 52

Figura 4A-F. Fotomicrografias de secções transversais de vitroplantas de *Catasetum x apolloi*: mesofilo e nervura central TAA (Tratamento com luminosidade artificial). A, B- Controle; C, D- Adição de silicato de potássio 0,5 mL L<sup>-1</sup>; E, F- Adição de silicato de potássio 1 mL L<sup>-1</sup>. (cse- câmara subestomática; m- mesofilo; ead- epiderme adaxial; eab- epiderme espessa abaxial; x- xilema; f- floema; fff- feixe de fibras floemáticas; ffx- feixe de fibras xilemáticas; r- ráfides; co- cutícula ornamentada). Barra = 80 µm (A-F). ..... 55

Figura 5A-G. Fotomicrografias de cortes transversais de vitroplantas de *Catasetum x apolloi*: mesofilo e nervura central TAN (Tratamento com luminosidade natural). A, B- controle; C, D- Adição de silicato de potássio 0,5 mL L<sup>-1</sup>; E, F- Adição de silicato de potássio 1 mL L<sup>-1</sup>. (cse- câmara subestomática; csp- câmara subestomática; es- estômato; m- mesofilo; ead- epiderme adaxial; eab- epiderme espessa abaxial; x- xilema; f- floema; fff- feixe de fibras floemáticas; ffx- feixe de fibras xilemáticas; r- ráfides; cada- células adaxiais alongadas;co- cutícula ornamentada). Barra = 80 µm (A-F). . 57

## LISTA DE SIGLAS

**UNEMAT-** Universidade do Estado de Mato Grosso

**PPGBioAGRO-** Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos

**TAA** -Tratamento em Ambiente Artificial

**TAN-** Tratamento em Ambiente Natural

**FEMA-** Fundação Estadual do Meio Ambiente

**IBGE-** Instituto de Geografia e Estatística

## RESUMO

EBURNEO, Ligia. M.Sc. Universidade do Estado de Mato Grosso, Março de 2014. **Desenvolvimento de plântulas e anatomia foliar comparada de *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade (Orchidaceae) submetidas a diferentes doses de silicato de potássio e fontes de luz.** Orientadora: Profa Dra Ivone Vieira da Silva.

O objetivo desse trabalho foi comparar plantas de *Catasetum x apolloi* cultivadas sob luz natural e luz artificial e sob diferentes concentrações de silicato de potássio, para verificação do desenvolvimento da planta e diferenciação anatômica que auxiliem no processo de aclimatização dessa espécie endêmica da região norte matogrossense. Protocormos provenientes da sementeira *in vitro* com aproximadamente 0,5 cm de tamanho foram inoculados em frascos com 100 mL L<sup>-1</sup> de meio de cultura alternativo, com silicato de potássio (0; 0,5; 1,0 mL L<sup>-1</sup>). As culturas foram mantidas sob luz natural e luz artificial por 150 dias. As raízes obtiveram maior crescimento com a aplicação de 1 mL L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> em ambiente natural. Maiores teores de clorofila e quantidade de pseudobulbos foram evidenciados em ambiente luz/artificial, e aplicação de silício 1,0 mL L<sup>-1</sup> e 0,5 mL L<sup>-1</sup>, respectivamente. Houve formação de raízes em todos os tratamentos, porém com decréscimos proporcionais ao aumento das doses. Para comparação anatômica utilizou-se plantas adultas as quais apresentaram folhas anfiestomáticas com estômatos teracíticos e anomocíticos, sinuosidades nas células do mesofilo, células epidérmicas adaxiais e abaxiais com as mesmas dimensões, não apresentam colênquima. Os melhores resultados observados com a aplicação de K<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub> em meio alternativo, nos ambientes TAA (Luminosidade artificial), TAN (Luminosidade natural), foram: alongamento da hipoderme - doses 0,5 e 1 mL L<sup>-1</sup>; maior mesofilo - 0,0 e 0,5 mL L<sup>-1</sup> (TAA) e nervura central dose 0,0 mL L<sup>-1</sup> (TAA); abertura estomática elíptica 0,5 mL L<sup>-1</sup> e 1 mL L<sup>-1</sup> (TAA); formação de câmaras supraestomáticas 0,5 mL L<sup>-1</sup>; menor densidade estomática 1 mL L<sup>-1</sup>; menores diâmetros equatorial e polar dos estômatos, nas doses de 0,0 e 0,5 mL L<sup>-1</sup>. Os caracteres observados, como espessamento da cutícula, alongamento da hipoderme, formação de câmaras supra-estomáticas, menores densidades de estômatos, abertura estomática elíptica, estômatos menores,

maiores tamanho do mesofilo, promovem menor estresse hídrico no processo de aclimatização das plantas cultivadas *in vitro*, inferindo que esse conjunto de características na planta propicia maior chance de sobrevivência *ex vitro*.

**Palavras chave:** Catasetineae; luminosidade; morfoanatomia; silício; vitrocultura.

## ABSTRACT

Eburneo, Ligia. M.Sc. University of Mato Grosso State, March 2014 . **Seedling development and leaf comparative anatomy of *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade(Orchidaceae) compared and submitted to different potassium silicate doses and light sources.** Advisor: Prof. Dra. Ivone Vieira da Silva.

The aim of this study was to compare plants of *Catasetum x apolloi* cultivated under natural and artificial light and under different concentrations of potassium silicate for verification of plant development and anatomical differentiation which assist the acclimatization process of this endemic species from the northern Mato Grosso region. Protocorms from in vitro sowing measuring around 0.5 cm were inoculated in a 100 mL L<sup>-1</sup> jars with an alternative growth media with potassium silicate (0 , 0.5, 1.0 U mL L<sup>-1</sup>). The growth media were kept under natural light and artificial light for 150 days. The roots had a higher growth under application of 1 mL L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> and natural light environment. Higher chlorophyll amount and pseudobulbs content were seen in brightness environment, and 1.0 mL L<sup>-1</sup> and 0.5 mL L<sup>-1</sup> silicon application, respectively. There was root formation in all treatments, but a root reduction was proportional to the doses increments. For anatomical comparison, we used adult plants which showed amphistomatic leaves with tetracytic and anomocytic stomata, mesophyll cells sinuosity, adaxial and abaxial epidermic cells of the same size, do not show collenchyma. The best results were observed with application of the alternative growth media in K<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub> in (TAA) environments brightness (TAN) (natural light) were: stretching on the hypodermis - 0.5 and 1 mL L<sup>-1</sup> doses; bigger mesophyll - 0.0 and 0.5 mL L<sup>-1</sup> ( TAA ) and midrib 0.0 mL L<sup>-1</sup> dose ( TAA ) ; elliptical stomatal aperture 0.5 mL L<sup>-1</sup> and 1 mL L<sup>-1</sup> ( TAA ) ; supra- stomatal chambers formation 0.5 mL L<sup>-1</sup> ; lower stomatal density 1ml L<sup>-1</sup> ; smaller equatorial and polar stomata diameters, at doses of 0.0 and 0.5 mL L<sup>-1</sup>. The observed traits such as cuticle thickening, stretching of the hypodermis, supra-stomatal chambers formation, lower stomatal density, elliptical stomatal aperture, smaller stomata , mesophyll larger size, promote less water stress in the in vitro cultivated plants acclimatization process , implying that this set of traits on the plant provides greater chance of ex vitro survival.

Keywords : *Catasetineae* ; brightness ; morphoanatomy ; silicon; vitri-culture

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae é considerada uma das maiores famílias de plantas, estima-se uma variação entre 20.000 e 35.000 espécies distribuídas em mais de 800 gêneros e 120.000 híbridos (SOUZA & LORENZI, 2005). Porém, este número tende sempre a aumentar, pois a cada ano novas descobertas são feitas (SILVA & SILVA, 2010). As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas por sua beleza, exotividade e agregam maior valor comercial.

Entre as orquídeas destacam-se as espécies do gênero *Catasetum* Rich. ex Kunth que compreende 95 espécies e sete híbridos naturais ocorrentes no Brasil, das quais 28 espécies foram confirmadas para Mato Grosso. Destas, 21 espécies são relatadas para a porção amazônica do Mato Grosso (PETINI-BENELLI, 2012). Entre híbridos naturais de *Catasetum* está a *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade, sendo encontrada sobre palmeiras da espécie *Maximiliana regia* às margens do rio Teles Pires no município de Carlinda- MT e também observadas em Alta Floresta - MT (BENELLI & GRADE 2008).

*Catasetum x apolloi* é uma erva epífita com pseudobulbos robustos, fusiformes e cilíndricos, folhas longas, linear-lanceoladas, acuminadas e para a base atenuadas em pseudopecíolo canaliculado, rijas e reto patentes recurvadas, com nervuras destacadas e haste floral com até 55 cm, sustentando mais de uma dezena de flores nos 2/3 finais. A flor apresenta pedicelo patente, reto ou levemente arqueado atingindo até 30 mm de comprimento e na base apresenta bráctea apressa e fixa, côncava. As sépalas são carnosas, castanho-avermelhadas, sendo as laterais um pouco oblíquas e mais reflexas (BENELLI & GRADE, 2008).

As pétalas de *Catasetum x apolloi* são ovaladas, obtusas ou aguçadas, igualmente castanho-avermelhadas. O labelo, espessamente carnosos e rijos, é saquiforme com a parte dorsal da protuberância arredondada e os lobos laterais fimbriados (BENELLI & GRADE 2008).

A espécie *Catasetum x apolloi* foi descrita em 2008 como sendo uma nova espécie para a região norte de Mato Grosso, pelas autoras Benelli & Grade (2008). No entanto, a identificação correta ainda não foi conclusiva. As autoras realizaram experimentos de hibridação entre as espécies *C. schmidtianum* e *C. longifolium* e, apontaram uma similaridade com *C. x apolloi*.

Uma análise envolvendo caracteres anatômicos e marcadores moleculares (extração de DNA) mostraria claramente a identificação da espécie citada.



Figura 1- Características florais de *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade.

A ocorrência de híbridos naturais é citada em muitas famílias botânicas (BRIGGS & WALTERS, 1997; STUESSY, 1990; DE LA SOTA & PAZOS, 2001; WENDT et al., 2001; GOBERT et al., 2002). Wendt et al. (2001), afirmam que a hibridação é comum em populações próximas e que o isolamento geográfico e ecológico entre espécies tem diminuído pela facilidade de acesso provocada pelo homem. Stebbins (1959) relata que a hibridação tem sido considerada fundamental na evolução das plantas por representar uma possibilidade de recombinação genética, ou seja, pode originar uma nova linhagem evolutiva. Um híbrido natural pode, muitas vezes, ser confundido com uma espécie nova ou uma variedade (STUESSY, 1990).

A família Orchidaceae tem características muito especializadas com elevado poder de adaptação a diferentes ambientes (BENZING et al., 1982) e suas flores exibem particularidades marcantes que desempenham importante papel na atração do agente polinizador o que, conseqüentemente, favorece a polinização cruzada (DRESSLER, 1993).

Devido às características ornamentais, as orquídeas apresentam grande importância econômica, desta forma são retiradas excessivamente do seu habitat natural, levando muitas espécies à extinção, sem ao menos serem identificadas (FERREIRA & SUZUKI, 2008). *Catasetum x apolloi*, possui exotividade e beleza inigualáveis, com cores vibrantes e variações morfológicas, sendo constantemente retiradas de seu habitat natural. Decorrente dos grandes desmatamentos e queimadas na região, sua multiplicação *in vitro* e aclimatização é fundamental para a conservação deste “híbrido”. O cultivo *in vitro* tem propiciado a propagação massal de uma série de espécies de orquídeas em risco de extinção ou de elevado valor comercial (SANTOS et al., 2006). Nas duas últimas décadas, as técnicas de cultivo *in vitro* têm sido utilizadas para a propagação de orquídeas, para o estudo de aspectos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento e como método de conservação *ex-situ* para redução do risco de extinção (FERREIRA & SUZUKI, 2008).

Orquídeas podem ser propagadas tanto por meio de sementes como vegetativamente, a cultura de tecidos é utilizada para a obtenção de grande quantidade de mudas em curto espaço de tempo e esta técnica tem sido utilizada para estudos de propagação *in vitro*, fitopatologia e nutrição mineral (SOARES et al., 2008). Segundo Lone et al. (2008), a germinação *in vitro* de orquídeas via sementes possibilita maior aproveitamento, pois favorece a germinação de grande parte delas.

A cultura de tecidos se destaca como uma técnica que viabiliza a germinação de sementes possibilitando a obtenção de grande quantidade de mudas em curto espaço de tempo (PASQUAL et al., 2011). As orquídeas apresentam frutos com milhares de sementes, contudo a germinação destas é pouco eficiente em condições naturais, ficando em torno de 3 a 5% (TOMBOLATO & COSTA, 1998).

Vários meios de cultura são relatados para o cultivo assimbiótico de sementes de orquídeas *in vitro* (ARDITTI, 1992). Contudo, plântulas cultivadas por esse processo raramente sobrevivem, quando transferidas para seu habitat natural em programas de reintrodução de espécies no campo (CLEMENTS et al., 1986; ANDERSON, 1991).

A composição do meio de cultura tem importante função nas respostas de crescimento de células e tecidos. Plantas ou explantes cultivados *in vitro* têm exigências nutricionais específicas e requerem meios nutritivos compostos por minerais, vitaminas e fontes de energia. Os meios de cultura podem ser modificados de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e a espécie com a qual se esteja trabalhando (TORRES et al., 2001). O cultivo *in vitro* proporciona alta taxa de multiplicação, mas as plantas produzidas diferem quanto à anatomia, morfologia e fisiologia, comparadas as plantas desenvolvidas em casa de vegetação e em campo (CALVETE et al., 2002).

O potássio é o elemento mineral mais abundante nas plantas, que pode ser adicionado aos meios de cultura, porém não existem relatos sobre a utilização desse elemento para o desenvolvimento *in vitro* de *Catsetum x apolloi*. Segundo Malavolta (1997), o potássio ativa mais de 60 enzimas, muitas delas essenciais para a fotossíntese e para a respiração, estando envolvido nas sínteses de proteínas e de amido, nos movimentos de abertura e fechamento dos estômatos e nos movimentos násticos, além de participar na manutenção do equilíbrio eletrostático e turgescência nas células, juntamente com outros cátions.

Atualmente incluído como micronutriente o silício (Si) é absorvido pelas plantas em grandes quantidades. Em muitas espécies os teores encontrados nos tecidos superam os de nitrogênio e potássio, considerado um componente essencial (BRASIL, 2004). Muitos trabalhos em campo têm demonstrado o efeito benéfico da sua utilização em diversas culturas, já que sua função estrutural na parede celular pode elevar os conteúdos de hemicelulose e lignina, aumentando a rigidez da célula. Segundo Camargo et al., (2007) a ação benéfica do silício tem sido associada a diversos efeitos indiretos como aumento da eficiência da capacidade fotossintética, redução da transpiração e aumento da resistência mecânica das células. Porém existe escassez de protocolos que incluam esse nutriente aos meios de cultura *in vitro*.

O silício tende a se acumular nas folhas, onde forma uma barreira protetora e regula a perda de água da planta por evapotranspiração. Isto auxilia a aclimatização das plantas micropropagadas, pois a principal causa de morte durante esse processo é o estresse hídrico, pela baixa funcionalidade dos

estômatos e delgada camada de cera epicuticular (SILVA, 2007). Segundo o mesmo autor a deposição desse elemento na parede das células torna a planta mais resistente à ação de pragas e evita a desidratação através da diminuição da taxa de transpiração.

As folhas de vitroplantas possuem menos estômatos e estes são circulares em vez de elípticos (DESJARDINS et al., 1995). Isso pode explicar sua má funcionabilidade, principalmente sua dificuldade em fechar quando necessário (na aclimatização), fator essencial, para manter os níveis hídricos da planta. A anatomia foliar pode apresentar mudanças, estas ocorrem durante a aclimatização e são percebidas na maioria das folhas que se desenvolvem no cultivo *ex vitro*. No processo de aclimatização as folhas primordiais apresentam características intermediárias entre as folhas crescidas *in vitro* e as crescidas na casa de vegetação. Somente as novas folhas se assemelham as de plantas cultivadas em condições de campo.

O ambiente natural através da alta intensidade luminosa contribui para o espessamento foliar e a alongação do parênquima paliçádico (CASTRO, 2002). Folhas de plantas crescidas em ambientes ensolarados demonstram taxa fotossintética mais elevada e são menores, mais pesadas e mais espessas por unidade de área, comparadas com plantas de locais sombreados (BOARDMAN, 1977; BJORKMAN, 1981).

As plantas cultivadas *in vitro* necessitam de um período de aclimatização, para adaptar-se às condições de cultivo em campo. A etapa de aclimatização é definida como uma adaptação climática de um organismo, especialmente uma planta, que é transferida para um novo ambiente *ex vitro* (CAMPOSTRINI & OTONI, 1996).

Plântulas micropropagadas precisam de um período de aclimatização, imediatamente após a remoção do ambiente *in vitro*, que lhe permitirá adaptar-se às condições de cultivo em campo. A dificuldade de transição do mecanismo heterotrófico para autotrófico em plantas micropropagadas, em virtude das alterações epigenéticas anatômicas e fisiológicas, induzidas pelas condições *in vitro* (CAMPOSTRINI & OTONI, 1996), requer a realização de determinadas investigações, para que a aclimatização possa ter sucesso.

A germinação de sementes de Orchidaceae na natureza é pouco eficiente decorrente da necessidade simbiótica com alguns gêneros fúngicos. Entretanto, as orquídeas cultivadas *in vitro*, cuja germinabilidade é alta, no Campus Universitário de Alta Floresta MT, têm apresentado perdas de 80 a 90% do material biológico durante o processo de aclimatização (Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos). Fatores associados como a alta temperatura da nossa região podem estar contribuindo para a mortalidade dessas plantas, através da perda excessiva de água. Modificações na composição do meio de cultivo como a adição de fontes de silício, podem promover efeitos benéficos nas plantas, elevando o conteúdo de hemicelulose e lignina, aumentando assim a rigidez na parede celular, fazendo com que sejam alcançadas elevadas taxas de sobrevivência de plantas na aclimatização (CAMARGO et al., 2007).

Diante da escassez de informações a cerca do comportamento de *Catasetum x apolloi*, planta recém-descoberta e endêmica da região, objetivou-se neste trabalho estudar aspectos relativos às características de crescimento e anatomia foliar do cultivo *in vitro* em meio alternativo com adição de silicato de potássio e diferentes luminosidades, para obtenção de plantas mais resistentes no processo de aclimatização, tanto anatomicamente mas também com características fitotécnicas melhoradas.

Procurando atingir os objetivos propostos a dissertação está dividida em dois capítulos. O primeiro se intitula “Morfometria de vitroplantas de *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade com adição de silicato de potássio em meio alternativo sob diferentes fontes de luz” e o segundo capítulo “Anatomia e análise micromorfométrica foliar de *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade com adição de silicato de potássio em meio alternativo e diferentes fontes de luz.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ANDERSON, A. B. Symbiotic and asymbiotic germination and growth of *Spitanthes magnicamporum* (Orchidaceae). *Lindleyana*, v. 6, p. 183-186, 1991.

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1992.

BENELLI, P. A. **Orquideas de Mato Grosso - Genus *Catasetum* L. C. Rich ex Kunth**. Rio de Janeiro: POD Editora, 2012.

BENZING, D. H. Vascular epiphytism: taxonomy participation and adaptative diversity. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, [s.l.], v. 74, n. 2, p. 183-204, 1987.

BJORKMAN, O. Responses to different quantum fluxdensities. In: LANGE, O. L.; NOBEL P. S.; OSMONDC. B.; ZIEGLER, H. (Ed.). **Physiological plant ecology**: responses to physical environment. Berlin: Springer-Verlag, 1981. p. 57-107.

BOARDMAN, N. K. Comparative photosynthesis of Sun and shade plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 28, n. 1, p. 355-377, 1977.

BRASIL. Decreto-lei nº 2.954, de 14 de janeiro de 2004. Aprova o regulamento da lei nº 6894 de 16 de janeiro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura e da outras providências. **Normas jurídicas**. Brasília, 2004. (DEG 004954, p. 27).

BRIGGS, D.; WALTERS, S. M. **Plant Variation and Evolution**. 3. ed. Cambridge: University Press, 1997.

CALVETE, E. O. et al. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 649-653, 2002.

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

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. **Aclimatização de plantas**: abordagens recentes. Brasília: Embrapa–CNPH, 1996.

CLEMENTS, M. A.; MUIR, H.; CRIBB, P. J. A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. **Kew Bull.**, [s.l.], v. 41, n. 2, p. 437-445, 1986.

DE LA SOTA, E. R.; PAZOS, L. A. C. Two cytotypes and a new hybrid in *Salvinia* Seguier. **Acta Amazônica**, [s.l.], v. 31, n. 4, p. 557-564, 2001.

DESJARDINS, Y. Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plantlets and their effect on acclimatization. In: CARRE, F.; CHAGVARDIEFF, P. (Ed.). **Ecophysiology and Photosynthetic *in vitro* cultures**. Saint Paul lez Durance: Cadarache, 1995. p. 145-160.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides Press, 1993.

FERREIRA, W. M.; SUZUKI, R. M. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: LOIOLA, M. I. B.; BASEIA, I. G.; LICHSTON, J. E. (Org.) **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil**. Natal: Imagem Gráfica, 2008. p. 67-68.

GOBERT, V. et al. Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 89, n. 12, p. 2017-2023, 2002.

LONE, A. B. et al. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 4, p. 465-469, 2008.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997.

PASQUAL, M. et al. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira**, Lavras, v.29, n.3, p. 324-329, 2011.

PETINI-BENELLI, A.; GRADE, A. A new species of *Catasetum* for the state of Mato Grosso, Brazil. **Edinburgh Journal of Botany**, Edinburgh, v. 65, n. 1, p. 1-8, 2008.

SANTOS, A. F. et al. Otimização da propagação de *Sophranitis coccinea* (Orchidaceae) considerando meios de cultivo com adição de carvão ativado. **Horta**, [s.l.], v.46, p. 8-12, 2006.

SILVA, D. P. **Meios de cultura e fontes de silício no desenvolvimento in vitro de gérbera**. 2007. 84 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SILVA, M. F. F.; SILVA, J. B. F. **Orquídeas nativas da Amazônia brasileira II**. 2. ed. Rev. Belém: Museu Paraense Emilio Goeldi, 2010.

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.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

STEBBINS, G. L. The role of hybridization in evolution. **Proc. Am. Phil. Soc.**, [s.l.], v. 103, p. 231–251, 1959.

STUESSY, T. F. **Plant Taxonomy**: The systematic evolution of comparative data. New York: University Press, 1990.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo (Boletim técnico, 174). 1998.

TORRES, A. C. et al. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: formulações de meios de cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa Hortaliças (C.Tecn. 24), 2001.

WENDT, T. et al. Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 88, n. 10, p. 1760-1767, 2001.

### **3. CAPÍTULOS**

#### **3.1 MORFOMETRIA DE VITROPLANTAS DE *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade COM ADIÇÃO DE SILICATO DE POTÁSSIO EM MEIO ALTERNATIVO EM DIFERENTES FONTES DE LUZ<sup>1</sup>**

**Resumo-** EBURNEO, Ligia. M.Sc. Universidade do Estado de Mato Grosso, Março de 2014. (Morfometria de vitroplantas de *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade com adição de silicato de potássio sob diferentes fontes de luz) Orientadora: Profa Dra Ivone Vieira da Silva. *Catasetum x apolloi* é um híbrido natural recém-descoberto na região norte de Mato Grosso, sendo endêmico deste local, e apresenta dificuldade de germinação em seu habitat natural, a vitrocultura contribui nesse processo. O objetivo do presente estudo foi avaliar se a inclusão de silicato de potássio no meio de cultura alternativo com diferentes luminosidades, facilita o transplante e sua aclimatização. As sementes foram germinadas em meio alternativo, durante 60 dias em sala de crescimento. Logo após, 5 protocormos foram inoculados no meio de cultura alternativo, acrescidos de silicato de potássio (0,0; 0,5; 1,0 mL L<sup>-1</sup>). As culturas foram nos dois ambientes por 90 dias. O K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> não interferiu no parâmetro peso da massa fresca, comprimento da maior folha e número de folhas. O comprimento total da planta está correlacionado com o maior tamanho das raízes (1 mL L<sup>-1</sup>) de K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> em ambiente natural. Maiores teores de clorofila ocorreram em ambiente com luz artificial na concentração de 0,5 mL L<sup>-1</sup> de silicato e 1 mL L<sup>-1</sup> e quantidades de pseudobulbos com 1 mL L<sup>-1</sup> e 0,0 mL L<sup>-1</sup> luz/natural, 0,5 mL L<sup>-1</sup>, luz/artificial, respectivamente. Houve interação do silicato com as variáveis analisadas, havendo crescimento de raízes em todos os tratamentos, porém com decréscimos proporcionais ao aumento das doses.

Palavras-chave: Aclimatização; amazônia; micropropagação; orquídeas.

**Abstract-** EBURNEO, Ligia. M.Sc. University of Mato Grosso State, March 2014. (*Catasetum x apolloi* Benelli & Grill vitroplants morphometry with addition of potassium silicate under different light sources) Advisor: Dra Ivone Vieira da Silva.

The studied orchid is a natural hybrid recent discovered in northern Mato Grosso, being endemic to this place and it show germinating issues in their natural ecosystem, vitro culture contributes to this process. The aim of this study was to evaluate if potassium silicate addition in the alternative growth media in different light levels, aiding transplanting and their acclimatization process. The seeds were germinated in alternative growth media for 60 days in a growth room. Afterwards, five protocorms were inoculated on the alternative growth media plus potassium silicate (0.0, 0.5, 1.0 mL L<sup>-1</sup>). Cultures were in both environments for 90 days. The K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> did not interfere in fresh mass weight parameter, longest leaf length and number of leaves. The total plant length is correlated with the largest root size (1 mL L<sup>-1</sup>) of K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> in natural light. Higher chlorophyll content were found in artificial light environment at 0.5 mL L<sup>-1</sup> silicate and 1 mL L<sup>-1</sup> and pseudobulbs amounts with 1 mL L<sup>-1</sup> and 0.0 mL L<sup>-1</sup> natural/light, 0,5 mL L<sup>-1</sup>, artificial/light, respectively. There was interaction between silicate and the analyzed traits, root growth was found in all treatments, but a decrease could be observed proportional to the doses increase.

**Keywords** : acclimatization; amazon; micropropagation; orchids.

## Introdução

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de grande valor comercial, devido, principalmente, à sua capacidade de combinação genética, à beleza, forma e cor de suas flores. Porém devido a depredação humana, muitas espécies têm desaparecido de seu habitat natural, pela retirada indiscriminada de espécimes.

Orchidaceae é considerada uma das maiores famílias botânicas em número de espécies. Estima-se uma variação entre 20.000 e 35.000 espécies distribuídas em mais de 800 gêneros e 120.000 híbridos (SOUZA & LORENZI, 2005). Porém, este número tende sempre a aumentar, a cada ano novas descobertas são feitas (SILVA & SILVA, 2010), sendo identificadas mais de 3.500 espécies no Brasil.

Dentre os gêneros de Orchidaceae, *Catasetum* Rich. ex Kunth apresenta 95 espécies e sete híbridos naturais ocorrentes no Brasil, das quais 28 espécies foram confirmadas para Mato Grosso. Destas, 21 espécies são relatadas para a porção amazônica de Mato Grosso (PETINI-BENELLI, 2012).

*Catasetum apolloi* Benelli & Grade foi descrita como uma nova espécie em 2008 (BENELLI & GRADE, 2008), encontrada na região norte do Mato Grosso. É uma espécie endêmica e as pesquisas relacionadas são incipientes, principalmente pela recente descoberta e pelo seu endemismo. Em 2012, depois de pesquisas com polinização induzida as autoras Benelli & Grade constataram que se tratava de um híbrido natural através do cruzamento entre *Catasetum schimitdianum* e *Catasetum longifolium*. Depois da correção taxonômica ficou descrito mais um híbrido natural *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade para Mato Grosso- Amazônia Meridional (PETINI-BENELLI, 2012).

A micropropagação é utilizada para a propagação clonal em grande escala de plantas comercialmente importantes, como, por exemplo, espécies da família Orchidaceae. As maiores vantagens do cultivo *in vitro* são a multiplicação rápida e a obtenção de populações homogêneas oriundas de matrizes melhoradas geneticamente (GOVIL & GUPTA, 1997). Os métodos convencionais de propagação vegetativa pela separação, divisão de touceiras ou de pequenas mudas que se formam nos rizomas e em hastes florais são

extremamente demorados, apesar de propiciarem uma descendência geneticamente idêntica à planta matriz (SAGAWA & KUNISAKI, 1984).

O pleno desenvolvimento de vitroplantas está relacionado diretamente à composição do meio de cultura. Várias substâncias vêm sendo utilizadas como formas alternativas na propagação *in vitro* como: água de coco, diferentes fertilizantes e polpa de frutas (PEDROSO-DE-MORAES, 2000). Muitos meios de cultura têm sido testados, sendo identificado pela composição de sais minerais, enquanto as vitaminas, os reguladores de crescimento e outros suplementos variam na concentração (Campos, 2004). A escolha do meio depende da espécie em questão e do propósito da cultura (NASCIMENTO et al., 2010).

Por não ser considerado um elemento essencial às plantas, o silício (Si) não tem sido muito estudado na micropropagação de plantas, poucos relatos são descritos na incorporação desse nutriente aos meios de cultura. Contudo, do ponto de vista fisiológico, para o crescimento e o desenvolvimento das plantas, o silício já apresentou efeito benéfico sobre o aumento de produção de diversas culturas (GOMES et al., 2008). Acredita-se que ele possa favorecer a arquitetura das plantas e a fotossíntese, ao proporcionar folhas mais eretas, com maior eficiência fotossintética (DEREN et al., 1993).

Outro fator relevante para o melhor desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro* vem sendo citado com a utilização de luz natural, a qual vem apresentando várias vantagens, como a eliminação dos gastos com luz artificial, com instalações simples e, durante a aclimatização o estresse causado à planta é menos intenso (KODYM & ZAPATA-ARIAS, 1999). No entanto, a disponibilidade de luz varia com a intensidade do sol, que depende das condições climáticas, da hora do dia e da época do ano de cada região (ERIG et al., 2005)

Nas regiões tropicais e subtropicais, os efeitos das mudanças climáticas são pequenos, entretanto em regiões de clima temperado, estes podem ser aumentados, desta forma a tomada de decisão pela utilização ou não da luz natural depende da espécie, da técnica *in vitro* utilizada (heterotrófica,

fotomixotrófica ou fotoautotrófica) e das condições climáticas locais (KODYM & ZAPATA-ARIAS, 1999).

Nesse contexto o objetivo desse trabalho foi avaliar se a inclusão de silicato de potássio no meio de cultura alternativo, associado a diferentes fontes de luminosidades contribui para o melhor desenvolvimento de *Catasetum x apolloi*, facilitando o transplante para o cultivo *ex vitro* e sua aclimatização.

## Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais e no Laboratório de Biologia Vegetal, da Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Alta Floresta - MT (UNEMAT), no período entre julho de 2012 e abril de 2013.

Neste trabalho foram utilizadas sementes provenientes da espécie *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade do Orquidário Alta Florestense do *Campus* de Alta Floresta - MT. As sementes foram retiradas de frutos maduros, armazenadas a 4°C, durante cerca de 24 h para a semeadura *in vitro*. As sementes foram embebidas em água destilada e desinfestadas durante trinta minutos sob agitação, e posteriormente tratados com solução de 15% (v v<sup>-1</sup>) de hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro) durante dez minutos. Em seguida na câmara de fluxo laminar com o auxílio de uma micropipeta e ponteiras esterilizadas, a solução de hipoclorito foi retirada e as sementes lavadas três vezes em água destilada e esterilizada.

Foram inoculadas 2 mL da solução de água destilada com sementes no meio de cultura alternativo constituído de 30 g L<sup>-1</sup> de açúcar comercial, 2 g L<sup>-1</sup> de fertilizante B&G<sup>®</sup>, 200 mL L<sup>-1</sup> de água de coco e 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Foram gelificados com 4 g L<sup>-1</sup> de Agar, segundo metodologia de Rodrigues et al., (2012). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,5 ± 0,05. Anteriormente à adição do Agar, foram distribuídos em frascos de vidro de 500 mL, sendo que em cada frasco foram colocados 100 mL de meio de cultura e autoclavados a 121°C sobre pressão de 1 kgcm<sup>2</sup> por 20 minutos.

Os tratamentos foram mantidos à luz (2.000 lux) por 16 horas diárias a uma temperatura de 27 ± 1°C, durante 60 dias. Os tratamentos foram observados semanalmente durante este período para avaliar o desenvolvimento dos protocormos em plântulas.

Após 60 dias a partir da germinação das sementes, cinco protocormos de aproximadamente 0,5 cm de comprimento foram inoculados em frascos com capacidade para 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura alternativo (RODRIGUES et al., 2012), acrescido de silicato de potássio (0,0 ; 0,5; 1,0 mL L<sup>-1</sup>), pH ajustado para 5,5 ± 0,5 e gelificado com 4g L<sup>-1</sup> de ágar antes do

processo de autoclavagem a 121°C e 1 kgcm<sup>2</sup> por 20 minutos. As culturas foram mantidas sob luz natural e luz artificial por 90 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 3 (2 ambientes e 3 concentrações de silicato de potássio), com 4 repetições para cada tratamento. Os tratamentos foram: TAA (Tratamento em Ambiente Artificial) nas doses 0,0; 0,5 e 1,0 mL L<sup>-1</sup> de silicato de Potássio em meio alternativo – TAN (Tratamento em Ambiente Natural) nas doses 0,0; 0,5 e 1,0 mL L<sup>-1</sup> de silicato de Potássio em meio alternativo.

Ao final de 150 dias de cultivo 10 plantas de quatro repetições foram retiradas aleatoriamente e analisadas as variáveis: comprimento da maior folha, maior raiz e comprimento total da planta; peso da massa fresca; quantidade total de folhas e raízes; presença e ausência de pseudobulbo e foi medido o teor de clorofila total. As medidas em milímetros foram realizadas por meio de paquímetro digital da marca instrutherm<sup>®</sup>. Os valores de luminosidade foram coletados durante 30 dias às 09:00, 13:00 e 15:00 h, com o auxílio de um luxímetro digital da marca instrutherm<sup>®</sup>, sob cada condição, sendo a seguir calculada uma média diária e posteriormente uma média do período.

No ambiente artificial, na sala de crescimento, a iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia especial (OSRAM<sup>®</sup> 20 W), com irradiância média de 602,27 Lux (lúmem/m<sup>2</sup>), fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 22 ± 2°C. No ambiente natural (sala climatizada com iluminação natural), apresentando os seguintes parâmetros ambientais: temperaturas máximas e mínimas de 32,05°C e 23,05°C, e níveis de irradiância de 939,21 Lux (lúmem/m<sup>2</sup>).

As medidas para temperatura máxima e mínima foram registradas com um termômetro. Os teores de clorofila total foram estimados utilizando o medidor portátil Chlorophyll meter, mod Spad 502<sup>®</sup> (Soil plant Analysis Development, Minolta Câmera Co. Ltd., Osaka, Japão), sendo que para obtenção da média foram analisadas quatro medidas, uma na base, duas no terço médio e uma no ápice foliar, utilizando a 3ª folha. No total foram avaliadas 10 folhas por repetição, completamente distendidas. Os valores foram expressos em índice de clorofila em ambiente com luminosidade natural e artificial.

Para cada parâmetro quantitativo analisado as médias do tamanho da maior raiz, número de raízes, número de folhas, tamanho da maior folha, peso da massa fresca e teor de clorofila foi realizado tratamento estatístico a partir da análise de regressão linear através do programa estatístico: pelo programa Sisvar (FERREIRA, 2003), (Prob < 5%) em função das doses de  $K_2SiO_3$ . Para a variável qualitativa para presença e ausência de pseudobulbos foi realizado o teste Qui-Quadrado a 5% de probabilidade do erro tipo 1.

## Resultados e Discussão

Ocorreu formação de raízes em todos os tratamentos. Constatou-se que a interação do silicato com as variações de luminosidade, propiciou um decréscimo no número de raízes para as duas concentrações 0,5 mL L<sup>-1</sup> e 1 mL L<sup>-1</sup>, com luminosidade natural (Gráfico 1), sendo mais acentuada com o aumento das doses, quando comparado com o meio alternativo.

No ambiente com luz natural e 1 mL L<sup>-1</sup> de silicato de potássio, a média para quantidade de raízes foi de 2,6%. Na dose de 0,5 mL L<sup>-1</sup> apresentou quantidade de 3,17% de raízes, contrastando com o tratamento controle no meio alternativo que apresentou média superior aos tratamentos com silicato de potássio com um total de 3,67% raízes por planta. Havendo um efeito linear decrescente para as concentrações de silicato de potássio.

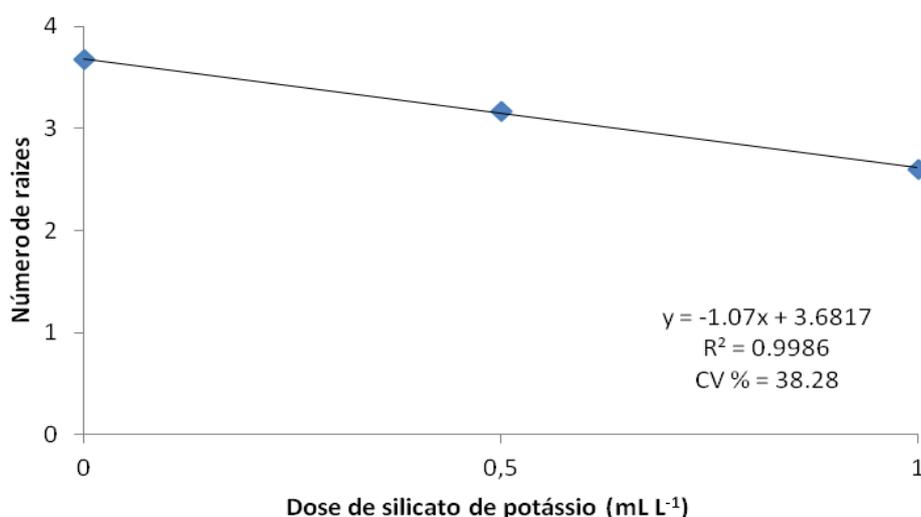


Figura 1. Número de raízes de *Catasetum x apolloi* cultivadas in vitro com diferentes concentrações de silicato de potássio e com luminosidade natural.

O resultado observado no presente trabalho para a espécie estudada diferencia do obtido por outros autores, onde as adições de fontes de silício aumentaram o número de raízes quando as doses de silicato eram maiores, este fato deve ser correlato com as fontes de silício utilizada e também da espécie estudada. Soares et al., (2011), demonstram que houve formação de raízes em todos os tratamentos que continham as duas fontes de silício (silicato de potássio e silicato de sódio) e também no tratamento-controle, esse

mesmo resultado foi observado com *Catasetum x apolloi* que apresentou desenvolvimento de raízes em todos os tratamentos.

Maiores concentrações de silicato de potássio propiciando um decréscimo no número de raízes possivelmente esta relacionado como a espécie em questão. A espécie respondeu de forma diferenciada quando relacionada à quantidade de nutrientes adicionados nos meios de cultura, já que as orquídeas epífitas não requerem grande exigência nutricional. Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos vegetais fornecem as substâncias essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento *in vitro* (TORRES,1998). As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas *ex vitro*, são conservadas em material vegetal *in vitro*. Por isso os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender as necessidades específicas *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

Oliveira & Faria, (2005) estudando a espécie *Catasetum fimbriatum*, obtiveram maior formação de número de raízes em meio MS modificado com a metade dos macronutrientes e com o meio à base de adubo NPK (10-30-20). Essas divergências nas formulações dos meios de cultura são fatores intrínsecos que podem ou não favorecer o desenvolvimento de raízes, pois cada espécie tem suas peculiaridades e necessidades nutricionais específicas.

Villa et al., (2006) observaram em amoreira preta (*Rubus* spp.) maior absorção de nutrientes em meio MS modificado, ocasionando aumento no seu sistema radicular corroborando com este estudo no qual o maior número de raízes foi no tratamento controle com meio alternativo, sem a adição de silicato de potássio. Segundo Malavolta 2006, o silicato de potássio em altas doses pode prejudicar a planta causando toxicidade, dessa forma como o meio alternativo já possuía potássio esse fator deve ser considerado relevante à diminuição no número de raízes formadas.

Perante os parâmetros analisados para comprimento da maior raiz, houve maior crescimento, quando estas foram submetidas aos tratamentos com adição de silicato de potássio ao meio de cultura (Figura 2), demonstrando diferenças estatísticas para os dois fatores: luminosidades e doses.

O maior comprimento das raízes foi verificado no ambiente com luminosidade natural em presença da aplicação de silicato de potássio na dosagem de 1 mL L<sup>-1</sup> com média de 16 cm (Gráfico 2). Para o ambiente com luminosidade artificial em presença de 1 mL L<sup>-1</sup>, o tamanho médio foi de 12 cm (Gráfico 2-A)

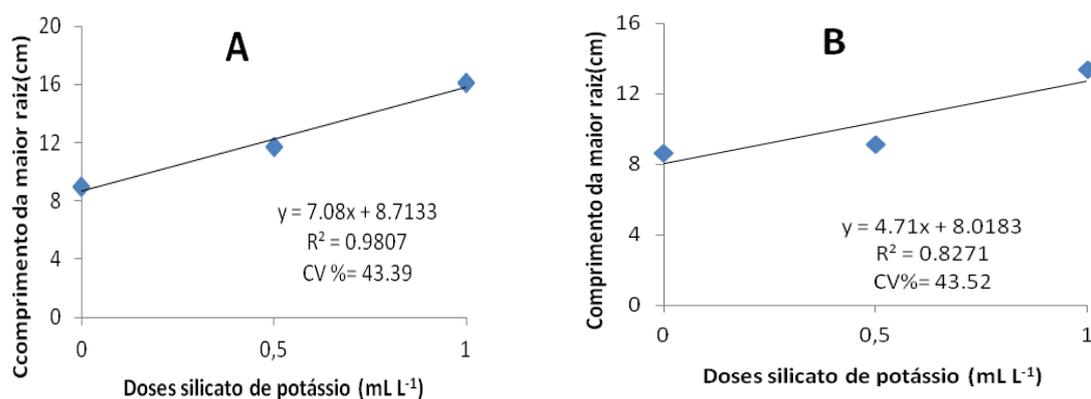


Figura 2. Comprimento da maior raiz (cm) de *Catsetum x apolloi* cultivadas in vitro com diferentes concentrações de silicato de potássio e com luminosidade natural e artificial.

A luminosidade pode degradar compostos fenólicos. Alguns inibidores de crescimento são substâncias de natureza fenólica, como o ácido salicílico, o ácido cumárico, o ácido clorogênico e a cumarina, as quais podem retardar processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, como alongamento de raízes e caules e a germinação de sementes (VON-PINHO & KIKUTI, 2004). Os ambientes com luminosidade natural e artificial não causaram inibição no crescimento de raízes ao contrário, no presente trabalho ocorreu alongamento das mesmas.

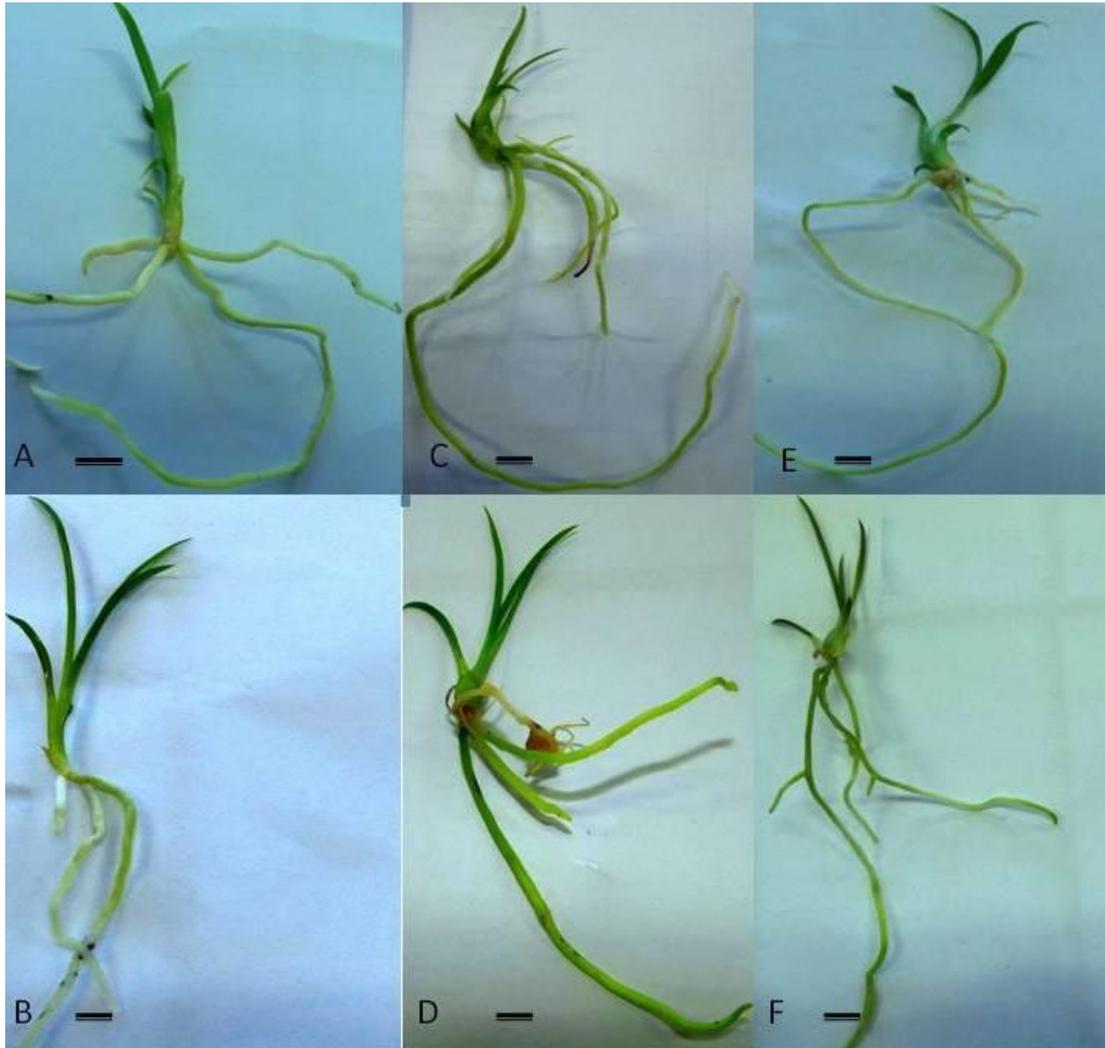


Figura 3. Vitroplantas com meio alternativo/luz natural; B- Meio alternativo/luz artificial; C- Meio alternativo com 0,5 mL L<sup>-1</sup>/luz natural; D- Meio alternativo com 0,5 mL L<sup>-1</sup>/luminosidade artificial; E- Meio alternativo com 1m L<sup>-1</sup>/luz natural; F- Meio alternativo com 1mL L<sup>-1</sup>/luminosidade artificial. Barra = 2,5 cm (A-F).

Pode-se inferir que doses crescentes de silicato de potássio estimularam maior incremento de massa e alongamento celular, promovendo maior crescimento das raízes (Figura 1). Os resultados aqui encontrados discordam com Oliveira & Faria (2005), que em estudo comparativo entre os meios MS, Knudson C, Vacin e Went e meios à base de adubos NPK 10-5-5 e NPK 10-30-20, na concentração de 3,0 g L<sup>-1</sup>, obtiveram as melhores médias para comprimento da maior raiz nas espécies *Catasetum fimbriatum* e *Cyrtopodium paranaenses*, quando utilizaram o meio à base do adubo NPK (10-05-05), ou seja com menores concentrações de potássio ao meio de cultura. Este fato

pode ter ocorrido decorrente da formulação dos nutrientes incluídos ao meio de cultura

Asmar et al. (2011) relatam em pesquisas realizadas com cultivo *in vitro* de bananeiras utilizando o silicato de potássio ( $K_2SiO_3$ ), que o silício concentrou-se nas raízes, indicando reduzida distribuição e translocação para as folhas. Neste trabalho resultados semelhantes foram observados, já que o tamanho das raízes foram maiores que a parte aérea, indicando que o silicato de potássio propiciou o alongamento das raízes.

Em substratos com poucas reservas nutricionais, aumentar o comprimento das raízes é primordial para que estas possam absorver com mais funcionalidade esses nutrientes. Diante do exposto, neste trabalho observou-se que a quantidade de nutrientes para a planta em estudo eram suficientes para seu desenvolvimento e conforme Grataplaglia (1998), a manipulação de plantas cultivadas *in vitro* com raízes nuas ou que precisam ser podadas, muitas vezes resultam em má qualidade do transplante e até na morte das plantas. Desta forma fica implícito que tamanhos menores de raízes são fundamentais para se obter maior número de plantas saudáveis na aclimatização, inferindo que doses menores de silicato de potássio (0,0 e  $0,5\text{ mL L}^{-1}$ ) para a espécie são fundamentais.

A porcentagem de formação de pseudobulbos (Tabela 1), demonstrada através dos testes analisados, evidencia que com a aplicação de  $0,5\text{ mL L}^{-1}$  de silicato de potássio ocorreu diferença significativa para o ambiente com luminosidade natural e artificial, sendo que o ambiente com luminosidade artificial propiciou o maior aumento na quantidade de plantas com pseudobulbos. Resultados obtidos em estudos com *Phalenopsis* (ZHOU, 1995) e *Solanum esculentum* (ROMERO-ARANDA et al., 2006), demonstram que para o crescimento da parte aérea das plantas a sala de crescimento com luminosidade artificial foi mais eficiente, corroborando com os dados encontrados para *Catasetum x apolloi*.

Os melhores tratamentos para a presença de pseudobulbos é o meio alternativo sem a adição de silicato de potássio, nas duas condições de luminosidade e o tratamento com  $0,5\text{ mL L}^{-1}$  de silicato de potássio em

ambiente artificial. Acredita-se aqui que as altas temperaturas provocaram um decréscimo na formação de pseudobulbos em ambiente natural.

Tabela 1. Porcentagem de pseudobulbos de *Catasetum x apolloi* mediante aplicação de diferentes concentrações de silicato de potássio.

Doses (mL L <sup>-1</sup> ) de K <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	Porcentagem de pseudobulbos	
	Luz Natural	Luz Artificial
0,0	82.5 Aa	75 Aa
0,5	60.0 Ba	80 Aa
1,0	27.5 Cb	52.5 Ba

Média seguida da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste qui-quadrado, a 5% de probabilidade de erro tipo 1.

Este resultado deve ser decorrente da diferença de temperatura entre os dois ambientes, já que no ambiente com luminosidade natural as temperaturas apresentaram máximas e mínimas de 32,05°C e 23,05°C, inferindo a possibilidade da água disponível para a formação dos pseudobulbos ter se translocado para outras partes da planta, para manter seu equilíbrio osmótico, pois as vitroplantas estão sujeitas ao aumento e oscilação de temperatura dentro dos frascos.

Um decréscimo maior no desenvolvimento de pseudobulbos foi observado quando aplicado ao meio de cultura 1 mL L<sup>-1</sup> de silicato de potássio em ambiente natural, onde somente 27,5% das plantas apresentaram pseudobulbos. Nesse mesmo tratamento em ambiente artificial houve um acréscimo do dobro de pseudobulbos formados quando comparados com ambiente de luminosidade natural, apresentando um total de 52.5%, indicando que a temperatura da sala de crescimento influenciou diretamente os resultados obtidos e também menores doses de silicato.

O meio de cultura alternativo teve em sua composição 200 mL L<sup>-1</sup> de água de coco. Soares et al., 2013 também encontrou resultados positivos quando utilizou meios alternativos para cultura *in vitro* de *Dendrobium nobile* com a adição de 200 mL L<sup>-1</sup> de água de coco ao meio de cultura a qual promoveu os melhores resultados para comprimento, diâmetro e número dos pseudobulbos, número de folhas, número de raízes, comprimento de raízes e

massa fresca de *Dendrobium nobile*, não influenciando apenas a porcentagem de germinação e o número de plântulas produzidas.

A água de coco é o componente orgânico mais utilizado no enriquecimento de meios de cultura, porém seus efeitos em relação à promoção da germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas precisam ser mais pesquisados uma vez que é constituída por diversas classes de hormônios vegetais tais como ácido indol acético, ácido indol butírico, ácido abcísico, ácido giberélico, zeatina, benzil adenina, ácido naftalenoacético e ácido diclorofenoxiacético (MA et al., 2008). O efeito benéfico da adição de água de coco pode ser explicado pelos elevados teores de glicose, frutose e sais minerais, além de hormônios vegetais, necessários ao processo de formação e desenvolvimento das plântulas (NUNES et al., 2008).

Como citado acima a água de coco contém muitos hormônios, os quais podem ter favorecido a formação de pseudobulbos, mesmo não tendo sido avaliado os componentes nutricionais dessa substância neste trabalho. Pois sabe-se que os nutrientes da água de coco auxiliam o processo de ramificação tanto da parte aérea (no caso das orquídeas o número de pseudobulbos) quanto das raízes (BERLETH et al., 2004).

Verifica-se que as baixas concentrações de sais minerais foram essenciais para a espécie em estudo na medida em que proporcionaram, em geral, maior crescimento. Tal hipótese é reforçada pelo fato de espécies de orquídeas cultivadas *in vitro* necessitarem de baixa concentração de sais minerais no meio de cultura (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009; CORDEIRO et al., 2011; CUNHA et al., 2011), principalmente as orquídeas epífitas, já que vivem em habitat com baixa quantidade de nutrientes (STANCATO, 2008).

A variável analisada para número de folhas por planta demonstra que o silicato de potássio não promoveu diferença significativa entre o ambiente natural e as doses de 0,0 mL L<sup>-1</sup> (4,37); 0,5mL L<sup>-1</sup> ( 4,62) e 1,0 mL L<sup>-1</sup> (4,35). Para o ambiente com luminosidade artificial as médias observadas foram: dose 0,0 mL L<sup>-1</sup>(4,37); 0,5mL L<sup>-1</sup>(4,70) e 1,0 mL L<sup>-1</sup> (4,57). Observando os dados é possível inferir que mesmo não havendo diferença estatística a dose de 0,5mL

L<sup>-1</sup> nos dois ambientes testados propiciou um aumento na média do número de folhas.

A relação entre o transporte de açúcares e o K sugere que plantas cultivadas *in vitro* sejam muito mais sensíveis à deficiência deste nutriente no meio. Diversos trabalhos relatam que tanto a dose de K interfere no crescimento de plantas cultivadas *in vitro*, mas também a fonte usada, uma vez que o K entra como íon acompanhante de nitrato, cloreto ou sulfato (CALDAS et al., 1998; JUNQUEIRA et al., 2003; VILLA et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2008). Maior quantidade de folhas pode determinar maior área fotossintética e, conseqüentemente maior produção de fotoassimilados, com melhor desenvolvimento da plântula, em especial durante a fase de aclimatização.

Resultados com outra fonte de silício foram relatados por Pasqual et al. (2011), analisando-se o número de folhas das duas espécies de orquídeas: *Laelia cattleya* Culminant "Tuilerie" x *Laelia cattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaelia cattleya* Startifire Moon Beach. Os autores observaram um comportamento semelhante entre as duas, obtendo melhores resultados na presença de luz artificial, sendo que a orquídea híbrida apresentou maior número de folhas (6,56) com a utilização de 1,1 mg L<sup>-1</sup> silicato de cálcio e a espécie nativa (7,72) com a utilização de 0,7 mg L<sup>-1</sup> de silicato de cálcio. Ambas mostraram decréscimo no número de folhas com o aumento na concentração de silicato de cálcio. O silício segundo Malavolta, 2006 é um elemento benéfico às plantas principalmente por promover aumento na capacidade fotossintética e também aumento no número de folhas. Analisando os tratamentos com silicato de potássio verifica-se que tanto o K quanto o Si podem aumentar o número de folhas de plantas cultivadas *in vitro*, mesmo que esse aumento não tenha sido significativo nos testes estatísticos, verifica-se que a dose de 0,5mL L<sup>-1</sup> nos dois ambientes testados propiciou um aumento na média do número de folhas.

Nesta pesquisa, não houve resultado significativo através dos testes de regressão linear na quantidade de folhas com a aplicação de silicato de potássio quando comparado com o meio alternativo sem a adição de silicato de potássio, esse resultado pode ser decorrente da utilização de diferentes

nutrientes na formulação do meio de cultura, os quais podem ter suprido as necessidades nutricionais da planta. O número de folhas por planta para *Catasetum x apolloi* foi acima de quatro, sendo possível afirmar que esta quantidade de folhas são suficiente para a espécie ou o gênero, se aclimatar.

A variável quantitativa analisada através de regressão linear para tamanho da maior folha apresentou as seguintes médias: ambiente com luminosidade natural nas doses de 0,0 mL L<sup>-1</sup> (4,02cm); 0,5mL L<sup>-1</sup> (4,20 cm) e 1,0 mL L<sup>-1</sup> (4,26 cm). Para o ambiente com luminosidade artificial as médias observadas foram: dose 0,0 mL L<sup>-1</sup> (4,63 cm); 0,5mL L<sup>-1</sup> (5,01cm) e 1,0 mL L<sup>-1</sup> (5,21cm), não havendo diferença estatística entre os fatores estudados. Porém é possível afirmar que a aplicação de silicato de potássio ao meio alternativo promoveu um pequeno aumento no comprimento das folhas sendo mais representativo com o aumento das doses e que o ambiente com luminosidade artificial propiciou melhores resultados. Pasqual et al., (2011) encontrou resultados semelhantes trabalhando com orquídeas para a variável ambiente, observando maior tamanho da parte aérea na sala de crescimento, com a adição de 2mg L<sup>-1</sup> de silicato de cálcio. O mesmo autor relata que para a espécie nativa (*Brassavola perrine*), o maior comprimento foi obtido com a utilização de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de silicato de cálcio, também em sala com iluminação artificial. Como a fonte de silício são diferentes, é pertinente inferir que o silício, por ter a capacidade de aumentar a parede celular promoveu tal crescimento.

Os benefícios do silicato de potássio são atribuídos ao efeito conjunto de silício e do potássio na nutrição e na produção das plantas (SOUZA et al., 2010).

Além dos nutrientes as plantas necessitam de outros fatores para completar seu ciclo de vida, como luminosidade e temperatura adequadas a cada espécie. Contudo, nesse experimento não houve diferenças estatísticas entre os ambientes com luz natural e artificial, demonstrando a plasticidade dessa espécie em relação ao tamanho da maior folha e ao peso da massa fresca. Provavelmente, essas orquídeas se adaptariam facilmente em ambientes com temperaturas médias de 22 a 32,05°C, predominantes durante o experimento e que também são características em nossa região.

No meio alternativo foi utilizado água de coco e segundo Aragão (2001), essa adição ao meio o deixa mais nutritivo, pois nela estão contidos vários tipos de nutrientes e também vitaminas. Em 100 mL de água de coco tem 175 mg de potássio, essa dosagem de potássio pode ter sido suficiente para que a planta de *Catasetum x apolloi*, tenha apresentado similaridade nos resultados do meio alternativo sem a adição de silicato com os meios acrescidos de silicato de potássio, já que é uma planta epífita com baixas exigências nutricionais.

A média do comprimento total, através da análise de regressão linear, demonstrou interação benéfica entre os fatores analisados onde a luz natural (Gráfico 3A) associada à inclusão de silicato de potássio ao meio de cultura, na concentração de 1 mL L<sup>-1</sup> propiciou maior crescimento da planta com cerca de 20,20 cm (Gráfico 3A).

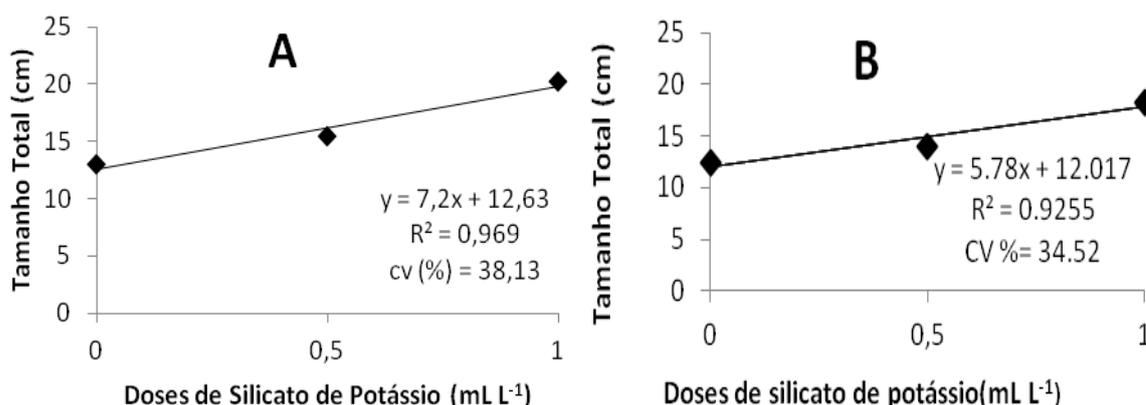


Figura 4. Média do comprimento total (cm) de *Catasetum x apolloi* cultivadas in vitro com diferentes concentrações de silicato de potássio e com luminosidade natural (A) e artificial (B).

A técnica de alteração da fonte de luz artificial para luz natural foi benéfica para o crescimento da planta, porém esta alteração é ainda bastante questionada por causa da escassez de informações sobre os efeitos causados nas culturas *in vitro*, muito embora Soares et al., (2013), afirmam que esta técnica é viável para o desenvolvimento de vitroplantas, e que pode ser utilizada para obtenção de plantas mais capacitadas a sobrevivência no processo de aclimatização e também possuir menor custo para o consumidor.

A temperatura é um dos fatores questionados no ambiente com luminosidade natural, pois dentro dos frascos de cultivo o calor é mais intenso, havendo, portanto maior evaporação. Contudo Ahloowalia & Savangikar (2004)

afirmam que muitas plântulas cultivadas *in vitro* são capazes de tolerar altas oscilações de temperatura, e se adaptam melhor às condições de campo, quando aclimatizadas, do que aquelas que são cultivadas sob a mesma temperatura. Kodym & Zapata-Arias (1999), afirmam que além dos reguladores de crescimento, a luz também influencia consideravelmente a taxa de multiplicação e o crescimento de explantes cultivados *in vitro*.

Segundo Soontouchainaksaeng et al., (2001), o crescimento das plantas é controlado por uma série de reguladores de crescimento, como a auxina, que é sensível a elevadas intensidades de luz. Neste experimento a luminosidade natural atingiu a média de 939,21 Lux ( lúmem m<sup>2</sup>), divergindo da sala de crescimento que apresentou 602,27 Lux (lúmem/m<sup>2</sup>). Mesmo diante das médias superiores de luminosidade no ambiente natural, nesse trabalho houve maior desenvolvimento das plantas, é possível considerar, portanto que a irradiância não afetou a auxina, degradingando-a e também que o silicato de potássio associado a luminosidade propiciou esse crescimento.

Na concentração de 0,5 mL L<sup>-1</sup>, também houve maior desenvolvimento, quando comparado ao tratamento com meio alternativo sem a adição de silicato, conferindo um comprimento de 15,5 cm no ambiente com luminosidade natural. Os dados apresentados sugerem efeitos benéficos na adição de silício (Si) ao meio de cultura e no cultivo de plântulas nos dois ambientes (luz artificial e natural), pois no ambiente artificial (Gráfico 3B), as plantas atingiram o maior comprimento na dose de 1,0 mL L<sup>-1</sup> de silicato de potássio com(18,27cm). Os maiores valores para crescimento de plântulas tratadas com Si sugerem que, além dos efeitos benéficos do Si em reter água (TRENHOLM et al., 2004), aumentando assim a eficiência na fase de aclimatização, o mesmo pode estar envolvido no metabolismo da parede celular, melhorando a capacidade das células em expandir, e conseqüentemente, aumentando o dimensionamento da célula (ROMERO-ARANDA et al., 2006).

Para o peso da massa fresca não houve diferença estatística entre as doses e também para a fonte de luminosidade, porém é possível verificar que ocorreu um pequeno ganho na massa quando aumentou a dosagem de silicato de potássio para 1mL L<sup>-1</sup>, nos dois ambientes (Tabela 2). Observando também que ocorreu um bom desenvolvimento da plântula, principalmente porque o

gênero *Catasetum* possui folhas delgadas e mesmo assim obteve um peso satisfatório para seu crescimento *ex vitro*.

Tabela 2. Peso da Massa Fresca de *Catasetum x apolloi* mediante aplicação de diferentes concentrações de silicato de potássio em ambiente com luminosidade artificial e natural.

Doses K <sub>2</sub> Sio <sub>3</sub>	PMF (mg)	
	Ambiente Natural	Ambiente Artificial
0	0,585 a	0,500 a
0,5	0,590 a	0,547 a
1,0	0,645 a	0,610 a
CV(%)	38,60	21,20

Médias seguida da mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey , a 5% de probabilidade( Ferreira, 2003).

A banana tem alto teor de potássio, tal constatação corrobora com experimentos *in vitro* realizados para várias culturas, os quais demonstraram que a polpa da banana é o melhor suplemento para a diferenciação de órgãos e promotor do crescimento de raízes e folhas (VALMAYOR & PRICE, 1970; ARDITTI, 1992; CALDAS et al.,1998) e tem apresentado resultados positivos para o crescimento de várias plantas quando implementado aos meios de cultura (VIDOZ et al., 1999), porém com o acréscimo de silicato de potássio ao meio de cultura, não ocorreu diferenciação estatística quanto ao meio alternativo utilizado como testemunha. As diferenças entre esses dados e de outros experimentos podem ser decorrentes da especificação dos meios de cultura para cada espécie, uma vez que diferentes combinações de carboidratos, sais minerais, vitaminas e reguladores de crescimento estimulam, ou não, o crescimento de órgãos, tecidos ou células e o desenvolvimento da planta (GEORGE et al., 2008).

Além dos componentes do meio de cultura otimizado para cada espécie ou gênero, as plantas necessitam de outros fatores para completar seu ciclo de vida, como luminosidade e temperatura adequadas a cada espécie. Contudo, nesse experimento não houve diferenças estatísticas entre os ambientes com luz natural e artificial, demonstrando a plasticidade dessa espécie em relação

ao peso da massa fresca. Provavelmente, essas orquídeas se adaptariam facilmente em ambientes com temperaturas médias de 22 a 32,05°C, predominantes durante o experimento e que também são características em nossa região.

Não há equação de regressão que explique a relação concentração de silicato com o teor de clorofila (Gráfico 4), pois a função linear para luz natural não deram significância ao nível de 5% de probabilidade de erro tipo 1, perante a ANOVA de regressão ( $Pr > F = 0.9070$ ). Um dos fatores ligados à eficiência fotossintética de plantas e conseqüentemente ao crescimento e adaptabilidade a diversos ambientes é a clorofila.

Não só a concentração total de clorofila, mas também a proporção entre os diversos tipos desta mudam em função da intensidade luminosa. De uma maneira geral demonstra-se que a proporção entre clorofila *a* e *b* tende a diminuir com a redução da intensidade luminosa. (BOARDMAN, 1977; KRAMER & KOZLOWSKI, 1979; WHATLEY & WATLEY, 1982; TINOCO & VASQUEZ-YANES, 1982; GRAÇA, 1983; LEE, 1988).

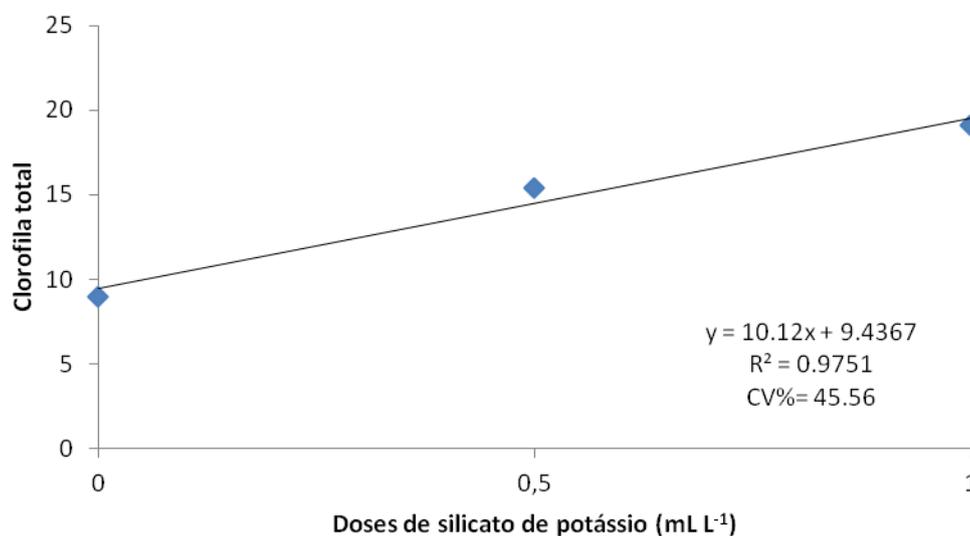


Figura 5. Clorofila total de *Catasetum x apolloi* cultivadas in vitro com diferentes concentrações de silicato de potássio com luminosidade artificial.

Analisando o quadro de regressão linear é possível verificar que houve interação entre os fatores estudados onde o aumento da concentração de silicato de potássio promoveu maior incremento no teor de clorofila total no

ambiente com luminosidade artificial (Figura 4). Na concentração de 0,5 mL L<sup>-1</sup> de silicato, o teor de clorofila total foi de 15,43 ug mg<sup>-1</sup> e no tratamento com a aplicação de 1 mL L<sup>-1</sup> houve um acréscimo com teores de clorofila total de 19,09 ug mg<sup>-1</sup>.

Resultados similares encontrados no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana* por Dignart et al., (2009), corroboram com os encontrado neste trabalho onde os maiores valores para clorofila foram encontrados em ambiente com luz artificial, na sala de crescimento.

O crescimento e a adaptação da planta a diferentes condições de ambiente relacionam-se a sua eficiência fotossintética que, por sua vez, está associada, entre outros fatores, aos teores de clorofila foliar. Diversos fatores externos e internos afetam a biossíntese de clorofilas, por isso, os seus conteúdos foliares podem variar de maneira significativa. Entre estes fatores, a luz é essencial a sua biossíntese (WHATLEY, 1982). A clorofila está sendo constantemente sintetizada e destruída (foto-oxidação) em presença de luz, porém sob intensidades luminosas mais elevadas ocorre maior degradação, e o equilíbrio é estabelecido a uma concentração mais baixa. Portanto, folhas de sombra possuem concentração maior de clorofila do que as folhas de sol (KRAMER & KOZLOWSKI, 1979).

Portanto, Epstein (2001) relatou que o uso de uma fonte de silício é capaz de aumentar o teor de clorofila das folhas e a tolerância das plantas aos estresses ambientais. Essas informações estão de acordo com os resultados encontrados neste trabalho, pois os maiores teores de clorofila total foram alcançados com o aumento das doses de silicato de potássio nos tratamentos.

Pode-se inferir, portanto que a sala de crescimento com menor intensidade luminosa e doses maiores de silicato promoveram maior acréscimo no teor de clorofila total de *Catasetum x apolloi*.

## **Conclusões**

Todos tratamentos apresentam a formação de raízes, porém a interação de silicato com as variações de luminosidade proporcionou decréscimo no número de raízes para as concentrações de 0,5 e 1,0 mL L<sup>-1</sup>. Tamanhos

menores de raízes são fundamentais no processo de aclimatização, inferindo que doses menores de silicato são recomendadas.

Não houve diferença estatística na média do número de folhas, porém a dose de  $0,5 \text{ mL L}^{-1}$  nos dois ambientes testados propiciou um aumento, as maiores doses no ambiente com luminosidade artificial resultou melhores resultados no comprimento das folhas.

Para a média do comprimento total, a luz natural associada à inclusão de silicato de potássio ao meio de cultura, na concentração de  $1 \text{ mL L}^{-1}$  propiciou maior crescimento da planta. Os melhores tratamentos para a presença de pseudobulbos foi o meio alternativo sem a adição de silicato de potássio, nas duas condições de luminosidade e o tratamento com  $0,5 \text{ mL L}^{-1}$  de silicato de potássio em ambiente artificial.

Na concentração de  $0,5 \text{ mL L}^{-1}$  de silicato e  $1 \text{ mL L}^{-1}$  houve um acréscimo com teores de clorofila total em ambiente artificial.

## Referências Bibliográficas

- AHLOOWALIA, B. S.; SAVANGIKAR, V. A. Low costs options for energy and labour. In: \_\_\_\_\_. **Low costs options for tissue culture technology in developing countries**. Austria: IAEA, 2004. p. 41-45.
- ARAGÃO, W. M.; ISBERNER, I. V.; CRUZ, E. M. O. **Água de coco**. Aracaju: Embrapa CPATC/ Tabuleiros Costeiros, 2001. (Série Documentos).
- ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992.
- ASMAR, A. S. et al. Fontes de silício no desenvolvimento de plântulas de bananeira 'Maçã' micropropagadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1127-1131, 2011.
- BERLETH, T.; KROGAN, N. T.; SCARPELLA, E. Auxin signals - turning genes on and turning cells around. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 553-563, 2004.
- BOARDMAN, N. K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annual Review of Plant Physiology**, California, v. 28, n. 1 p. 355-377, 1977.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Ed. Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998, p. 87-132.
- CORDEIRO, G. M. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Lindley X (*Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* Lindley) em diferentes meio de cultura. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, v. 18, n. 1 p. 22-28, 2011.
- CUNHA, T. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 7, p. 1-5, 2011.
- DIGNART, S. L. et al. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência agrotécnica**, Lavras, v. 33, n.3, p. 780-787, 2009.
- EPSTEIN, E. Silicon in plants, facts vs. Concepts. In: DATNOFF, L.E. et al. (Ed.) **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Ed. Elsevier, 2001. p.1-15.
- FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicacoes da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas Brasília: EMBRAPA-SPI;

EMBRAPA-CNPH, 1998 v.1 p.21-43 In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.

GRAÇA, M. E. C. Influence of light intensity on growth nodulation and nitrogen fixation of selected woody actinorhizal species. 1983. 109 f. (Philosophy Doctor Thesis) Purdue University, Purdue, 1983.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al., eds. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa - SPI/Embrapa - CNPH, 1998. p.183-260.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v. 15, p. 214-217, 1946.

KODYN, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grand Naine1'). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 55, p. 141-145, 1999.

KRAMER, T.; KOZLOWSKI, T. **Physiology of woody plants**. New York, Academic Press, 1979.

LEE, D. W. Simulating forest shade to study the development ecology of tropical plants: Juvenile growth in three vines in India. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 4, p. 281-92, 1988.

MA Z; GE L; LEE ASY; YONG JWH; TAN SN; ONG ES. Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 610, p. 274-281, 2008

NASCIMENTO, H. R. et al. Germinação *in vitro* de sementes de *Brassocattleya Pastoral alba* "Innocence" em meio de cultura alternativo. In: SEMANA DA BIOLOGIA, 3, 2010, Alta Floresta. **Anais...** Alta Floresta: UNEMAT, 2010. p. 109-112.

NUNES, C. F. et al. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 9-14, 2008.

OLIVEIRA, R. L.; FARIA, R. T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum**. Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-5, 2005.

PASQUAL M; SOARES JDR; RODRIGUES FA; ARAUJO AG; SANTOS RR. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira** 29: 324-329, 2011.

PEDROSO DE MORAES, C. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 67-69, 2009.

PEDROSO-DE-MORAES, C. **Cultivo de orquídeas**. Araras, SP: Biblioteca Duse Rügger Ometto, 2000. 130 p.

PETINI-BENELLI, A.; GRADE, A. A new species of *Catasetum* (Orchidaceae) for the state of Mato Grosso, Brazil. **Edinburgh Journal of Botany**, [s.l.], v. 65, p. 27-34, 2008.

RODRIGUES, D. T. et al. Concentrações e composições químicas do meio nutritivo para o cultivo *in vitro* de orquídea. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 1, p. 1-8, 2012.

ROMERO-ARANDA M.; JURADO, O.; CUARTETO, J. Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, p. 847-855, 2006.

SAGAWA, Y. & KUNISAKI, J. T. Clonal propagation: Orchids. **Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants**, [s.l.], v. 1, p. 61-67, 1984.

SAS-STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS INSTITUTE. **Statistical analysis systems user's guide: version 8.2**. 6th ed. Cary: Statistical Analysis System Institute, 2001.

SILVA, M. F. F.; SILVA, J. B. F. **Orquídeas nativas da Amazônia brasileira II**. 2 ed. Belém: Museu Paraense Emilio Goeldi, 2010.

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

SOARES, J. S. et al. Cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile* com uso de água de coco no meio de cultura. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 63-67, 2013.

SOARES-FILHO, B. S. Análise das mudanças de cobertura do solo do norte de Mato Grosso, Pp.3357-3364. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 12., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: INPE, 2005.

SOONTORNCHAINAKSAENG, P. et al. *In vitro* studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phaius tankervilleae* (Banks ex L' Herit) Bl. And *Vanda coerulea* Giff. **Science Asia**, [s.l.], v. 27, p. 233-237, 2001.

SOUZA, J. V. et al., Silicato de potássio via foliar no milho: fotossíntese, crescimento e produtividade. **Biosci. J**, Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 502-513, 2010.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2005.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; FURLANI, A. M. C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutas. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n.1, p. 51-57, 2008.

TINOCO, C. O.; VASQYEZ-YANES, C. Diferencias em poblaciones de *Piper hispidum* bajo condiciones de luz contrastante en una selva alta perenifolia. In: WHATLEY, J. M.; WHATLEY, F. R. **A luz e a vida das plantas**. São Paulo: EPU-EDUSP, 1982.

TRENHOLM, L. E.; DATNOFF, L. E.; NAGARA, R. T. Influence of silicon on drought and shade tolerance of St. Augustinegrass. **HortTechnology**, Alexandria, v. 90, p. 14-48, 2004.

VALMAYOR, H. L.; PRICE, G. R. Banana fruit pulp: a good medium for growing orchids. **Agriculture at Los Banos**, Los Banos, v. 9, n. 4, p. 142-152, 1970.

VIDOZ, M. L. et al. Comportamiento *ex vitro* de plantas de *Brassavola perrinii* (Orchidaceae) y de três híbridos intergenéricos. **Ciencia y Técnica**, s.l., v. 5, p. 13-16, 1999.

VILLA, F. et al. Efeito do cloreto de potássio e fosfato de sódio na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cv. Cherokee. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 53, p. 224-227, 2006.

VON-PINHO, E. V. R.; KIKUTI, A. L. **Portal do agronegócio do café:** inibidores da germinação no espermoderma. Coffeebreak. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=228>>. Acesso em: 25 jul. 2004. VYAS, S. et al. Rapid regeneration of plants of *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Orchidaceae) by using banana extract. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 121, p. 32–37, 2009.

ZHOU, T. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, London, v. 75, n. 6, p. 605-607, Dec.1995.

**3.2 ANATOMIA E ANÁLISE MICROMORFOMÉTRICA FOLIAR DE *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade COM ADIÇÃO DE SILICATO DE POTÁSSIO EM MEIO ALTERNATIVO E DIFERENTES FONTES DE LUZ**

**Resumo-** EBURNEO, Ligia. M.Sc. Universidade do Estado de Mato Grosso, Março de 2014. (**Anatomia e análise micromorfométrica foliar de *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade com adição de silicato de potássio em diferentes fontes de luz**). Orientadora: Profa Dra Ivone Vieira da Silva.

O objetivo desse trabalho foi comparar vitroplantas de *Catasetum x apolloi* cultivadas sob luz natural e luz artificial e diferentes concentrações de silicato de potássio, fornecendo dados sobre diferenciação anatômica que auxiliem no processo de aclimatização dessa espécie. Utilizou-se plantas provenientes da sementeira *in vitro*, cinco protocormos de aproximadamente 0,5 cm foram inoculados em frascos com capacidade para 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura alternativo, acrescido de silicato de potássio (0,0; 0,5; 1,0 mL L<sup>-1</sup>), pH ajustado para 5,5 ± 0,5 e gelificado com 4g L<sup>-1</sup> de ágar antes do processo de autoclavagem. As culturas foram mantidas sob luz natural (TAA) e luz artificial (TAN) por 90 dias, e feitas análises micromorfométricas (diâmetro polar e equatorial, densidade e índice estomático, espessura do limbo na nervura central e nervuras secundárias). As plantas adultas de *Catasetum x apolloi* apresentam folhas anfiestomáticas, estômatos tetracíticos e anomocíticos, células epidérmicas com mesma dimensão em ambas as faces, mesofilo homogêneo com sinuosidades nas paredes das células, feixes vasculares colaterais e ausência de colênquima. As aplicações de K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> em meio alternativo, propiciaram: alongamento da hipoderme; mesofilo mais espesso e nervura central mais proeminente; formato das células guardas elípticas; formação de câmaras supraestomáticas; menor densidade estomática e estômatos com menores diâmetros equatorial e polar. O ambiente que propiciou maiores diferenças favoráveis para a aclimatização foram menores intensidades luminosas e menores doses de silicato de potássio.

Palavras-chave: Anatomia foliar; Luminosidade; Orquídeas; Vitroplantas

**Abstract** - EBURNEO, Ligia. M.Sc. University of Mato Grosso State, March 2014. (**Anatomy and micromorphometric analysis of *Catasetum x apolloi* Benelli & Grill leaves with potassium silicate addition in different light sources**). Advisor: Profa Dra Ivone Vieira da Silva.

The aim of this study was to compare vitroplants of *Catasetum x apolloi* grown under natural and artificial light and different concentrations of potassium silicate, providing data about anatomical differentiation that will aid the acclimatization process of this species. Plants from a *in vitro* sowing were used, five protocorms measuring around 0.5 cm were inoculated into 500 mL flasks containing 100 mL alternative growth media plus potassium silicate (0.0, 0.5; 1.0 U mL L<sup>-1</sup>), pH adjusted to 5.5 ± 0.5 and gelled by 4g L<sup>-1</sup> agar before autoclaving process. Cultures were kept under natural light (TAA) and artificial light (TAN) for 90 days and micromorphometrics analysis were performed (polar and equatorial diameter, density and stomatal index, blade thickness in the midrib and secondary veins). *Catasetum x apolloi* adult plants have amphistomatic leaves, tetracytic and anomocytic stomata, equal size epidermal cells on both sides, homogeneous mesophyll with sinuous cell walls, vascular bundles and absence of collenchyma. Applications of K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> in the alternative

growth media, provided: stretching on the hypodermis; thicker mesophyll and more prominent midrib; elliptical shape guard cells; supra-stomatal chambers formation; lower stomatal density and reduced diameter of equatorial and polar stomata. The environment the provided bigger differences in favor to the acclimatization was lower light intensities and lower doses of potassium silicate environments.

**Keywords** : Leaf anatomy; Brightness; Orchids; Vitroplants.

## Introdução

Considerada no mundo científico a maior família botânica entre as espécies, Orchidaceae, possui uma variação entre 20.000 e 35.000 espécies distribuídas em mais de 800 gêneros e milhares de híbridos (SOUZA & LORENZI 2005). Este número aumenta a cada ano, já que novas descobertas são realizadas (SILVA & SILVA, 2010). As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas por sua beleza, exotividade e que agregam maior valor comercial, sendo constantemente predadas pelo homem, que as retira de seu habitat natural, seja para coleções particulares ou comercialização.

Nos Neotrópicos a família é amplamente diversificada, sobretudo na região equatorial, com grande diversidade de espécies na Colômbia, Equador, Brasil e Peru. O Brasil detém uma das maiores diversidades de orquídeas do continente americano e do mundo, com aproximadamente 2.433 espécies e 236 gêneros, das quais 1.620 são endêmicas deste país (BARROS et al. 2010), sendo a região centro-oeste com menor representatividade, com 458 espécies e 112 gêneros.

*Catasetum* Rich. ex Kunth é um gênero com 95 espécies e sete híbridos naturais ocorrentes no Brasil, das quais 28 espécies foram confirmadas para Mato Grosso. Destas, 21 espécies são relatadas para o Mato Grosso - Porção Amazônica (PETINI-BENELLI, 2012). Entre híbridos naturais do gênero está *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade, sendo encontrada sobre palmeiras da espécie *Maximiliana regia* às margens do rio Teles Pires no município de Carlinda- MT e também observadas em Alta Floresta - MT (Benelli & Grade 2008).

As orquídeas são organismos extremamente especializados que ocupam uma diversidade de nichos ecológicos e habitats, em razão do que apresentam uma série de adaptações a nível morfológico, anatômico e fisiológico (SILVA et al., 2006). Essas adaptações morfológicas e funcionais ocorrentes nas Orchidaceae podem estar relacionadas ao ambiente em que as espécies habitam. Estas podem apresentar caracteres xeromórficos, como parede da célula epidérmica espessa e lignificada, presença de hipoderme, baixa densidade estomática relacionada à suculência foliar, metabolismo ácido das crassulaceae (CAM), presença marcante de tecidos de sustentação, maior

desenvolvimento do parênquima paliçádico, projeções das paredes celulares e cutícula sobre os estômatos, além da presença de cutina revestindo as câmaras subestomáticas (SILVA ET AL., 2006).

Na natureza a propagação de orquídeas ocorre através de mudas laterais, porém esse processo é lento e a produtividade é baixa sendo insignificante, diante da quantidade de sementes produzidas, pois milhões de sementes são lançadas no ambiente e quando entram em contato com as micorrizas das plantas adultas da mesma espécie se associam e germinam, porém apenas 3 a 5 % conseguem se desenvolver (RAMOS & CARNEIRO, 2007).

A semeadura *in vitro* representa, em relação à germinação em condições naturais, uma alternativa importante para a propagação de várias espécies de orquídeas, sobretudo para as ameaçadas de extinção, por ser um protocolo para produção de orquídeas em curtos períodos de tempo (PEDROSO DE MORAES et al., 2009). Diversos meios de cultura têm sido formulados, com base nas exigências nutricionais de cada espécie, visando à obtenção de maior número de plantas germinadas e também seu pleno desenvolvimento.

O silício é outro nutriente utilizado nos protocolos de cultura *in vitro* conferindo efeitos benéficos às plantas pela sua contribuição para a estruturação da parede celular de raízes e folhas. Entretanto, este elemento não tem papel metabólico definido nas plantas e sua ação, conforme afirma Malavolta (2006) provoca efeitos indiretos, os quais, no conjunto contribuem para maior produtividade.

A luminosidade natural proporciona elevadas densidades estomáticas com estomas funcionais, favorecendo a adaptação da planta a condição heterotrófica (ARAÚJO et al., 2009). Lee et al. (1988) e Dousseau et al. (2008) sugerem que altas intensidades de luz propiciam um aumento no tamanho das células do mesofilo, maior espessura da folha, bem como a uma compactação celular mais pronunciada, em folhas cultivadas de *Liquidambar styraciflua* L. Estes autores afirmaram ainda, que baixas intensidades luminosas reduzem a divisão celular, resultando em áreas foliares menores, produzindo folhas mais delgadas.

Vários estudos anatômicos demonstraram que os órgãos vegetativos de vitroplantas apresentam tecidos e estruturas pouco diferenciadas quando comparadas com plantas cultivadas em casa-de-vegetação (APÓSTOLO et al., 2005).

Este trabalho objetivou comparar vitroplantas de *Catasetum x apolloi* cultivadas sob luz natural e luz artificial e diferentes concentrações de silicato de potássio, fornecendo dados sobre plasticidade anatômica que possam auxiliar no processo de aclimatização dessa espécie endêmica da região.

## Material e Métodos

O trabalho foi realizado na Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Alta Floresta - MT (UNEMAT), no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais e no Laboratório de Biologia Vegetal, no período entre julho de 2012 e abril de 2013.

Alta Floresta está situada no Norte do Estado de Mato Grosso e conta com uma inestimável riqueza, constituindo uma área com imensa biodiversidade, potencial hídrico e outros recursos naturais em abundância, além de complexos mosaicos vegetacionais (FEMA, 2002). O município está localizado na faixa de florestas estacionais semidecíduais de transição entre os biomas Amazônia e Cerrado. Apresenta uma fisionomia bem típica, caracterizada pelo envolvimento das árvores por lianas lenhosas e solo adaptado por um emaranhado de lianas herbáceas (SELUCHINESK, 2008).

O Município situa-se nas coordenadas geográficas: 10°27'56" de Latitude Sul e 56°09'01" de Longitude Oeste, apresentando altitude média de 284 metros, e sua sede está localizada a 830 km da capital do Estado, Cuiabá. Segundo dados do IBGE em pesquisa realizada em Alta Floresta ocupa uma área de 8.976,177 km<sup>2</sup> e possui uma população estimada em 49.164 habitantes (IBGE, 2013).

O relevo regional varia de plano a montanhoso. O clima é do tipo Awi, segundo a classificação de Köppen, ou seja, tropical chuvoso, alcançando elevado índice pluviométrico no verão, podendo atingir médias às vezes superiores a 2.750 mm, e um inverno seco, predominando altas temperaturas. A temperatura média anual fica em torno de 20° C (IBGE, 2013).

Neste trabalho foram utilizadas sementes provenientes da espécie *Catasetum x apolloi* Benelli & Grade do Orquidário Alta Florestense do *Campus* de Alta Floresta-MT. As sementes foram retiradas de frutos maduros, armazenadas a 4°C, durante cerca de 24 h para a semeadura *in vitro*. As sementes foram embebidas em água destilada e desinfestadas durante trinta minutos sob agitação, e posteriormente tratados com solução de 15% (v v-1) de hipoclorito de sódio comercial ( 2,5% de cloro) durante dez minutos. Em seguida na câmara de fluxo laminar com o auxílio de uma micropipeta e

ponteiras esterilizadas, a solução de hipoclorito foi retirada e as sementes lavadas três vezes em água destilada e esterilizada.

Foram inoculadas 2mL no meio de cultura alternativo constituído de 30 gL<sup>-1</sup> de açúcar comercial, 2 gL<sup>-1</sup> de fertilizante B&G®, 200mL L<sup>-1</sup> de água de coco e 2 gL<sup>-1</sup> de carvão ativado. Foram gelificados com 4gL<sup>-1</sup> de Agar, segundo metodologia de Rodrigues et al.,( 2012). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,5± 0,05. Anteriormente à adição do Agar, foram distribuídos em frascos de vidro de 500 mL, sendo que em cada frasco foram colocados 100 mL de meio de cultura e autoclavados a 121°C sobre pressão de 1 kgcm<sup>2</sup> por 20 minutos.

Os tratamentos foram mantidos à luz (2.000 lux) por 16 horas diárias a uma temperatura de 27 ± 1°C, durante 60 dias. Os tratamentos foram observados semanalmente durante este período para avaliar o desenvolvimento dos protocormos em plântulas.

Para proceder estudos com plântulas de *C. x apolloi* após 60 dias a partir da germinação das sementes *in vitro*, 5 protocormos de aproximadamente 0,5 cm de comprimento foram inoculados em frascos com capacidade para 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura alternativo, acrescido de silicato de potássio (0; 0,5; 1,0 mL L<sup>-1</sup>), pH ajustado para 5,5 ±0,5 e gelificado com 4gL<sup>-1</sup> de ágar antes do processo de autoclavagem a 121°C e 1 kgcm<sup>2</sup> por 20 minutos. As culturas foram mantidas sob luz natural e luz artificial por 90 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 3 (2 ambientes e 3 concentrações de silicato de potássio no meio de cultura), com 4 repetições para cada tratamento. Os tratamentos foram: TAA (Tratamento em Ambiente Artificial) nas doses 0,0; 0,5 e 1,0 mL L<sup>-1</sup> de silicato de Potássio em meio alternativo – TAN (Tratamento em Ambiente Natural) nas doses 0,0; 0,5 e 1,0 mL L<sup>-1</sup> de silicato de potássio em meio alternativo.

No ambiente artificial, na sala de crescimento, a iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia especial (OSRAM® 20 W), com irradiância média de 602,27 Lux (lúmem/m<sup>2</sup>), fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 22 ± 2°C. No ambiente natural (sala climatizada com

iluminação natural), apresentando os seguintes parâmetros ambientais: temperaturas máximas e mínimas de 32,05°C e 23,05°C, e níveis de irradiância de 939,21 Lux (lúmem/m<sup>2</sup>).

Ao final de 150 dias de cultivo, 10 plântulas de 4 repetições por tratamento, foram retiradas aleatoriamente, seccionando 4 folhas de cada plântula. O material botânico foi fixado em FAA<sub>50</sub> (Formaldeído, ácido acético glacial e etanol 50%; 5:5: 90 v/v), por 48 horas e acondicionadas em etanol 70% (Johansen, 1940).

Para o estudo anatômico de plantas adultas de *C. x apolloi* foram utilizadas amostras foliares provenientes de 4 indivíduos de ambiente natural coletadas na Chácara Recanto das Orquídeas, localizada na Perimetral Auxiliar Oeste s/nº entre as coordenadas 56°05'44.5"W e 09°52'34,2"S no município de Alta Floresta- MT (Tipo: Brasil. Mato Grosso, Carlinda, 26.i.2007. A. Grade 37269 UFMT).

Para as análises anatômicas foram utilizadas duas folhas por repetição onde secções transversais realizadas na região do terço mediano foram obtidas através da inclusão das amostras em resina sintética Leica® (Meira & Martins, 2003). Os blocos foram cortados transversalmente em micrótomo rotativo de avanço automático, com a utilização de navalhas de aço descartáveis. Os cortes, com espessura de 8 µm, foram corados com azul de toluidina. As lâminas foram montadas entre lâminas e lamínulas com Permont metacrilanato Leica®. As variáveis analisadas para as secções transversais foram: espessura do limbo na região do feixe vascular central e feixes vasculares secundários. As quais foram estimadas medindo-se esses parâmetros em 6 campos de cada material em estudo, com o auxílio do programa Anati Quant 2® UFV (AGUIAR et al., 2007).

Para as análises epidérmicas foi utilizado o protocolo de Franklin, 1947 (apud KRAUS & ARDUIN, 1997), modificado; onde porções foliares foram colocadas em tubos ependorf com peróxido de hidrogênio (30 v) e ácido acético glacial na proporção de 1:1 e mantidas em estufa a 50°C, por cerca de 20 horas. Após esse período, as amostras foram lavadas em água destilada e em etanol 50%, separando-se as duas superfícies epidérmicas, coradas com

fucsina básica (ROESER, 1962) e montadas em resina sintética Permont-Leica®.

O índice estomático (IE) foi realizado por meio da fórmula de (CUTTER, 1986) onde  $(IE) = [NE/(CE + NE)] \times 100$ , em que NE é o número de estômatos e CE o número de células epidérmicas propriamente ditas. Foi avaliada a região do terço mediano de 1 folha de cada repetição, quantificando-se dez campos. Para os estudos relacionados à caracterização dos estômatos (número médio por mm<sup>2</sup>, diâmetro polar e equatorial), as lâminas foram fotomicrografadas com objetiva de 20x por meio do capturador de imagens, acoplado ao fotomicroscópio Leica® DMLB, e as análises das imagens foram feitas por meio do programa Anati Quant 2® UFV (AGUIAR et al., 2007).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 3 (2 ambientes e 3 concentrações de silicato de potássio no meio de cultura), com 4 repetições para cada tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade( FERREIRA,2003).

## Resultados e Discussão

### Planta adulta

Em vista frontal as folhas da planta adulta apresentam células com formatos hexagonais e pentagonais, com as mesmas dimensões em ambas as faces, exibindo paredes retas (Figura 1A-B). Os estômatos são anomocíticos, sendo observados em alguns campos estômatos tetracíticos, não ocorrendo tricomas (1A-B). As folhas são anfiestomáticas, apresentando maior número de estômatos na face abaxial.

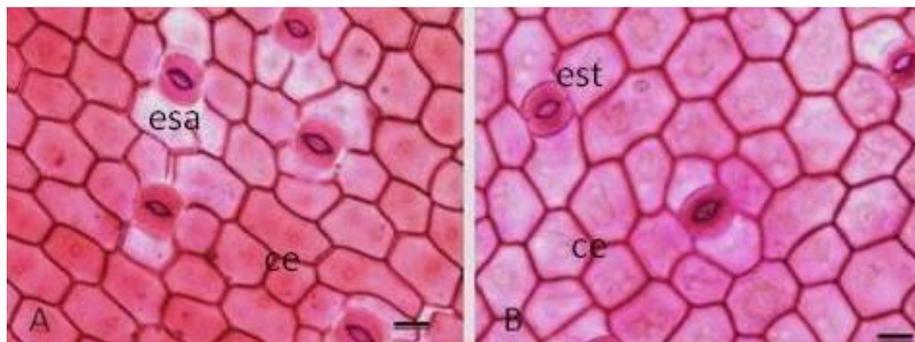


Figura 1. Fotomicrografia de seções paradérmicas da epiderme de *Catasetum x apolloi*. 1A (Face abaxial), 1B (Face adaxial) da planta adulta; esa-estômato anomocítico, CE- células epidérmicas, est-estômato tetracítico, ESA-estômatos tetracíticos. Barra = 40  $\mu$ m (A, B)

Em secção transversal (ST), os estômatos localizam-se no mesmo nível, ou em posição um pouco acima, das demais células epidérmicas, com paredes periclinais espessadas formando cristas (Figura 2C). Possuem câmaras subestomáticas pouco desenvolvidas (Figura 2C).

As folhas estudadas em ST apresentam epiderme uniestratificada com células levemente maiores na face adaxial e recoberta por cutícula delgada (Figura 1A). O mesofilo é homogêneo, constituído por células justapostas de parênquima clorofiliano com paredes sinuosas. Verifica-se presença de feixes de fibras próximos a face adaxial e abaxial, e por vezes intercalando os feixes vasculares (Figura 2E). Os feixes vasculares são colaterais com calotas de fibras xilemáticas e floemáticas, estando dispostos numa única série, com alternância de tamanhos, entre maiores e menores, porém nos últimos os feixes apresentam poucos elementos de condução e poucas fibras. Foram observados idioblastos com ráfides distribuídas no mesofilo (Figura 2E).

A nervura central apresenta epiderme com paredes espessadas recobertas por cutícula ornamentada com ondulações. O feixe vascular é colateral proeminente na face dorsal, com ocorrência maior de fibras floemáticas, comparadas com as fibras xilêmicas. Não apresenta colênquima, apenas uma camada com células pequenas de parênquima clorofiliano abaixo da face dorsal (Figuras 2A-B).

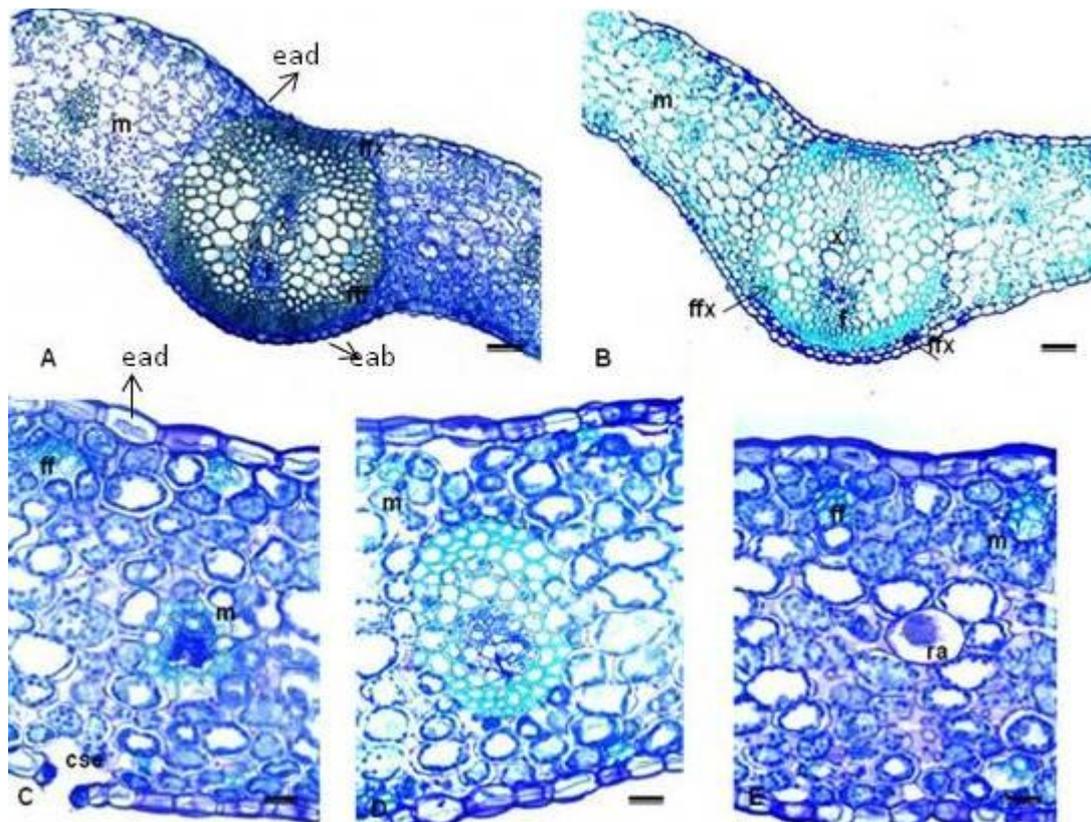


Figura 2. Fotomicrografias de secções transversais de *Catasetum x apolloi*: nervura central e mesofilo AN (planta adulta/ ambiente natural). (csc- câmara subestomática; m- mesofilo; eab-epiderme abaxial;ead-epiderme adaxial, x- xilema; f- floema; fff- feixe de fibras floemáticas; ff- (feixe de fibras,ra,ffx). Barra = 120 µm (A, B); 80 µm (C, D, E).

Benevenuti (2013), estudando espécies do gênero *Catasetum* verificou que anatomicamente estas apresentam epiderme unisseriada, com paredes das células epidérmicas e cutícula finas, células adaxiais maiores que abaxiais, folhas hipoestomáticas, estômatos tetracíticos com espessamentos periclinais formando cristas, no mesmo nível ou um pouco acima das demais células epidérmicas, câmaras subestomáticas pouco desenvolvidas, células com

paredes delgadas, feixes de fibras extravasculares subepidérmicas e feixe vascular colateral. *Catasetum x apolloi* apresenta diversamente das outras espécies folhas anfiestomáticas, sinuosidades nas células do mesofilo (Figura 2D), com células adaxiais e abaxiais apresentando as mesmas dimensões e estômatos tetracíticos e anomocíticos (Figuras 2C, 2D).

Oliveira e Sajo (1999) estudando espécies do gênero *Catasetum* e de outros gêneros (*C. fimbriatum*, *Dichaea bryophila*, *Encyclia calamaria*, *Epidendrum campestre*, *E. secundum*, *Miltonia flavescens*, *Pleurothallis smithiana*, *Stanhopea lietzei* e *Vanda tricolor*) verificam nas espécies folhas apresentando mesofilo homogêneo, com feixes menores e maiores intercalados e feixes de fibras extravasculares subepidermicamente ao longo do mesofilo, corroborando com os resultados apresentados nas folhas dos indivíduos adultos.

### **Estudo das plântulas submetidas a tratamentos: Epiderme vista frontalmente**

No tratamento com meio alternativo em ambiente natural (TAN), e artificial (TAA), as células epidérmicas analisadas frontalmente apresentam-se, com tamanhos semelhantes e formas retangulares (Figuras 2C, 2D). Essa mesma característica foi relatada por Pasqual et al., (2011) nos tratamentos por eles realizados sem a adição de silício. Nos tratamentos com aplicação de silicato de potássio  $0,5 \text{ mL L}^{-1}$  e  $1 \text{ mL L}^{-1}$  ao meio de cultura alternativo (Figuras 2E-H), as células têm formas mais regulares, provavelmente este melhor arranjo celular se deve à adição desse nutriente. Segundo Camargo et al., (2007) e Epstein, (2001), esse nutriente proporciona um aumento mecânico reforçando a paredes celular.

Em meio alternativo os estômatos se apresentam com aberturas circulares nos dois ambientes testados com meio alternativo sem a adição de silicato de potássio (Figuras 2C-D). Os estômatos na região de contato entre o ostíolo confere um aspecto circular ao lúmen. Tem-se observado que as folhas de vitroplantas possuem menos estômatos e que estes são circulares em vez de elípticos (DESJARDINS, et al, 1995). Os dados relatados corroboram com os obtidos para as plantas cultivadas em meio alternativo que apresentam

estômatos com aberturas circulares nos dois ambientes. As paredes delgadas das células estomáticas, quando recebem água das células anexas, sofrem distensão, as paredes reforçadas dos estômatos também passam por esse mesmo processo, levando a abertura dos estômatos com maior perda de água. Já com a deposição de silício nas paredes das células estomáticas, tornando-as mais espessas ocorre uma alteração anatômica desses estômatos tornando-os elípticos, com abertura menor em menor espaço de tempo entre a abertura e fechamento, fazendo com que os estômatos elípticos sejam mais funcionais.

A epiderme no tratamento TAN (0,5), apresenta células com paredes retas, espessas, com formatos retangulares, poligonais e hexagonais, apresentando arranjo disperso das células (Figura 2E), aspecto muito semelhante com a arquitetura da planta adulta (Figuras 1A-B) e diferente das plântulas sem adição de silicato, as quais não apresentam uniformidade de formas (Figuras 2C-D).

Zhou (1995) corrobora que a presença de silicato proporcionou às plantas por ele estudadas, maior resistência à perda de água quando comparado ao tratamento controle, proporcionando melhor arranjo das células da epiderme, sem perda por desidratação dos tecidos, que prejudicaria o processo de aclimatização.

Na epiderme foliar, o silício combina com a celulose (SILVA et al., 2006). A deposição desse elemento na parede das células torna a planta mais resistente à ação de fungos e herbivoria, evita a perda excessiva de água e diminui a taxa de transpiração (SILVA, 2007), o que acarretará num maior índice de sobrevivência dessas plantas durante o processo de aclimatização.

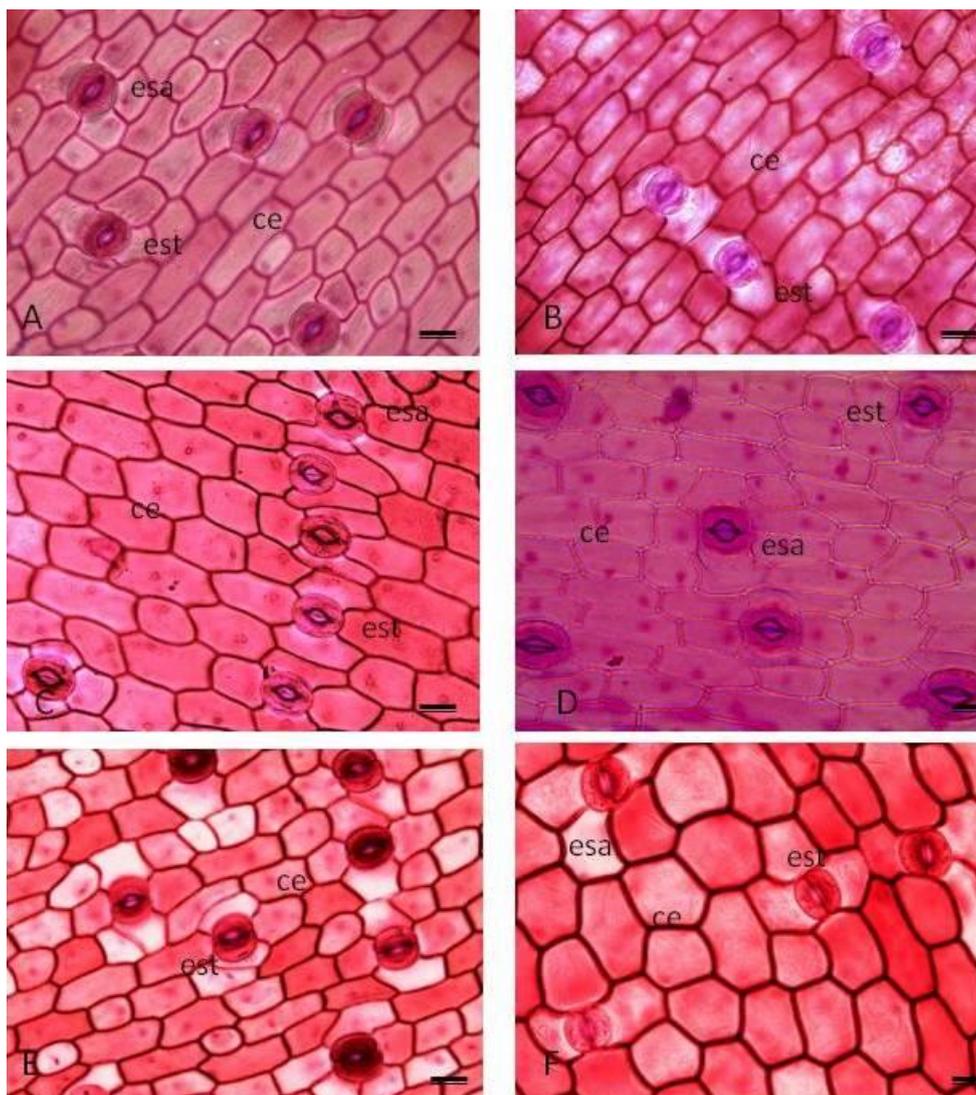


Figura 3A-F. Fotomicrografia de secções paradérmicas da epiderme de *Catasetum x apolloi*; B-TAN (Tratamento ambiente natural com meio alternativo/luz natural); A- TAA (Tratamento c/ luz artificial em meio alternativo); D- TAN c/ silicato de potássio 0,5 mL L<sup>-1</sup>; C- TAA c/ silicato de potássio 0,5 mL L<sup>-1</sup>; F- TAN c/ silicato de potássio 1 mL L<sup>-1</sup>; E- TAA c/ silicato de potássio 1 mL L<sup>-1</sup>.(CE- células epidérmicas; EST- Estômato tetracítico, ESA- Estômato anomocítico). Barra = 40 µm (A- F).

### Secção transversal- Epiderme

Para todos os tratamentos em sala com luminosidade artificial e natural, a epiderme exibe cutícula espessa e ondulada. Silva et al., (2006) estudaram a anatomia foliar de treze espécies de orquídeas e descrevem que em espécies com redução da parte aérea, como em *Catasetum x apolloi* as células epidérmicas adaxiais podem apresentar-se com cutícula delgada geralmente

desprovida de estriamentos. A espécie estudada neste trabalho, apesar de apresentar redução da parte aérea não apresenta cutícula delgada e sim espessa na planta adulta de ambiente natural (Figuras 1A, 1E), e também nos tratamentos com aplicação de silicato de potássio, nos dois ambientes.

Decorrente deste fato, as vitroplantas se assemelham às de ambiente natural, podendo se adaptar melhor no processo de aclimatização, pois acredita-se que cutículas espessas diminuem a evapotranspiração (EPSTEIN,1999).

Conforme Evert (2006), a cutícula é a primeira barreira de proteção entre a superfície aérea da planta e o ambiente, consistindo no principal obstáculo para o movimento de água, incluindo o fluxo de transpiração. A cutícula mais espessada possui natureza lipídica evitando a perda de água excessiva por transpiração, sendo fundamental no mecanismo de tolerância à deficiência hídrica (CASTRO et al., 2009). Especialmente quando são transplantadas do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, onde as condições ambientais de aclimatização são totalmente diferenciadas, pois as plantas passam da condição heterotrófica para autótrofa, a umidade relativa é alterada, bem como a temperatura e a luminosidade, os quais favorecem o processo de desidratação.

Observou-se alongamento das células adaxiais, nas plantas cultivadas *in vitro* acrescidas de silicato de potássio com 0,5 mL L<sup>-1</sup> ao meio alternativo em ambiente artificial (Figuras 3C-D). Tal característica associada ao espessamento da epiderme podem contribuir para maior acúmulo de água nas plantas. Segundo Kurzweil et al. (1994), células epidérmicas adaxiais maiores estão relacionadas com a função de reserva de água.

Além dos efeitos benéficos do Si em reter água, Trenholm et al. (2004) afirmam que esse nutriente tem a função de aumentar a eficiência na fase de aclimatização, o Si pode estar envolvido no metabolismo de parede celular, melhorando a capacidade das células da parede em expandir, conseqüentemente, aumentando a expansão da célula (GUNES et al., 2007). Diante dessa afirmação e conforme observado nas figuras abaixo citadas, o silicato de potássio acrescido ao meio de cultura alternativo propiciou essa

alteração, sendo benéfica, pois permitiu o espessamento periclinal das células adaxiais, elevando a dimensão de sua altura.

Silva et al., (2006) afirmam que células epidérmicas adaxiais altas observadas nas plantas com redução da parte aérea é um caráter, provavelmente, envolvido na substituição da cutícula espessa. Fato confirmado para a espécie que em ambiente natural apresenta células com tamanhos iguais nas duas faces em ambiente natural, porém nas plantas cultivadas *in vitro*, quando acrescidas de silicato de potássio na dosagem de 0,5 mL L<sup>-1</sup> e 1,0 mL L<sup>-1</sup> em ambiente natural (Figuras 4D-G), a cutícula se apresenta espessa e as células abaxiais são maiores, demonstrando que o silicato promoveu expansão das células adaxiais, características fundamentais para a aclimatização das plantas no ambiente *ex vitro*, pois essas variáveis em conjunto aumentam a reserva de água na planta.

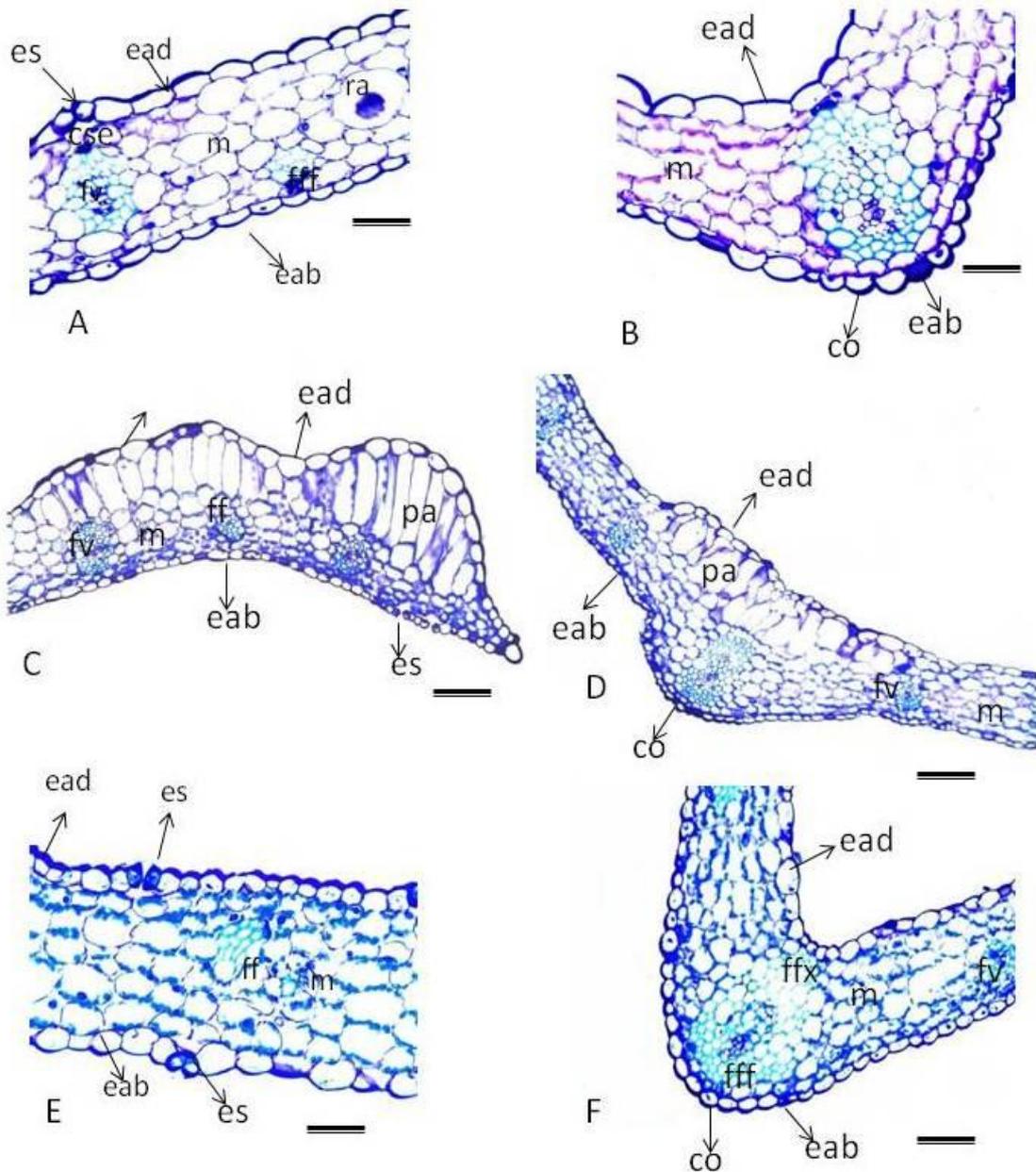


Figura 4A-F. Fotomicrografias de secções transversais de vitroplantas de *Catasetum x apolloi*: mesofilo e nervura central TAA (Tratamento com luminosidade artificial). A, B- Controle; C, D- Adição de silicato de potássio 0,5 mL L<sup>-1</sup>; E, F- Adição de silicato de potássio 1mL L<sup>-1</sup>. (cse- câmara subestomática; m- mesofilo; ead- epiderme adaxial; eab- epiderme espessa abaxial; x- xilema; f- floema; fff- feixe de fibras floemáticas; ffx- feixe de fibras xilemáticas; r- ráfides; co- cutícula ornamentada). Barra = 80 μm (A-F).

Transversalmente nas secções anatômicas, foram observadas câmaras supraestomáticas no tratamento com meio alternativo com adição de 0,5m L<sup>-1</sup> de silicato de potássio em ambiente natural (Figura 4C). Presença de câmaras

supraestomáticas, que mantêm um pequeno compartimento de ar úmido reduzindo a transpiração, é uma característica comum em orquídeas epífitas, que enfrentam altas temperaturas e pouca disponibilidade de água (RASMUSSEN, 1987). No ambiente natural a temperatura máxima e mínima tiveram médias de 32°C e 23°C, respectivamente. A alta temperatura pode ter contribuído para a formação de câmaras supraestomáticas, porém nos outros tratamentos não ocorreram câmaras tão evidentes.

Em todos os tratamentos, em ambiente com luminosidade natural, os estômatos possuem células guardas com paredes periclinais externas com espessamento bastante acentuado, formando uma crista em torno do átrio externo do ostíolo, e com câmaras subestomáticas pouco desenvolvidas ( Figuras 4C-F),apresentando formas elípticas, (ABRANS et al.,1992), comentam que a perda excessiva de água pode ser minimizada com a redução das células guarda e do poro estomático, perante maior luminosidade.

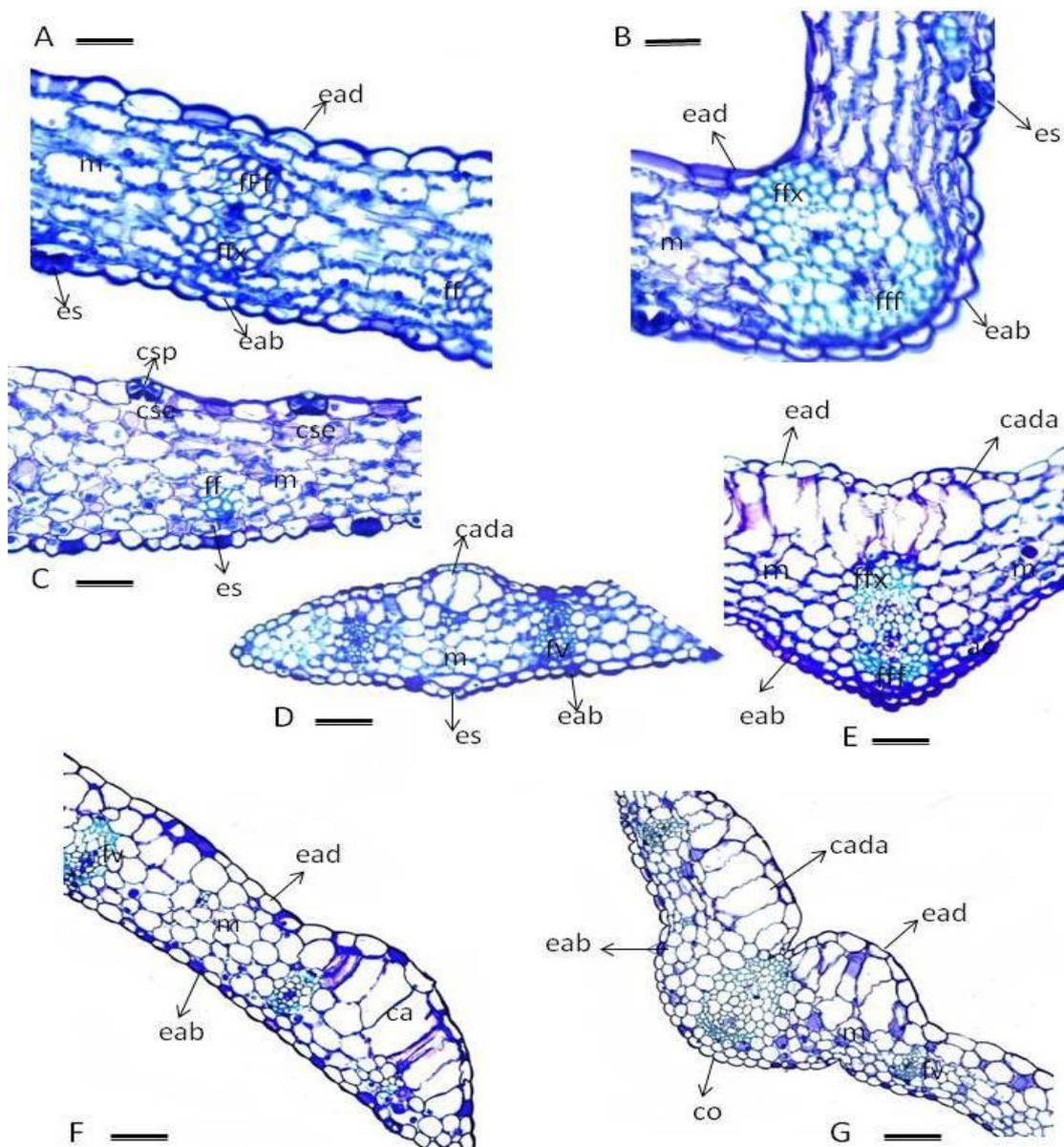


Figura 5A-G. Fotomicrografias de cortes transversais de vitroplantas de *Catasetum x apolloi*: mesofilo e nervura central TAN (Tratamento com luminosidade natural). A, B- controle; C, D- Adição de silicato de potássio 0,5 mL L<sup>-1</sup>; E, F- Adição de silicato de potássio 1mL L<sup>-1</sup>. (cse- câmara subestomática; csp- câmara subestomática; es- estômato; m- mesofilo; ead- epiderme adaxial; eab- epiderme espessa abaxial; x- xilema; f- floema; fff- feixe de fibras floemáticas; ffx- feixe de fibras xilemáticas; r- ráfides; cada- células adaxiais alongadas;co- cutícula ornamentada). Barra = 80 μm (A-F).

De acordo com Fahn e Cutler (1992) câmaras subestomáticas estabelecem um longo e superficial gradiente de difusão entre o parênquima clorofiliano e o ambiente, bem como, uma alta resistência à perda de água. Assim, mesmo quando os estômatos estão abertos, a baixa densidade

estomática e alta resistência cuticular e subestomática possibilitam somente baixas taxas de transpiração. Tais características são fundamentais para economia de água em plantas cultivadas e também um excelente aparato funcional para as plantas no processo de aclimatização onde o estresse hídrico é maior.

Através dos dados estatísticos verifica-se que não houve interação entre o fator luminosidade para densidade e índice estomático, não havendo diferença estatísticas entre as duas temperatura testadas (Tabela. 1).

Para as doses de 0,0 e 1,0 mL L<sup>-1</sup> de silicato de potássio no meio alternativo não ocorreu diferença estatística para índice estomático. O tratamento com adição de 0,5 mL L<sup>-1</sup> de silicato de potássio ao meio alternativo apresentou maior IE, superando os demais tratamentos, com 7.33% de estômatos por mm<sup>2</sup>.

Para densidade estomática as doses de 0,0 e 0,5 mL L<sup>-1</sup> de silicato de potássio foram mais eficazes, porém com o aumento das doses, houve uma diminuição na densidade estomática. Maiores densidades de estômatos são uma forma de adaptação à seca, pois permite que as plantas regulem o transporte de água e transpiração de forma mais eficiente (LUKOVIĆ et al., 2009). No presente trabalho as plantas estavam sendo cultivadas *in vitro*, concluindo que não houve deficiência hídrica dentro dos frascos de cultura, dessa forma é possível inferir que as baixas densidades estomáticas verificadas são decorrentes da alta disponibilidade de água às plantas e a aplicação de 1,0 mL L<sup>-1</sup> de silicato de potássio.

Tabela 1. Índice (IE) e Densidade Estomática (DE) de *Catsetum x apolloi* cultivadas *in vitro* com diferentes luminosidades e concentrações de silicato de potássio.

Doses K <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> (mL L <sup>-1</sup> )	Variáveis	
	Índice Estomático%	Densidade Estomática(mm <sup>2</sup> )
0	6.37 b	46.49 a
0.5	7.33 a	45.98 a
1	5.88 b	38.43 b
CV (%)	17.75	33.87

\*IE= Índice estomático;\* DE= Densidade estomática. As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste ANOVA de P < 0,05 através do programa Sisvar (Ferreira, 2003).

O microambiente existente nos frascos de cultivo tem sido geralmente, padronizado, de forma que não haja variações ambientais neste microambiente. O uso generalizado de frascos de cultura fechados cria uma inter-relação particular entre substrato, a planta e a atmosfera condicionado pela alta umidade relativa do ar, baixa intensidade luminosa, grandes concentrações de reguladores de crescimento, excesso de nutrientes e ínfimas variações de temperatura. Esses fatores associados são responsáveis pela inabilidade de algumas plantas de sobreviverem ao transplântio para condições *ex vitro* (DANTAS et al., 2001). (DESJARDINS et al., 1995), descrevem que foram observadas folhas mais finas, com pouca cutícula e um mesofilo com células muito pequenas e com grandes espaços intercelulares, o que certamente interfere na disponibilidade de CO<sub>2</sub> nas células do mesofilo e na capacidade fotossintética.

Ribeiro et al., (2012) corrobora que maiores densidades estomáticas podem permitir uma abertura em um espaço de tempo menor, favorecendo uma captação adequada de CO<sub>2</sub> e diminuindo o período em que esses estômatos ficam abertos, reduzindo, conseqüentemente a transpiração. Este fator é essencial, pois permite uma melhor adaptação das plantas cultivadas *in vitro*, quando transplantadas para o ambiente *ex vitro* e às condições de pouca disponibilidade de água, porém com a aplicação de 1,0 mL L<sup>-1</sup> silicato de potássio (Tabela-1) houve decréscimos da densidade e índice estomático, observando que os estômatos são funcionais, com aberturas elípticas, podendo se adaptar mais facilmente as condições fotoautrópicas, com o aumento da demanda evaporativa.

Os maiores índices estomáticos foram observados no tratamento com adição de 0,5 mL<sup>-1</sup> de silicato de potássio, com 7,33 %. Para densidade estomática a mesma dosagem propiciou 45,98 mm<sup>2</sup>, não diferenciando estatisticamente do tratamento com meio alternativo sem a adição de silicato de potássio., Pompelli et al. (2010), acreditam que o índice estomático, sendo uma característica intrínseca da planta, permanece constante. Esta informação descrita pelos autores não se aplica aos tratamentos realizados nesse estudo, pois houve alterações nos índices estomáticos quando foram adicionados ao meio alternativo silicato de potássio e diferente de outros trabalhos já

realizados, para *Catasetum x apolloi* não ocorreu interação entre a quantidade de luz em relação ao índice e densidade estomática.

Não existem dados bibliográficos citados para a relação do silicato de potássio com o aumento no IE e DE, porém este dado foi observado neste trabalho, demonstrando que os nutrientes podem interferir na proporção de estômatos. Esses dados podem ser verificados na Tabela 2 onde o índice estomático e a densidade estomática foram menores com a aplicação de 1 mL L<sup>-1</sup> de silicato de potássio, demonstrando desta forma que houve aumento no tamanho das células epidérmicas as quais apresentaram menores densidades e também menores índices estomáticos. Pompelli et al., (2010), afirma que Os estômatos são fundamentais na fisiologia vegetal e na sobrevivência das plantas. Em geral, com a diminuição da irradiância, a frequência estomática, ou mesmo epidérmica, por unidade de área foliar diminui, enquanto as dimensões dos estômatos aumentam.

A planta em ambiente natural apresentou um índice de 5,53 (%) de estômatos, demonstrando dessa forma que as plantas de ambiente natural apresentam menor quantidade de estômatos, já que os mesmos são responsáveis pela maior perda de água no vegetal e diminuindo sua densidade, conseqüentemente diminui-se o estresse hídrico das plantas. A densidade estomática para a planta de ambiente natural apresentou densidade de 30,82(mm<sup>2</sup>), quando comparadas com as plantas cultivadas *in vitro*, verifica-se que a dose de 1,0 mL L<sup>-1</sup> de silicato de potássio pode ser utilizada, já que apresentou menor densidade e índice estomáticos, assemelhando-se às de ambiente natural e que possivelmente favoreçam a adaptação no processo de aclimatização.

Não houve diferença estatística no ambiente com luminosidade artificial e também para as doses de silicato de potássio aplicadas ao meio alternativo não diferindo entre todos os tratamentos analisados para diâmetro polar (Tab. 2). Para luminosidade natural, a aplicação de silicato de potássio apresentou maiores médias para as duas concentrações de 0,5 mL L<sup>-1</sup> e 1,0 mL L<sup>-1</sup>, não havendo diferença entre as doses, porém sem a aplicação de silicato verificou-se menor diâmetro polar na sala de crescimento, com luminosidade natural.

Analisando o diâmetro equatorial verifica-se que houve interação entre os fatores luminosidade e doses de silicato de potássio no meio alternativo, onde a dose de 0,5 mL L<sup>-1</sup> de silicato de potássio em ambiente natural promoveu o maior DIE com 44.50 (mm<sup>2</sup>), diferenciando do ambiente da sala de crescimento que apresentou o DIE de 37.76 (mm<sup>2</sup>). Na concentração de 1,0 mL L<sup>-1</sup>, ocorreu o inverso onde o ambiente natural promoveu o menor DIE com 36.25 (mm<sup>2</sup>) e no ambiente artificial houve diferença estatística, apresentando o valor de 37.92 (mm<sup>2</sup>). Para as doses 0,0 e 0,1 mL L<sup>-1</sup> não houve diferença estatística a 0,05% de probabilidade. Pode-se inferir analisando o DP e o DIE, que os menores diâmetros estomáticos foram com as doses 0,0 em ambiente natural e 1,0 mL L<sup>-1</sup> de silicato ao meio de cultura em ambiente natural, inferindo que proporcionaram estômatos menores.

Tabela 2. Diâmetro equatorial (DIE), Diâmetro polar (DP), Limbo foliar (LF) de vitroplantas em diferentes ambientes, luz natural/luz artificial e concentrações de silicato de potássio ao meio alternativo.

Doses K <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	LF (µm)		DP (mm <sup>2</sup> )		DIE (mm <sup>2</sup> )	
	Natural	Artificial	Natural	Artificial	Natural	Artificial
<b>0</b>	183.38 B a	199.54 A a	18.84 B b	22.66 A a	36.57 A b	36.15 A a
<b>0.5</b>	181.76 B a	207.21 A a	22.98 A a	22.11 A a	44.50 A a	37.76 B a
<b>1</b>	188.02 A a	173.95 A b	21.81 A a	21.46 A a	36.25 A b	37.92 A a
<b>CV%</b>	11.97		10.57		9.36	

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste Anova com P < 0,05 de probabilidade realizado através do Programa Sisvar (Ferreira,2003).

A diminuição no tamanho dos estômatos é essencial, pois sua importância está na maior funcionabilidade das trocas gasosas, apresentando diminuição do tamanho dos poros e também menor perda de água através da transpiração. Bidwell (1964) constatou que menores aberturas estomáticas apresenta maior difusão de água do que de CO<sub>2</sub>, mantendo o influxo de CO<sub>2</sub> fundamental para a fotossíntese sem que haja estresse hídrico na planta.

Tem-se observado que as folhas de vitroplantas possuem menos estômatos e que estes são circulares em vez de elípticos (DESJARDINS et al.,

1995). O formato das células-guarda em conjunto e também a relação entre diâmetro polar e diâmetro equatorial dos estômatos é um indicativo de sua funcionabilidade (ROCHA, 2005). Alguns autores concordam que a forma elíptica é característica de estômatos funcionais, enquanto a forma arredondada é associada a estômatos que apresentam funcionamento anormal (KHAN et al., 2002). Rocha (2005) verificou em sua pesquisa com micropropagação de banana prata anã, que quanto maior a relação diâmetro polar/ diâmetro equatorial mais elipsoide é o estômato, podendo resultar em maior funcionalidade.

Quando analisados os tratamentos verifica-se que as plantas do tratamento controle apresentam estômatos circulares, diferenciando dos outros tratamentos com aplicação de silicato de potássio apresentando a relação de DP(18,84 mm<sup>2</sup>) e DIE(36.57 mm<sup>2</sup>) em ambiente natural. Nos tratamentos com a aplicação de silicato de potássio, os estômatos se tornaram mais elípticos, como observado na Figura 2E-H. Nas plantas adultas a média observada para DP foi de (24,74mm<sup>2</sup>) e DIE com (39,17mm<sup>2</sup>). Essas características de estômatos elípticos com menores dimensões são essenciais para otimizar a sobrevivência e a capacidade fotossintética durante as fases da aclimatização.

### **Mesofilo**

Abaixo da epiderme ocorre uma camada de hipoderme (Figura 3C), em ambiente artificial. Verifica-se que na concentração 0,0 e 0,5 mL L<sup>-1</sup> de silicato de potássio, em ambiente artificial, e (Figuras 4D-G) com concentrações de 0,5 e 1 mL L<sup>-1</sup> de silicato de potássio em ambiente natural ocorre um alongamento e expansão das células dessa camada, sem espaços intercelulares, fator de extrema importância para as plântulas que serão transferidas para a aclimatização, já que a presença de hipoderme com alongamento celular periclinal, propicia maior concentração ou reserva de água, processos fundamentais para que não ocorra o estresse hídrico nas plântulas *ex vitro*.

Na Tabela 2 observa-se que o aumento do limbo foi influenciado não somente pelas doses de Si aplicados, como também pela incidência luminosa nos dois ambientes, verificando que a luz artificial 602,27 Lux (lúmen/m<sup>2</sup>), associada a doses de silicato 0,0 e 0,5 mL L<sup>-1</sup> propiciaram a mesma

significância para o aumento do limbo, diferente do ambiente com luz natural 939,21 Lux (lúmen/m<sup>2</sup>) onde a dose de silicato de potássio foi o dobro 1mL L<sup>-1</sup> para se conseguir espessura semelhante.

O aumento na espessura do mesofilo, principalmente pelo alongamento ou adição de células paliçádicas, está relacionado à redução na resistência do mesofilo ao dióxido do carbono (NOBEL, 1977) e correlacionado com aumento de fatores potencialmente limitantes à fotossíntese, como a RuBisco, carregadores de elétrons ou condutância estomatal (BJORKMAN, 1981). Chazdon e Kaufman (1993), estudando duas espécies de Piper, observaram que a capacidade fotossintética estava correlacionada com a espessura do mesofilo. Nesse contexto mesofilo com dimensões maiores, são fundamentais para o processo fotossintético e essenciais no processo de transplântio do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro*, onde a planta sofre estresse devido principalmente à diferenciação de substrato ao qual estava submetida, com dosagens de açúcares ao meio, passando da condição autótrofa para heterotrófica.

Diferente dos resultados aqui encontrados, Lee et al. (1988), Dousseau et al. (2008) atribuíram a altas intensidades de luz um aumento no tamanho das células do mesofilo, conseqüentemente uma maior espessura da folha, bem como a uma compactação celular mais pronunciada, em folhas cultivadas de *Liquidambar*. Os autores afirmaram ainda, que baixa intensidade luminosa diminui a divisão celular, resultando em reduzida área foliar, produzindo folhas mais delgadas. Para a planta em estudo os resultados foram inversos, onde menores luminosidades propiciaram aumento no limbo (Tabela 2). Segundo Taiz & Zeiger (2004), esta é uma estratégia adaptativa que pode proporcionar melhor captura de luz e permitir maior eficiência fotossintética para maiores ganhos de carbono devido à maior área foliar para captação da energia luminosa.

As diferenças dos resultados também podem ser interpretadas pelo fato de que o crescimento de plantas, órgãos, tecidos e células *in vitro* dependem da formulação dos meios de cultura, pois é necessário o desenvolvimento de meios de cultura otimizados para cada espécie e da perfeita interação de

componentes essenciais como fontes de carbono e nutrientes minerais (PASQUAL, 2001).

Segundo Saebo et al., 1995; Schuerger et al., 1997, a qualidade e quantidade da luz podem interferir na espessura, na diferenciação do mesofilo e do sistema vascular, na divisão celular e no desenvolvimento dos estômatos da folha, propiciando uma elevada plasticidade fisiológica e anatômica nas plantas.

Dimensões maiores nos tecidos do mesofilo foliar conferem à planta cultivada *in vitro* maior possibilidade de sobrevivência durante a transferência para ambiente *ex vitro*, o que é um fator importante para o sucesso da cultura de tecidos (BARBOZA et al., 2006; SILVA et al., 2008).

### **Nervura central**

Não houve interação entre os fatores luminosidade e doses através dos dados estatísticos utilizados para o diâmetro da nervura central. Contudo a maior espessura foi em ambiente artificial com 235.66 mm. Para as doses os maiores resultados foram obtidos sem a utilização de silicato no meio de cultura com 239.05 mm e 224.46 mm no meio de cultura alternativo acrescido de 1,0 mL L<sup>-1</sup> de silicato de potássio.

A estrutura da anatomia foliar pode ser influenciada pelos níveis de luminosidade durante o crescimento, devido a sua plasticidade. A capacidade de alterar a estrutura das folhas em resposta a diferentes níveis de luz é um atributo comum das espécies que apresentam amplo potencial de aclimatização (BJORKMAN, 1981). A adaptação da planta ao ambiente de luz natural depende do ajuste de seu aparelho fotossintético, de modo que a luminosidade ambiental seja utilizada de maneira mais eficiente. As respostas dessas adaptações serão refletidas no desenvolvimento geral da planta. Assim, a eficiência do crescimento está relacionada à capacidade de adaptação das plântulas às condições de intensidade luminosa do ambiente. Nesse experimento quando observamos as figuras 3C-D em ambiente artificial e figuras 4D-G, ambiente natural, verifica-se que ocorreu alongamento celular, o qual proporciona maior captação de CO<sub>2</sub> e melhor aparato funcional para o processo fotossintético.

Foram observadas fibras extravasculares na nervura central, e estas desempenham diferentes funções na planta, como sustentação, proteção contra a perda de água e atenuação da intensidade luminosa (EAMES & MCDANIELS, 1925). Acredita-se que todas essas funções sejam desempenhadas pelas fibras presentes nos acessos em estudo, mesmo as fibras sendo em pouca quantidade.

### **Outras Considerações**

Várias alterações na estrutura da folha de plantas mantidas *in vitro* têm sido relatadas, como o aumento no tamanho 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). No presente trabalho não foram observados amplos espaços intercelulares, e nas plântulas com adição de silicato de potássio houve incremento na cutícula e parede celular, propiciando maior espessamento, quando comparadas com as vitroplantas do tratamento controle (Meio alternativo s/adicação de silicato de potássio).

Silva et al. (2006) também afirmam que tanto a água como os nutrientes minerais associados a fatores abióticos exercem influência sobre as características estruturais do vegetal. Nesse contexto a inserção do silicato de potássio demonstra ser eficiente para a plantas cultivadas *in vitro* nesse trabalho, já que estas se assemelham mais com a planta de ambiente natural, sendo um indicativo que teriam maior sobrevivência no ambiente *ex vitro*.

### **Conclusões**

Os melhores resultados observados com a aplicação de  $K_2SiO_3$  em meio alternativo, nos ambientes TAA (luminosidade artificial), TAN (luminosidade natural), foram alongamento da hipoderme (doses 0,5 e  $1\text{ mL L}^{-1}$ ); mesofilo mais espesso ( $0,0$  e  $0,5\text{ mL L}^{-1}$  TAA) e nervura central mais proeminente ( $0,0\text{ mL L}^{-1}$  TAA); formato das células guardas elípticas ( $0,5\text{ mL L}^{-1}$  e  $1\text{ mL L}^{-1}$  TAA); formação de câmaras supraestomáticas ( $0,5\text{ mL L}^{-1}$ ); menor densidade estomática ( $1\text{ mL L}^{-1}$ ); estômatos com menores diâmetros equatorial e polar ( $0,0$  e  $1,0\text{ mL L}^{-1}$ ).

Os caracteres acima citados promovem menor estresse hídrico nas plantas cultivadas *in vitro*, inferindo que esse conjunto de características na planta propicia maior chance de sobrevivência também *ex vitro*. Observando que o ambiente que propiciou maiores diferenças favoráveis para a aclimatização foram menores intensidades luminosas e menores doses de silicato de potássio.

## Referências Bibliográfica

ABRAMS, R. A.; BROWN, R. A. & BOTTE, M. The superficial branch of the radial nerve: an anatomic study with surgical implications. *J. Hand. surg.* 17:1037-41, 1992.

AGUIAR T.V.; SANT'ANNA-SANTOS B.F.; AZEVEDO A.A.; FERREIRA R.S. ANATI QUANTI: Software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. *Planta Daninha*, v.25, n.4, p.649-659, 2007.

APÓSTOLO, N. M.; BRUTTI, C. B.; LLORENTE, B. E. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. *In Vitro Cell Developmental Biological Plant*, [s.l.], v. 41, p. 307-313, may/jun. 2005.

ARAÚJO, A. G. et al. Crescimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl. em diferentes espectros luminosos associados com ácido giberélico. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 56, n. 5, p. 542-546, set/out. 2009.

BARBOZA, S. B. S. C. et al. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 2, p. 185-194, fev. 2006.

BARROS, F., VINHOS, F., RODRIGUES, V.T., BARBERENA, F.F.V.A., FRAGA, C.N. Orchidaceae in R.C. Forzza, et al (org.). Catálogo de plantas e Fungos do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v.2., p.1344- 1426, 2010.

BENELLI, P. A. **Orquideas de Mato Grosso - Genus *Catasetum* L.C.Rich ex Kunth**. 1. ed. Rio de Janeiro: CTRL C Editora Ltda, 2012. 129 p.

BENEVENUTI, S. A. et al. Anatomia foliar de três espécies do gênero *Catasetum*. In: I SEMINÁRIO DE BIODIVERSIDADE E AGROECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS, n. 1, Alta Floresta. 2013. 1 CD-Rom.

BIDWELL, R.G.S. Protein synthesis and turnover in cultured plant tissue: source of carbon and fate of protein breakdown products. *Nature*, v. 203, p. 367-373, 1964.

BJORKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O. L. et al (Ed.). **Physiological plant ecology**: responses to physical environment. Berlin: Springer-Verlag, 1981. p. 57-107.

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

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

CHAZDON, R. L.; KAUFMAN, S. Plasticity of leaf anatomy of two rain forest shrubs in relation to photosynthetic light acclimation. *Functional Ecology*, [s.l.], v. 7, p. 385-394, 1993.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal - parte I: células e tecidos**. 2. ed. São Paulo: Ed. Roca, 1986. 336 p.

DANTAS, A. K. et al. Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions. **Plant Growth Regulation**, [s.l.], v. 33, p. 237-243, 2001.

DESJARDINS, Y. Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plantlets and their effect on acclimatization. In: CARRE, F.;

DOUSSEAU, S. et al. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, nov/dez. 2008.

EAMES, A. J.; MAC DANIELS, L. H. **An introduction plant anatomy**. 2. ed. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc., 1925.

EPSTEIN, E. 1999. Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 50, p. 641-664, 1999.

EVERT, R. F. **Esau's plant anatomy. Meristems, cells, and tissues of the plant body – their structure, function and development**. 3. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006. 601 p.

FAHN, A.; CUTLER, D. **Xerophytes**. Ilustrada ed. Berlin: Gebruder Borntraeger, 1992.

FERREIRA, D. F. SISVAR 4,6 - programa de análise estatística. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2003. 1 CD-ROM.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE – FEMA. **Parque Estadual Cristalino: um lugar para se conservar**. Cuiabá: FEMA, 2002. 20 p.

GUNES, A. et al. Silicon-mediated changes on some physiological and enzymatic parameters symptomatic of oxidative stress in barley grown in sodic-B toxic soil. **Journal of Plant Physiology**, [s.l.] v. 164, n. 6, p. 807-811, jun. 2007.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 105-120, 2006.

Instituto de Geografia e Estatística - IBGE. **Recursos Naturais e Meio Ambiente: Uma Visão do Brasil**. Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/popul/d...>> Acesso em: out 2013.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc, 1940. 790 p.

KHAN, P. S. S. V. et al. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 141-146, 2002.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997. v. 1, 198 p.

KURZWEIL, H. et al. Comparative vegetative anatomy and classification of *Diseae* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 117, p. 171-220, 1994.

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

LUKOVIĆ, J. et al. Histological characteristics of sugar beet leaves potentially linked todrought tolerance. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 281-286, 2009.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006.

MEIRA, R. M. S. A.; MARTINS, F. M. Inclusão de material herborizado em metacrilato para estudos de anatomia vegetal. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 109-112, 2003.

NOBEL, P. S. Internal leaf área and cellular CO<sub>2</sub> resistance: photosynthetic implication of variations with growth conditions and plant species. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v. 40, n. 2, p. 137-144, 1977.

OLIVEIRA, V. D. C.; SAJO, M. G. Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 365-374, 1999.

PASQUAL M. Curso de especialização à distância cultura de tecidos vegetais (CTV). Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

PASQUAL, M. et al. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 324-329, jul/set. 2011.

PEDROSO DE MORAES, C. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 67-69, 2009.

PETINI-BENELLI, A.; GRADE, A. A new species of *Catasetum*.for the state of Mato Grosso, Brazil. **Edinburgh Journal of Botany**, Edinburgh, v. 65, n. 1, p. 1-8, 2008.

POMPELLI, M. F. et al. What is the influence of ordinary epidermal cells and stomata on the leaf plasticity of coffee plants grown under full-sun and shady conditions? **Brazilian Journal Biology**, São Carlos, v. 70, n. 4, p. 1083-1088, nov. 2010.

RAMOS, T. V.; CARNEIRO, I. F. Multiplicação “*in vitro*” de *Cattleya x mesquittae* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiás, v. 37, n. 1, p.10-15, mar. 2007.

RASMUSSEN, H. Orchid stomata - structure, differentiation, function, and phylogeny. In: J. Arditti (ed.). **Orchid Biology: reviews and perspectives**. New York, Cornell University Press, 1987. p. 105-138.

RIBEIRO, M. N. O. et al. Anatomia foliar de mandioca em função do potencial para tolerância à diferentes condições ambientais. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 354-361, abr/jun. 2012.

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

RODRIGUES, D. T. et al. Concentrações e composições químicas do meio nutritivo para o cultivo *in vitro* de orquídea. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 1, p. 1-8, 2012.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, Franckfurt, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1962.

SAEBO, A. et al. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plan Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 177-185, 1995.

SANTIAGO, E. J. A. et al. Aspectos da anatomia foliar da pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l.], v. 25, n. 5, p. 1035-1042, 2001.

SCHUERGER, A. C. et al. Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annum* L.) growth under red light emitting diodes supplemented with blue or far-red light. **Annals of Botany**, London, v. 79, n. 3, p. 273-282, 1997.

SELUCHINESK, R. D. R. **De heróis a vilões: imagem e auto-imagem dos colonos da Amazônia Mato-grossense**. 2008. 262 f. Tese (Doutorado em Política e Gestão Ambiental) – Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade de Brasília, [s.l.] 2008.

SILVA, M. F. F.; SILVA, J. B. F. **Orquídeas nativas da Amazônia brasileira II**. 2. ed. Rev. Belém: Museu Paraense Emilio Goeldi, 2010.

SILVA, A. B. et al. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr). **Interciencia**, Caracas, v. 33, n. 11, p. 839-843, nov. 2008.

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

SILVA, I. V. et al. Estratégias anatômicas foliares de treze espécies de Orchidaceae ocorrentes em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra

do Brigadeiro (PESB) – MG, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 741-750, jul/set. 2006.

SILVA, M. F. F.; SILVA, J. B. F. **Orquídeas nativas da Amazônia brasileira II**. 2 ed. rev. Belém: Universidade Federal Rural da Amazônia/Museu Paraense Emílio Goeldi, 2004. 540 p.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 449-484.

TRENHOLM, L. E.; DATNOFF, L. E.; NAGATA, R. T. Influence of silicon on drought and shade tolerance of St. Augustinegrass. **Horttechnology**, [s.l.], v. 14, n. 4, p. 487-490, 2004.

WAECHTER, J. L. **O epifitismo vascular na Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. 1992. 163f. Tese (Doutorado em Botânica) - Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 1992.

ZHOU, T. S. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, [s.l.], v. 75, n. 1, p. 605-607, 1995.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

Todos os tratamentos apresentam a formação de raízes, porém a interação de silicato com as variações de luminosidade proporcionou decréscimo no número de raízes para as concentrações de 0,5 e 1,0 mL L<sup>-1</sup>. Tamanhos menores de raízes são fundamentais no processo de aclimatização, inferindo que doses menores de silicato são recomendadas.

Observando os dados é possível inferir que na dose de 0,5 mL L<sup>-1</sup> nos dois ambientes testados ocorre aumento na média do número de folhas e também que com o aumento das doses e que o ambiente com luminosidade artificial propiciou melhores resultados no comprimento das folhas.

Para a média do comprimento total, a luz natural associada à inclusão de silicato de potássio ao meio de cultura, na concentração de 1 mL L<sup>-1</sup> propiciou maior crescimento da planta. Os melhores tratamentos para a presença de pseudobulbos é o meio alternativo sem a adição de silicato de potássio, nas duas condições de luminosidade e o tratamento com 0,5 mL L<sup>-1</sup> de silicato de potássio em ambiente artificial.

Na concentração de 0,5 mL L<sup>-1</sup> de silicato e 1 mL L<sup>-1</sup> houve um acréscimo com teores de clorofila total em ambiente artificial.

Através das análises anatômicas, observou-se que os melhores resultados com a aplicação de K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> em meio alternativo, nos ambientes TAA (luminosidade artificial), TAN (luminosidade natural), foram: alongamento da hipoderme; mesofilo mais espesso e nervura central mais proeminente; formato das células guardas elípticas; formação de câmaras supraestomáticas; menor densidade estomática e estômatos com menores diâmetros equatorial e polar.

Os caracteres acima citados promovem menor estresse hídrico das plantas cultivadas *in vitro*, inferindo que esse conjunto de características propicia maior chance de sobrevivência também *ex vitro*. Observando que as maiores diferenças favoráveis para a aclimatização foram menores intensidades luminosas e menores doses de silicato de potássio.

É possível inferir que a utilização de silicato de potássio na concentração de 0,5 mL<sup>-1</sup> no meio de cultura alternativo foi benéfico e que as plantas de

*Catasetum x apolloi* com os caracteres observados, têm capacidade de se adaptar mais facilmente durante o processo de aclimatização.