

## Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas

Moacir Pasqual; Joyce DR Soares; Filipe A Rodrigues; Aparecida G de Araujo; Roseneide R dos Santos

UFLA-Depto Agricultura, C. Postal 3037, 37200-000 Lavras-MG; mpasqual@dag.ufla

### RESUMO

Objetivou-se avaliar a influência do ambiente de cultivo e de concentrações de silicato de cálcio no crescimento *in vitro* de uma espécie nativa de orquídea (*Brassavola perrine*) e de um híbrido [(*Laelia cattleya* Culminant "Tuilerie" x *Laelia cattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaelia cattleya* Startifire Moon Beach]. Plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* com aproximadamente 0,5 cm de comprimento foram inoculadas em frascos com capacidade para 250 mL contendo 60 mL de meio de cultura MS, acrescido de silicato de cálcio (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>) em ambientes de cultivo [natural (casa de vegetação) e artificial (em sala de crescimento)], em todas as combinações possíveis. O meio de cultura teve seu pH ajustado para 5,8±0,1 e geleificado com 5,5 g L<sup>-1</sup> de ágar antes do processo de autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Ao final de 150 dias foram realizadas avaliações biométricas e análises micromorfológicas (microscopia de varredura) nas plântulas. Maior crescimento foi obtido com a utilização de 2,0 mg L<sup>-1</sup> e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de silicato de cálcio para o híbrido e espécie nativa, respectivamente, em sala de crescimento. As orquídeas em estudo são espécies anfistomáticas, com estômatos do tipo tetracítico (híbrida) e anomocítico (nativa). A presença do silício na estrutura foliar proporcionou o correto desenvolvimento (ausência de deformações estruturais) de plântulas de orquídeas.

**Palavras-chave:** *Brassavola perrine*, *Laelia cattleya*, *Brassolaelia cattleya*, cultura *in vitro*, microscopia, anatomia vegetal, biometria.

### ABSTRACT

#### Light quality and silicon on growth *in vitro* of native and hybrid orchid species

The vegetative propagation techniques using tissue culture can be a valuable tool in the production of orchid seedlings. The objective of this study was to determine the concentration of calcium silicate and light quality that provides better growth in seedlings of native orchid (*Brassavola perrine*) and hybrid [(*Laelia cattleya* Climax "Tuilerie" x *Laelia cattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaelia cattleya* Startifire Moon Beach]. Seedlings from seeds germinated *in vitro* with approximately 0.5 cm long were inoculated in 250 mL flasks containing 60 mL of culture medium MS, plus calcium silicate (0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg L<sup>-1</sup>) in environments of culture [natural (a greenhouse) and artificial (in a growth room)] in all possible combinations. The culture medium had its pH adjusted to 5.8 ± 0.1 and solidified with 5.5 g L<sup>-1</sup> of agar before autoclaving at 121°C and 1 atm for 20 minutes. After 150 days biometrics and ultrastructural analysis (scanning microscopy) were carried out. Greater growth of seedlings was obtained with the use of 2.0 mg L<sup>-1</sup> and 1.0 mg L<sup>-1</sup> of calcium silicate for hybrid and native species, respectively. The orchid species in study are anfistomatic with the type tetracytic (hybrid) and anomocytic (native) stomata. The presence of silicon in the leaf structure provided correct development (absence of structural deformations) of seedlings of orchids.

**Keywords:** *Brassavola perrine*, *Laelia cattleya*, *Brassolaelia cattleya*, *in vitro* culture, microscopy, plant anatomy, biometrics.

(Recebido para publicação em 25 de março de 2010; aceito em 19 de agosto de 2011)

(Received on March 25, 2010; accepted on August 19, 2011)

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de grande valor comercial, devido, principalmente, à sua capacidade de combinação genética e à beleza, forma e cor de suas flores. Dificilmente essas espécies formam sementes na natureza, e, quando formam, apenas 3 a 5% germinam (Tombolato & Costa, 1998).

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. As primeiras aplicações da micropropagação na multiplicação e crescimento de espécies do gênero *Orchidaceae* datam da década de 1960 (Tombolato & Costa, 1998). Desde então, houve intensificação nas pesquisas

visando diminuição dos custos de produção, obtida através da substituição das lâmpadas fluorescentes utilizadas nas salas de crescimento pela luz natural, e modificações na formulação do meio de cultivo (Rocha *et al.*, 2007). Gastos com iluminação artificial nas salas de cultivo somam, aproximadamente, 65% do total de energia elétrica utilizada nos laboratórios de cultura de tecidos de plantas (Standaert-de-Metsanaere, 1991).

Efeitos benéficos da luz natural e de modificações na composição nutricional dos meios de cultura foram observados na micropropagação de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) cv. Yellow Malayan Dwarf com redução nos custos de produção das mudas (Talavera *et al.*, 2005). Modificações na composição do meio

de cultivo, como a adição de fontes de silício, promovem 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). A ação benéfica do silício tem sido associada a diversos efeitos indiretos como aumento da eficiência da capacidade fotossintética, redução da transpiração, crescimento de plantas e aumento da resistência mecânica das células (Zhou, 1995). Em estudo com morangueiro, Braga (2009) verificou que a deposição de cera foi observada com a utilização de silicato de sódio (NaSiO<sub>3</sub>) evitando com isso a perda de água pela epiderme.

A utilização da microscopia eletrônica de varredura possibilita a produção de imagens de alta resolução da superfície de uma amostra, devido à maneira com que as imagens são criadas, fornecendo uma aparência tridimensional em que as características são úteis para avaliar a estrutura superficial de uma dada amostra (Alves, 2004).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a influência da qualidade de luz no ambiente de cultivo e de concentrações de silicato de cálcio no crescimento *in vitro* de uma espécie nativa de orquídea (*Brassavola perrine*) e um híbrido [(*Laeliacattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laeliacattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaelia cattleya* Startifire Moon Beach], por meio de análise fitotécnica e micromorfológica.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido entre os meses de março e agosto de 2008, em laboratório do Departamento de Agricultura, da UFLA, no município de Lavras.

Plântulas de uma espécie nativa de orquídea (*Brassavola perrine*) e um híbrido [(*Laelia cattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laelia cattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaelia cattleya* Startifire Moon Beach], advindas de germinação *in vitro* de sementes oriundas de autofecundação (nativa) ou polinização cruzada (híbrido) foram utilizadas. As sementes foram germinadas em meio de cultura Knudson C (Knudson, 1946) modificado em  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (de 0,331 para 6,62 mg  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (de 0,056 para 1,4 mg  $\text{L}^{-1}$ ) e  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (de 7,5 para 15 mg  $\text{L}^{-1}$ ) (Carvalho *et al.*, 2009), onde permaneceram por três meses. Após este período, cada plântula de aproximadamente 0,5 cm de comprimento foi inoculada em frascos com capacidade para 250 mL contendo 60 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de silicato de cálcio (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg  $\text{L}^{-1}$ ), pH ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  e gelificado com 5,5 g  $\text{L}^{-1}$  de ágar antes do processo de autoclavagem a  $121^\circ\text{C}$  e 1 atm por 20 minutos. As culturas foram mantidas sob luz natural (casa de vegetação) e luz artificial (sala de

crescimento), por 150 dias. Foram realizados dois experimentos idênticos, sendo um para a espécie nativa e outro para o híbrido.

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  $42 \text{ W/m}^2$ , fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . No ambiente natural a casa de vegetação tinha iluminação natural, sombreamento de 70% (Sombrence®), apresentando os seguintes parâmetros ambientais: temperaturas máximas, mínimas e médias de  $26^\circ\text{C}/32^\circ\text{C}$ ,  $16^\circ\text{C}/16^\circ\text{C}$  e  $20^\circ\text{C}/23^\circ\text{C}$  e níveis de irradiância, máximos, mínimos e médios, de  $93,95 \text{ W/m}^2/199,69 \text{ W/m}^2$ ,  $11,13 \text{ W/m}^2/10,66 \text{ W/m}^2$  e  $49,38 \text{ W/m}^2/99,43 \text{ W/m}^2$ , referentes a dias nublados e claros típicos do período de condução do experimento.

Dados referentes à radiação solar diurna, incidente na altura dos frascos na sala de crescimento e casa de vegetação, foram obtidos por sensores de radiação (LI-200SA, Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Li-cor.Neb), a cada meia hora, durante 11 horas (das 7:00 às 18:00 horas). Para o ambiente de sala de crescimento, foi feita apenas uma medida da radiação, durante 6 horas, visto tratar-se de ambiente controlado. Para a coleta de dados referentes às temperaturas mínimas, médias e máximas semanais, empregou-se um termo-higrógrafo.

Ao final de 150 dias foram avaliados o número de brotos e folhas emitidos, comprimento médio dos brotos e da parte aérea e massa seca de plântulas (após secagem em estufa, a  $60^\circ\text{C}$ , por 72 horas, até peso constante).

Amostras do terço mediano de 3 folhas em 5 plantas foram fixadas em Karnovsky (Karnovsky, 1965), pós fixadas em tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) e, em seguida, desidratadas em soluções crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo então submetidas à secagem ao ponto crítico, utilizando-se  $\text{CO}_2$  como líquido de transição (Robards, 1978). Posteriormente, foram recobertas com ouro (20 nm) e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura LEO-EVO, seguindo pro-

toloco pré determinado (Alves, 2004).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, tanto no experimento com orquídea nativa (*Brassavola perrine*) quanto para o híbrido [(*Laelia cattleya* Culminant “Tuilerie” x *Laelia cattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaelia cattleya* Startifire Moon Beach], ambos em esquema fatorial  $2 \times 4$ , sendo dois ambientes (natural e artificial) e 4 concentrações de silicato de cálcio ( $\text{CaSiO}_3 = 0,0; 0,5; 1,0$  e  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), 4 repetições formadas de 3 plântulas, ou seja, 12 plântulas por tratamento.

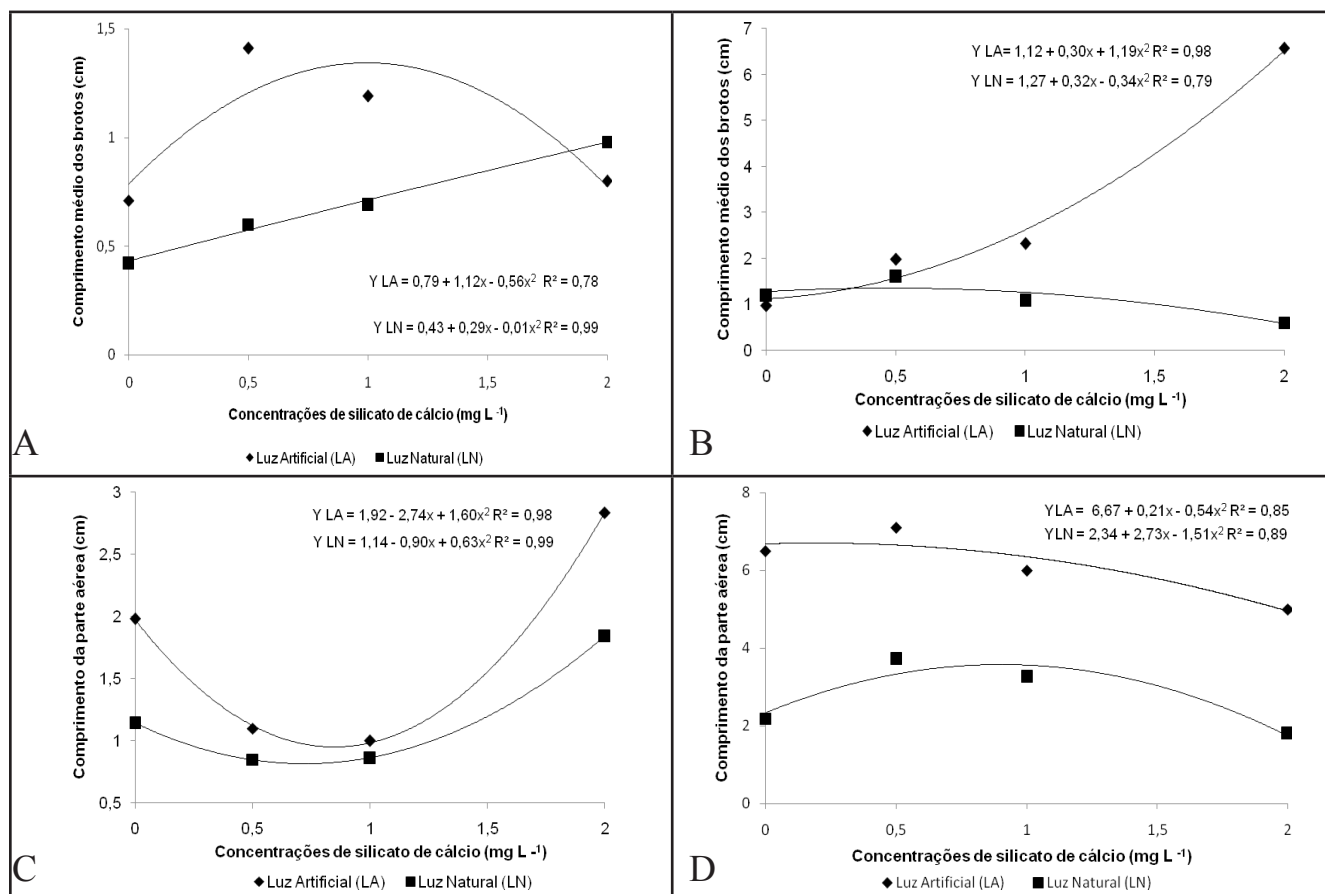
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância usando-se o programa estatístico Sisvar 4.3 (Ferreira, 2000), sendo as médias comparadas pelo Teste F, a 5% de probabilidade sem que houvesse transformação de dados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Interação entre os fatores estudados (concentrações de silicato de cálcio e ambientes de cultivo) foi observada nas variáveis relativas à parte aérea (comprimento médio dos brotos e da parte aérea, número de folhas) e também na massa seca de plântulas de ambas as espécies (Figuras 1 e 2).

Foi verificado maior comprimento médio dos brotos (1,34 cm) no genótipo híbrido (Figura 1A), a utilização de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de silicato de cálcio e luz artificial na sala de crescimento, mostrou maior eficiência (1,34 cm) em termos de aumento de tamanho, sendo que a partir desse valor houve decréscimo de forma quadrática no tamanho dos brotos. Na espécie nativa (Figura 1B), maior comprimento dos brotos (6,62 cm) foi obtido com a máxima concentração de silicato de cálcio testada ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), também em sala de crescimento. Nas duas espécies, o tamanho dos brotos em casa de vegetação foi significativamente menor, sendo que o híbrido apresentou maior comprimento (0,9 cm) com  $2 \text{ mg L}^{-1}$  e a nativa mostrou maior resultado (1,35 cm) com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de silicato de cálcio.

Quanto ao crescimento da parte aérea no híbrido (Figura 1C), o maior resultado (2,84 cm) foi obtido com a uti-



**Figura 1.** (A) comprimento médio dos brotos do genótipo híbrido e (B) da espécie nativa; (C) comprimento da parte aérea (cm) do genótipo híbrido e (D) da espécie nativa de orquídea utilizando diferentes concentrações de silicato de cálcio e em ambientes de cultivo (luz artificial e natural) ((A) shoots average length of hybrid and (B) native species, (C) aboveground part length (cm) of hybrid and (D) native species of orchid using different concentrations of calcium silicate and cultivation environments (artificial and natural light)). Lavras, UFLA, 2010.

lização de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de silicato de cálcio em sala de crescimento. Já em casa de vegetação, o maior resultado ( $1,9 \text{ cm}$ ) também foi observado com a mesma concentração, porém o comprimento foi significativamente menor. Para a espécie nativa (Figura 1D), o maior comprimento foi obtido com a utilização de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de silicato de cálcio, atingindo um máximo de  $7,1 \text{ cm}$  em luz artificial (sala de crescimento), resultado este que foi superior ao obtido sob condições de luz natural ( $3,57 \text{ cm}$ ), mesmo com uma concentração maior de silicato de cálcio ( $0,90 \text{ mg L}^{-1}$ ).

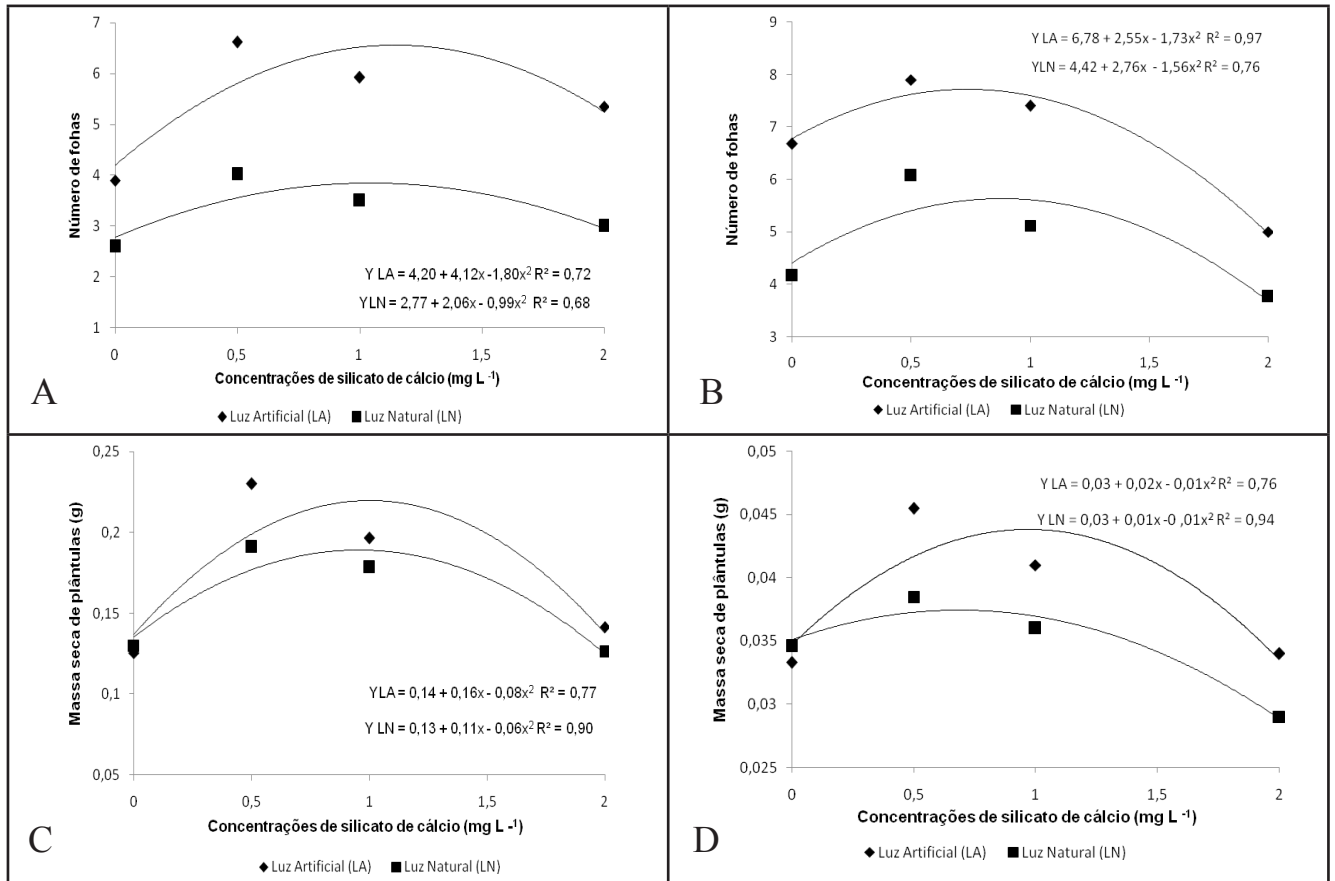
Os dados apresentados sugerem efeitos benéficos na adição de silício (Si) ao meio de cultura e no cultivo de plântulas em sala de crescimento (luz artificial), corroborando resultados obtidos em estudos com *Phalenopsis* (Zhou, 1995) e *Lycopersicon esculentum* (Romero-Aranda *et al.*, 2006). Tanto para o híbrido, quanto para a espécie

nativa, o acréscimo de silicato de cálcio promoveu crescimento da parte aérea dessas plântulas, fato que foi observado por Zhou (1995), onde o aumento de tamanho das folhas de *Phalaenopsis* foi obtido com a adição de concentrações de  $0,1$ - $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de silicato de cálcio ao meio de cultura VW modificado (Vacin & Went, 1949), e por Romero-Aranda *et al.* (2006), em que o máximo comprimento das folhas de *Lycopersicon esculentum* (tomateiro) foi encontrado com concentrações de  $0,1$ - $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de silicato de potássio em solução nutritiva de Hoagland.

Essa diferença de resultados poderia ser explicada pelo fato de que o crescimento de plantas, órgãos, tecidos e células *in vitro* depende do 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).

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 consequentemente, aumentando o dimensionamento da célula (Romero-Aranda *et al.*, 2006).

Analisando-se o número de folhas das duas espécies de orquídeas, observa-se um comportamento semelhante. As duas obtiveram melhores resultados na presença de luz artificial, sendo que a orquídea híbrida apresentou maior número de folhas ( $6,56$ ) com a utilização de  $1,1 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 2A) e a espécie nativa ( $7,72$ ) com a utilização de  $0,7 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 2B). Ambas mostraram decréscimo no número de folhas com o aumento na concentração de silicato de cálcio, provavelmente devido ao fato de



**Figura 2.** Número de folhas no genótipo híbrido (A) e na espécie nativa(B); matéria seca de plântulas (g) do genótipo híbrido (C) e da espécie nativa (D) em diferentes concentrações de silicato de cálcio e ambientes de cultivo (luz artificial e natural) ((A) leaf number of hybrid and (B) native species, (C) dry mass of seedlings (g) of hybrid and (D) native species at different concentrations of calcium silicate and culture environments (artificial and natural light)). UFLA, Lavras, 2010.

que todo nutriente em excesso provoca desbalanço nutricional causado por sua maior concentração na planta ou por interações com outros elementos provocando deficiência ou acúmulo excessivo (Malavolta, 2006).

Comportamento semelhante também foi observado para massa seca de plântulas do híbrido e da espécie nativa, observando-se maior incremento no ambiente de sala de crescimento (LA) acrescido de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de silicato de cálcio, onde obteve-se 0,22 g para o híbrido (Figura 2C) e 0,0438 g para a espécie nativa (Figura 2D).

Os dados positivos para número de folhas e massa seca de plântulas são concordantes com resultados encontrados por Silva (2007) que, trabalhando com gérbera (*Gerbera jamesonii*), verificou maior número de folhas utilizando silicato de cálcio em relação às demais fontes de silício (silicato de sódio, cálcio e de potássio e ácido salicílico), indican-

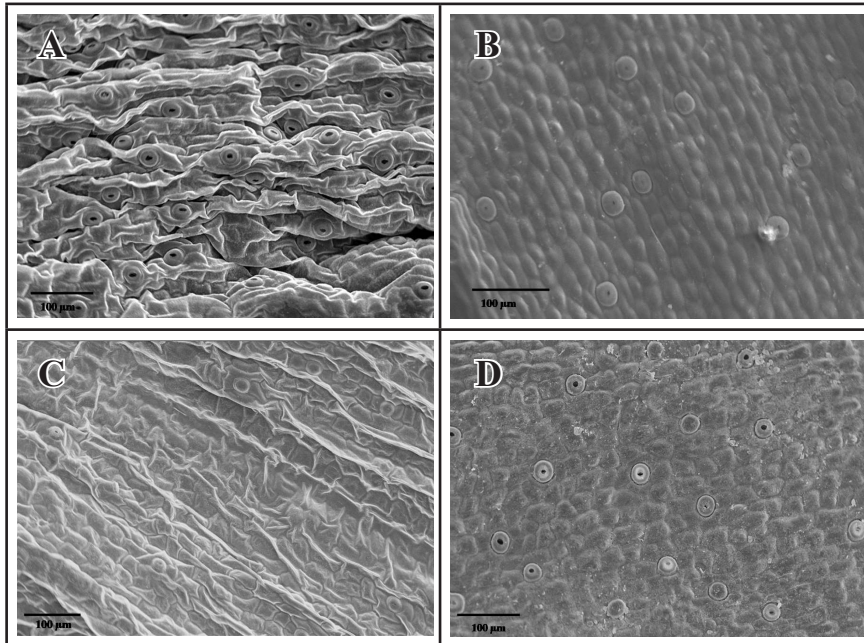
do que este elemento é absorvido pelas raízes e translocado para a parte aérea, onde desempenha papéis fisiológicos e estruturais na anatomia da folha (Barros *et al.*, 2002).

De modo semelhante, Romero-Aranda *et al.* (2006) evidenciaram maior massa de plântulas de tomate com a utilização de silicato de potássio e de cloreto de sódio. Trabalhando com orquídea *Phalaenopsis*, Zhou (1995) também constatou incremento em massa com a utilização de silicato de cálcio.

O silício tende a acumular-se nas folhas, formando uma barreira protetora e regulando a perda de água da planta por transpiração, auxiliando o processo de aclimatização das plantas micropagadas. Ao serem transferidas para o ambiente *ex vitro*, a principal causa de mortalidade durante esse processo é devido à perda de água, pela baixa funcionalidade dos estômatos e camada delgada de cera epicuticular (Barros *et*

*al.*, 2002).

Nas superfícies adaxial e abaxial (folha anfiestomática) foi verificada a presença de estômatos do tipo tetracítico tanto no híbrido quanto na espécie nativa independente do tratamento com silício. Estudos da anatomia do estômato, em conjunto com respostas fisiológicas, podem mostrar evidências de aclimação adaptativa a determinados ambientes (Dunlapp & Stettler, 2001). A deposição de cera epicuticular foi visualizada nas duas epidermes das folhas de orquídea submetidas a tratamento com diferentes concentrações de silício, em relação ao tratamento controle (ausência de CaSiO<sub>3</sub>) (Figura 3). A deposição de cera também foi observada na cultura do morangueiro com a utilização de silicato de sódio (NaSiO<sub>3</sub>) por Braga *et al.* (2009). Com isso, evitou-se a perda de água pelas células da epiderme. Zanega-Godoy & Costa (2003) observaram estômatos tetracíticos para quatro espécies



**Figura 3.** Eletromicrografia feita em microscópio de varredura em folhas de dois genótipos de orquídeas submetidas a diferentes concentrações de silicato de cálcio em sala de crescimento: ausência de silicato de cálcio, (A) espécie híbrida e (C) espécie nativa; espécie híbrida com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de CaSiO<sub>3</sub> (B) e espécie nativa 0,5 mg L<sup>-1</sup> de CaSiO<sub>3</sub> (D) (electron micrograph of orchid leaves exposed to different concentrations of calcium silicate and culture environments: Room for growth and absence of calcium silicate (A) hybrid species and (C) native species; room for growth and 2.0 mg L<sup>-1</sup> CaSiO<sub>3</sub> (B) and 0.5 mg L<sup>-1</sup> CaSiO<sub>3</sub>(D)). UFLA, Lavras, 2010.

do gênero *Cattleya* (nativas do planalto central brasileiro), em ambas as faces foliares, como no presente estudo em que foram observados estômatos do tipo tetracítico nas faces abaxial e adaxial.

O tratamento controle, tanto no ambiente de casa de vegetação quanto em sala de crescimento, apresentou deformações na epiderme em relação aos tratamentos que continham concentrações de silício em ambos os ambientes (Figura 3A, B, C e D). Em algumas espécies da família Orchidaceae, ocorrem células chamadas stegmatas, que são células de morfologia variada, mas, geralmente elipsoides ou arredondadas. Esses stegmatas possuem impregnação de sílica e necessitam desse nutriente para o adequado desenvolvimento anatômico (Piwpuan & Thammathaworn, 2008; Stern & Carlswald, 2008).

A deformação das células da epiderme foi verificada nos tratamentos sem silício. Isto pode ser comprovado devido ao fato de que este nutriente pode se depositar nas paredes celulares dessas células e assim conferir resistência ao tecido (Piwpuan & Thammathaworn,

2008). A má formação dessas estruturas que ocasionaram deformações estruturais, podem não ter se restringido apenas à epiderme, mas possivelmente ao parênquima, devido a um aumento da sinuosidade dessas paredes.

Na epiderme foliar, o silício combina-se com a celulose, podendo estar presente nas células-guarda dos estômatos e nos tricomas (Silva *et al.*, 2005). Segundo estes autores, o silício também pode ser encontrado nos elementos vasculares. A deposição de silício na parede das células torna a planta mais resistente à ação de fungos e insetos e evita a perda excessiva de água, diminuindo a taxa de transpiração (Silva, 2007).

De modo geral, informações a respeito das contribuições acerca da estrutura foliar e crescimento das plantas podem contribuir para um melhor entendimento ou mesmo permitir a elucidação de lacunas relativas às diferenças nas taxas de crescimento de plantas (Schluter *et al.*, 2003). Adicionalmente, as alterações que ocorrem na estrutura interna das folhas constituem aspectos determinantes na capacidade de acli-

matização das espécies (Hanba *et al.*, 2002). Assim, a presença do silício no cultivo *in vitro* das espécies estudadas neste trabalho proporcionou benefícios estruturais que fizeram com que a planta mantivesse um correto desenvolvimento. Apesar do tempo de cultivo ter sido relativamente maior, quando comparado a outras espécies de orquídeas *in vitro* (Zhou, 1995), a presença desse elemento, conferiu às plantas maior resistência à perda de água quando comparado ao tratamento controle, proporcionando o correto arranjo das células da epiderme, sem que houvesse desidratação dos tecidos, que por sua vez prejudicaria o processo de aclimatização.

O híbrido [(*Laelia cattleya* Culmiant “Tuilerie” x *Laelia cattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaelia cattleya* Startifire Moon Beach], teve seu maior crescimento sob a utilização de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de silicato de cálcio enquanto a espécie nativa *Brassavola perrine* apresentou maior crescimento de plântulas com a utilização de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de silicato de cálcio. Tanto o híbrido quanto a espécie nativa são anfiestomáticas, com estômatos do tipo tetracítico e anomocítico, respectivamente. A presença do silício na estrutura foliar das espécies estudadas proporcionou o adequado desenvolvimento de tecidos de plântulas de orquídeas.

## REFERÊNCIAS

- ALVES E. 2004. *Introdução à microscopia eletrônica*. Lavras: UFLA/FAEPE. 88 p.
- BARROS LU; CUNHA CF; MIGUENS FC. 2002. Structure, morphology, and composition of silicon biocomposites in the palm tree *Syagrus coronata* (Mart.). *Becc Protoplasma* 220: 89-96. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/5u5cw1eectg5hh3w/>.
- BRAGA FT; NUNES CF; FAVERO AC; PASQUAL P; CARVALHO JG; CASTRO EM. 2009. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44: 128-132. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pab/v44n2/v44n02a03.pdf>.
- CAMARGO MS; KORNDÖRFER GH; PEREIRA HS. 2007. Solubilidade do silício em solos: influência do calcário e ácido silícico aplicados. *Bragantia* 66: 637-647. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/brag/v66n4/14.pdf>.
- CARVALHO MAF; PASQUAL M; SANTOS FC; RODRIGUES VA; REZENDE JC;

- CARVALHO JG. 2009. Efeito do boro (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) e manganês (MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O) na micropropagação de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). Revista Ceres, 56: 322-325.
- DUNLAPP JM; STETTLER RF. 2001. Variation in leaf epidermal and stomatal traits of *Populus trichocarpa* from two transects across the Washington Cascades. *Canadian Journal of Botany* 79: 528-536.
- FERREIRA DF. 2000. *Sisvar 4.3*: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, Software.
- HANBA YT; KOGAMI H; TERASHIMA L. 2002. The effects of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. *Plant Cell and Environment* 25: 1021-1030.
- KARNOVSKY MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137-138.
- KNUDSON L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 14: 214-217.
- MALAVOLTA E. 2006. *Manual de nutrição mineral de plantas*. Piracicaba: POTAFOS, 638p.
- MURASHIGE T; SKOOG FA. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497. Disponível em: [http://www.garfield.library.upenn.edu/classics1978/A1978FR51\\_700002.pdf](http://www.garfield.library.upenn.edu/classics1978/A1978FR51_700002.pdf).
- PASQUAL M. 2001. *Curso de especialização à distância cultura de tecidos vegetais (CTV)*. Lavras: UFLA/FAEPE, 97p.
- PIWPUAN N; THAMMATHAWORN A. 2008. Leaf and root anatomy of *acriopsis reinw. ex blume* (Orchidaceae) in Thailand. *KKU Science Journal* 36: 58-63.
- ROBARDS AW. 1978. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: HALL JL. (ed). *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. 1: 343-444.
- ROCHA HS; SILVA CRR; ARAUJO AG; SILVA AB. 2007. Propagação *in vitro* de bananeira Prata Anã (AAB): intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 3: 10-16.
- ROMERO-ARANDA M; JURADO O; CUARTETO J. 2006. Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status. *Journal of Plant Physiology* 163: 847-855.
- SCHLUTER U; MUSHAK M; BERGER D; ALTMANN T. 2003. Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. *Journal of Experimental Botany*, 54:867-874.
- SILVA DP. 2007. *Meios de cultura e fontes de silício no desenvolvimento in vitro de gérbera*. Lavras:UFLA. 84p (Tese mestrado).
- SILVA LP; SILVA LS; BOHNEN H. 2005. Componentes da parede celular e digestibilidade *in vitro* de palha de arroz (*Oryza sativa*) com diferentes teores de silício. *Ciência Rural* 35: 1205-1208.
- STANDAERT-DE-METSANAERE REA. 1991. Economic considerations. In: DEBERGH PC; ZIMMERMAN RH. *Micropropagation technology and application 1*: 131-140.
- STERN WL; CARLSWARD BS. 2008. Vegetative anatomy of Calypsoeae (Orchidaceae). *Lankesteriana* 8: 105-112.
- TALAVERA C; CONTRERAS F; ESPADAS F; FUENTES G; SANTAMARÍA JM. 2005. Cultivating *in vitro* coconut palms (*Cocos nucifera*) under glasshouse conditions with natural light, improves *in vitro* photosynthesis nursery survival and growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83: 287-292. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/1861454879q5gv72/>.
- TOMBOLATO AFC; COSTA AMM. 1998. *Micropropagação de plantas ornamentais*. Campinas: Instituto Agrônômico (Boletim técnico, 174), 72 p.
- TRENHOLM LE; DATNOFF LE; NAGARA RT. 2004. Influence of silicon on drought and shade tolerance of St. Augustinegrass. *HortTechnology*, 90:14-48.
- VACIN EF; WENT FW. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette* 110: 605-613. Disponível em: <http://www.jstor.org/pss/2472666>.
- ZANEGA-GODOY R; COSTA CG. 2003. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lind. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. *Acta Botanica Brasiliense* 17: 101-119. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abb/v17n1/a08v17n1.pdf>.
- ZHOU TS. 1995. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 75:605-607.