

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO EXÓGENO E FONTES
E DOSES DE SILÍCIO NO CULTIVO *in vitro* E NA
ACLIAMATIZAÇÃO DE ORQUÍDEAS EPÍFITAS**

Cibele Mantovani
Engenheira Agrônoma

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO EXÓGENO E FONTES
E DOSES DE SILÍCIO NO CULTIVO *in vitro* E NA
ACLIAMATIZAÇÃO DE ORQUÍDEAS EPÍFITAS**

Discente: Cibele Mantovani

**Orientadora: Profa. Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta
Coorientador: Prof. Dr. Renato de Mello Prado**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal)

2020

M293a Mantovani, Cibele
Avaliação do ácido salicílico exógeno e fontes e doses de silício no cultivo
in vitro e na aclimatização de orquídeas epífitas / Cibele Mantovani. --
Jaboticabal, 2020
40 p. : fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Kathia Fernandes Lopes Pivetta
Coorientadora: Renato de Mello Prado

1. Orchidaceae. 2. Silício. 3. Plantas Nutrição. 4. Propagação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

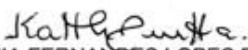
TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO EXÓGENO E FONTES E DOSES DE SILÍCIO NO CULTIVO *in vitro* E NA ACLIMATIZAÇÃO DE ORQUÍDEAS EPÍFITAS


AUTORA: CIBELE MANTOVANI

ORIENTADORA: KATHIA FERNANDES LOPES PIVETTA

COORIENTADOR: RENATO DE MELLO PRADO


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dra. KATHIA FERNANDES LOPES PIVETTA
Departamento de Produção Vegetal (Horticultura) / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. RICARDO TADEU DE FARIA
Departamento de Agronomia da UEL / Londrina/PR


Prof. Dr. PAULO HERCÍLIO VIEGAS RODRIGUES
Departamento de Produção Vegetal-ESALQ/USP / Piracicaba/SP


Prof. Dra. RENATA APARECIDA DE ANDRADE
Departamento de Produção Vegetal (Horticultura) / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisador Dr. GILBERTO ROSTIROLLA BATISTA DE SOUZA
Ginegar Polysack Brasil / São Carlos/SP

Jaboticabal, 06 de março de 2020

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Cibele Mantovani – nascida em 23 de novembro de 1991, em Itápolis – SP. Mestrado na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP/FCAV – Jaboticabal – SP (2017). Possui graduação em Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP/FCAV – Jaboticabal – SP (2014), trabalhou em projeto de extensão com hortaliças, tem experiência em pesquisa a campo e em laboratório com plantas ornamentais, em especial com orquídeas. Fez parte dos grupos de pesquisa Oficina da Paisagem e GENPLANT. Ministrou vários cursos e palestras sobre o cultivo básico de orquídeas. Desenvolveu a partir de cruzamento artificial híbridos inéditos de orquídeas e registrou na Royal Horticultural Society, RHS, Inglaterra.

Epígrafe

``A natureza com seus caprichos e mistérios,
condensa em pequenas coisas o poder de dirigir as grandes,
nas sutis a potência de dominar as mais grosseiras,
nas coisas simples a capacidade de reger as complexas``

Ana Maria Primavesi

Dedicatória

Aos meus pais, Clóvis e Roseli, que são meus amores eternos
A todos os professores da FCAV, que tive a honra de conhecer e que fizeram parte
do meu ensino.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos divinas que tenho recebido em minha vida, e por ter tornado possível esta grande conquista.

Aos meus pais Clóvis Mantovani e Roseli Aparecida Poloto Mantovani pela minha formação pessoal, e pelo amor e carinho oferecidos durante a minha vida toda.

Aos meus avós por toda herança agrônômica e experiências de vida que possibilitaram o delineamento da minha vida profissional.

À professora Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta, pela orientação, pela confiança, pela oportunidade de ser sua aluna e por tudo que fez de bem para a minha evolução acadêmica e espiritual.

Ao professor Dr. Renato de Mello Prado, por ter sido mais que coorientador, um grande amigo, ter me recebido cordialmente e ter ajudado em todos os momentos difíceis que precisei.

Aos professores do Departamento de Tecnologia da FCAV, em especial o Dr. Renato Fernandes Galdiano Júnior e a Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, por todas as oportunidades oferecidas em todo meu curso de graduação e pela eterna amizade e confiança.

À professora Dra. Priscila Lupino Gratão, e aos alunos Ricardo Roberto Borjas Ventura, Carolina Seno Nascimento e Camila Seno Nascimento pela contribuição nas análises referentes ao estresse.

Ao professor Dr. Arthur Bernardes Cecílio Filho e ao Dr. Rafael Ferreira Barreto pelas contribuições na banca do Exame Geral de Qualificação.

À Universidade Estadual de São Paulo – “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - SP e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal pela oportunidade de realização do doutorado, em especial ao Prof. Dr. Rouverson Pereira da Silva.

Ao Cnpq pela concessão da bolsa de estudos (Nº do processo: 141292/2017-2).

A todos os componentes do Gepflor, pela convivência, por compartilhar bons momentos e pelas valiosas contribuições concedidas ao longo da realização deste trabalho.

À grande amiga Edilaine Istéfani Franklin Traspadini e ao amigo Jonas Pereira de Souza Júnior pelos constantes auxílios, paciência e amizade.

À professora Cidinha pelo incentivo e amizade.

Às técnicas de laboratório, Cláudia Dela Marta e Sonia Carregari, pela indispensável ajuda nas avaliações dos experimentos e pela amizade.

Aos estagiários da graduação, Eduardo, João, Pedro, Lorena, Taís e Milena, por toda presteza e companheirismo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Cultivo in vitro de orquídeas.....	2
2.2 Ácido salicílico.....	3
2.3 Silício.....	4
3 REFERÊNCIAS.....	5
CAPÍTULO 2 - Toxicidade de ácido salicílico no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Cymbidium atropurpureo</i> e <i>Phalaenopsis</i> ‘Golden Peoker’.....	9
Resumo.....	9
1 Introdução.....	10
2 Material e Métodos.....	10
3 Resultados.....	12
3.1 Efeito do ácido salicílico no vazamento de eletrólitos.....	12
3.2 Efeito do ácido salicílico no crescimento e desenvolvimento.....	13
4 Discussão.....	16
4.1 Vazamento de eletrólitos.....	16
4.2 Crescimento e desenvolvimento.....	17
5 Conclusões.....	17
6 Referências.....	17

CAPÍTULO 3 - Silício pode induzir toxicidade dependendo da fonte e concentração adicionada no cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas epífitas	19
Resumo	19
1 Introdução.....	20
2 Material e Métodos.....	21
2.1 Material vegetal e condições de crescimento	21
2.2 Tratamentos e delineamento experimental	22
2.3 Avaliações biométricas	22
2.4 Teor de clorofila e carotenoides.....	23
2.5 Teor de Si	23
2.6 Avaliações do estresse oxidativo.....	23
2.7 Aclimatização.....	24
2.8 Análises estatísticas.....	24
3 Resultados.....	25
3.1 Acúmulo de silício	25
3.2 Clorofila e carotenoides	28
3.3 Estresse oxidativo	29
3.4 Crescimento e desenvolvimento das plântulas	30
3.5 Sobrevivência de plântulas na aclimatização	33
4 Discussão	34
5 Conclusões.....	37
6 Referências.....	38

AVALIAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO EXÓGENO E FONTES E DOSES DE SILÍCIO NO CULTIVO *IN VITRO* E NA ACLIMATIZAÇÃO DE ORQUÍDEAS EPÍFITAS

RESUMO - A produção comercial de orquídeas é uma atividade de destaque na floricultura mundial e a cultura de tecidos tem sido a técnica mais utilizada para obtenção de grande quantidade de mudas em curto espaço de tempo. Fontes de silício e o ácido salicílico dependendo da concentração e da espécie cultivada podem induzir a toxicidade, mas não há informações para orquídeas sob cultivo *in vitro*. Como os efeitos da adição de ácido salicílico e fontes de silício na composição do meio de cultivo *in vitro* ainda não são totalmente conhecidos estudou-se, separadamente neste trabalho, o efeito do ácido salicílico exógeno e a adição de silício (Si) *in vitro* e o efeito residual do Si durante a aclimatização. Para isso foram realizados dois experimentos. O experimento 1 consistiu no cultivo *in vitro* das orquídeas *Cymbidium atropurpureo* e *Phalaenopsis* Golden Peoker em meio MS acrescido dos tratamentos com ácido salicílico: 0; 50; 100; 200; 300; 400; 500 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AS durante 210 dias. Já o experimento 2 consistiu no cultivo *in vitro* das orquídeas *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum*, o meio MS utilizado para propagação das plântulas foi acrescido dos tratamentos constituídos por seis concentrações (0,00; 14,15; 28,30; 42,45 e 56,6 mmol de Si por L) de cada fonte de Si (nanossílica, silicato de potássio com silicato de sódio e ácido monossilícico) e ao término do cultivo *in vitro* as plântulas foram analisadas. Os resultados indicam que a adição de AS reduziu todas as variáveis de crescimento avaliadas e induziu toxicidade. A adição de silício na forma da mistura de silicato de potássio e silicato de sódio promoveu o máximo crescimento de *Dendrobium secundum*. A nanossílica foi a fonte mais promissora para o cultivo *in vitro* de *Cymbidium atropurpureo* e o ácido monossilícico foi a fonte mais tóxica.

Palavras – chave: Orchidaceae, silício, plantas nutrição, propagação

EVALUATION OF EXOGENOUS SALICYLIC ACID AND SILICON SOURCES AND DOSES IN IN VITRO CULTIVATION AND ACCLIMATIZATION OF EPIPHYTE ORCHIDS

ABSTRACT - The commercial production of orchids is a prominent activity in world floriculture, and the cultivation of plant tissues has been the most used technique for obtaining large quantities of seedlings in a short time. Sources of silicon and salicylic acid depending on the concentration and species grown can induce toxicity, but there is no information for orchids under *in vitro* cultivation. As the effects of the addition of salicylic acid and silicon sources on the composition of the *in vitro* culture medium are not yet fully understood, the effect of exogenous salicylic acid and the addition of silicon (Si) *in vitro* and the residual effect of Si during acclimatization were separately studied in this work. For this, two experiments were carried out. Experiment 1 consisted of *in vitro* cultivation of *Cymbidium atropurpureo* and *Phalaenopsis* Golden Pecker orchids in MS medium plus treatments with salicylic acid: 0; 50; 100; 200; 300; 400; 500 and 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AS for 210 days. In experiment 2 consisted of *in vitro* cultivation of *Cymbidium atropurpureo* and *Dendrobium secundum*, the MS medium used for seedling propagation was added with treatments consisting of six concentrations (0.00; 14.15; 28.30; 42.45 and 56.6 mmol of Si per L) from each source of Si (nanosilica, potassium silicate with sodium silicate and monosilicic acid) and at the end of cultivation the seedlings were analyzed. The results indicate that the addition of AS reduced all the growth variables evaluated and induced toxicity. The addition of silicon in the form of a mixture of potassium silicate and sodium silicate promoted the maximum growth of *Dendrobium secundum*. Nanosilica was the most promising source for the *in vitro* cultivation of *Cymbidium atropurpureo* and monosilicic acid was the most toxic source.

Keywords: Orchidaceae, silicon, plant nutrition, propagation

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1 INTRODUÇÃO

Em razão da elevada beleza e exuberância de suas flores, as orquídeas destacam-se como importante planta ornamental e medicinal, de grande interesse econômico, ecológico e botânico. Atualmente, seu cultivo é mais que um simples *hobby*, é um negócio internacional que representa cerca de 8% do mercado mundial de plantas ornamentais e tem o potencial de alterar a economia de um país (Chugh et al., 2009). Considerando o setor da floricultura, a orquidicultura evoluiu para uma atividade importante, pois representa uma das atividades mais economicamente significativas na indústria viveirista global (Silva, 2013).

O silício (Si) é considerado elemento benéfico com potencial de promover melhorias no crescimento e desenvolvimento de algumas culturas. Foi verificado que as orquídeas do gênero *Phalaenopsis* absorvem o silício *in vitro* (Zhou, 1995) e que este elemento influencia seu crescimento (Vendrame et al., 2010).

O Si tem função estrutural na parede celular que pode elevar os conteúdos de hemicelulose e lignina, aumentando a rigidez da célula. 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 (Camargo et al., 2007), entretanto não há informações sobre o efeito das fontes: nanossílica, silicato de potássio com silicato de sódio e ácido monossilícico; adicionadas ao meio de cultura na última fase de cultivo *in vitro*.

O cultivo *in vitro* de orquídeas é eficiente para a conservação e produção comercial de plântulas. No entanto, as plântulas micropropagadas geralmente precisam se adaptar para sobreviver a alterações severas na umidade, irradiância e meio de crescimento que acompanham a transferência para condições *ex vitro* (Lando et al. 2016).

A produção de mudas incluindo as orquídeas é altamente dependente da sobrevivência das plântulas na fase de aclimatização; que pode ser considerada a etapa mais crítica da produção de mudas micropropagadas, pois ocorrem os maiores percentuais de perdas (Chandra et al., 2010; Van Huylendroeck et al., 1998) não só

em função do estresse hídrico, fotossíntese e absorção de nutrientes pela plântula, mas também pelo perigo de infecções por fungos e bactérias, que podem se desenvolver neste estágio (Tombolato e Costa, 1998).

O ácido salicílico (AS) participa da sinalização de estresses e a aplicação exógena pode proporcionar proteção contra estresses bióticos ou abióticos. O efeito da aplicação do AS depende de numerosos fatores tais como a espécie vegetal e seu estágio de desenvolvimento, o modo e a concentração de aplicação, bem como seu nível endógeno na planta (Horváth et al., 2007). Os estudos com AS em plantas ornamentais estão restritos a algumas espécies, mas com fornecimento exclusivamente via pulverização foliar à exemplo da *Stevia rebaudiana* (El-Housini et al., 2014) e violetas (Martin-Mex et al., 2005).

Na literatura, não existem estudos sobre a absorção de silício por *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum* e nem sobre o ácido salicílico no cultivo *in vitro* de *Cymbidium atropurpureo* e *Phalaenopsis* Golden Peoker. Frente ao exposto, objetivou-se com este trabalho determinar os efeitos do ácido salicílico e do silício.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultivo *in vitro* de orquídeas

As orquidáceas representam aproximadamente 10% das Angiospermas, sendo a segunda maior família de plantas com cerca de 736 gêneros e 27.801 espécies (Govaerts, 2020). Além do valor ornamental, é considerada a família de plantas com maior valor comercial (Roberts e Dixon, 2008). Embora ocorra grande diversidade de orquídeas na natureza, apenas poucos gêneros são propagados em grande quantidade para comercialização.

A propagação *in vitro* consiste no trabalho em condições artificiais de cultivo e ambiente asséptico, onde se produzem mudas em meios de cultura; mesmo sendo uma técnica dispendiosa em termos de mão de obra, de laboratório e de equipamentos, oferece uma melhor relação custo-benefício, pois permite produzir, em escala comercial, material uniforme e selecionado (Cid e Teixeira, 2010).

O cultivo *in vitro* de orquídeas permite elevar a taxa de multiplicação vegetativa de plantas com crescimento lento, eliminação de patógenos e obtenção de plantas com características valorizadas

Entretanto, as plantas cultivadas *in vitro* são expostas a condições especiais de crescimento, como troca de gás diminuída, alta umidade do ar, baixa irradiância e uso de açúcar como fonte de energia, podendo causar inibição da fotossíntese, estrutura estomática anormal, podendo proporcionar a mortalidade de plântulas durante a aclimatização. Portanto, a aclimatização a novas condições ambientais, como aumento da irradiação e baixa umidade do ar, exige que as plantas sofram mudanças físicas e anatômicas, necessitando, por sua vez, do desenvolvimento de estratégias para controlar a transpiração, diminuir a perda celular de água e aumentar a fotossíntese (Hazarika, 2006).

2.2 Ácido salicílico

O principal papel fisiológico atribuído ao ácido salicílico (AS) na planta é o de funcionar como uma molécula sinalizadora, induzindo-a a expressar resistência contra o ataque de predadores. Esta função foi sugerida em decorrência do AS se acumular em plantas submetidas a condições adversas, quer seja por ataque patogênico, quer pelo tratamento da planta com elicitores químicos, e por sua propriedade de induzir a expressão de genes ligados a várias proteínas (Martinez et al., 2000).

Estudos recentes indicam que o AS também participa da sinalização de estresses abióticos. A aplicação exógena pode proporcionar proteção contra diversos tipos de estresses, tais como: temperatura elevada ou baixa, metais pesados, e assim por diante. Embora o AS também possa causar o estresse oxidativo para plantas, o tratamento preliminar de plantas com baixas concentrações pode conferir tolerância para a maioria dos tipos de estresses abióticos devido principalmente ao aumento da capacidade antioxidante. Em *Stevia rebaudiana* submetida à estresse salino foi observado que a pulverização foliar com 100 mg L⁻¹ de AS aumentou as variáveis de crescimento das plantas (El-Housini et al., 2014).

O cultivo *in vitro* de orquídeas tem se expandido e a inclusão do AS no meio de cultivo poderia potencializar seu crescimento, entretanto, tem-se o risco de induzir

toxicidade dependendo da espécie, mas inexistem estudos para as orquídeas, apenas a avaliação dos efeitos do AS na produção de polissacarídeos em *Dendrobium officinale* (Yuan et al., 2014) cultivado *in vitro* onde a aplicação exógena de AS favoreceu as características estudadas.

A toxicidade de AS pode ocorrer devido produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) que induz oxidação de lipídeos das membranas celulares tendo exclusão do citosol para espaço livre aparente das células (Horváth et al., 2007), induzindo prejuízos no metabolismo podendo refletir nas variáveis de crescimento de forma distinta.

2.3 Silício

O silício (Si) é absorvido pelas raízes das plantas na forma neutra, como ácido monossilícico (H_4SiO_4) por processo passivo ou ativo, através de transportadores de membrana específicos para este fim e é transportado via xilema podendo ser regulado pela transpiração ou por processo passivo (Datnoff et al., 2001). Assim, o ácido monossilícico, depois de ser absorvido pelas plantas, é depositado principalmente nas paredes das células da epiderme contribuindo substancialmente para fortalecer a estrutura da planta em aumentar a resistência ao estresse abiótico (Wiese et al., 2007) ao ataque de pragas (Reynolds et al., 2009) e doenças (Resende et al., 2009), além de diminuir a transpiração (Korndorfer et al., 2004), aumentar a taxa fotossintética (Ali et al., 2013; Shi et al., 2013) formação de maior área foliar (Jiao-Ging et al., 2009) e favorecer a absorção de nutrientes (Mateos-Naranjo et al., 2013).

O Si quando absorvido, 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 micropropagadas. 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).

A deposição de cera epicuticular foi visualizada por Pasqual et al. (2011) nas duas epidermes das folhas das orquídeas (*Brassavola perrine*) e de um híbrido [(*Laelia cattleya* Culminant "Tuilerie" x *Laelia cattleya* Sons Atout Rotunda) x

Brassolaeliacattleya Startifire Moon Beach] submetidas a tratamento com diferentes concentrações de Si *in vitro*, em relação ao tratamento controle (ausência de CaSiO_3). Com isso, evita-se a perda de água pelas células da epiderme e aumenta-se a capacidade de aclimatização das plântulas.

A aplicação de Si tem sido reportada por aumentar o crescimento e o desenvolvimento de várias plantas, portanto é recomendada a inclusão de Si como elemento benéfico no meio de cultura de tecidos para resolver vários problemas na micropropagação e para aumentar o sucesso da cultura de tecidos (Sivanesan e Park, 2014). Zhou (1995) observou aumento no comprimento das folhas de *Phalaenopsis* híbrida cultivadas em meio Vacin e Went suplementado com CaSiO_3 . Soares et al. (2011) relataram que a adição de $5,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}_2\text{SiO}_3$ e $20,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SiO}_3$ ao meio Knudson C modificado aumentou o número de raízes e comprimento da parte aérea e da raiz em mudas de *C. loddigesii*. A concentração ótima de Si varia dentro das mesmas espécies de plantas e ou genótipo.

As fontes solúveis de Si mais utilizadas em solução nutritiva é o silicato de potássio (K_2SiO_3) e o silicato de sódio (Na_2SiO_3) que em dissolução e hidrólise em água forma H_4SiO_4 . No entanto, é importante estudar novas formulações com adição de estabilizantes nestas fontes para diminuir risco de polimerização. Uma nova fonte de Si que surgiu foi a nanossílica, que está na forma de SiO_2 em uma dispersão coloidal (Ruffini e Cremonini, 2009), por isso diminui os riscos de toxicidade. E a outra fonte inovadora de Si é o ácido monossilícico (H_4SiO_4) estabilizado estando na forma prontamente absorvida pelas plantas. No entanto, essa última fonte não é estável no estado livre tendo risco da polimerização que depende do valor pH e da concentração de Si na solução nutritiva (Annenkov et al., 2017). As fontes de Si apresentam suas particularidades que podem beneficiar o seu crescimento mas ainda não estão claros os riscos da sua toxicidade que pode induzir prejuízos na fisiologia de plantas de orquídea.

3 REFERÊNCIAS

Ali S, Farooq M A, Yasmeen T, Hussain S, Arif MS, Abbas F, Bharwana SA, Zhang G (2013) The influence of silicon on barley growth, photosynthesis and ultra-structure under chromium stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 89:66–72.

Annenkov VV, Danilovtseva EN, Pal'shin VA, Ol'ga NV, Zelinskiy SN, Krishnan UM (2017) Silicic acid condensation under the influence of water-soluble polymers: from biology to new materials. **RSC Advances** 7:20995-21027.

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.

Camargo MS, Korndörfer GH, Pereira HS (2007) Solubilidade do silício em solos: influência do calcário e ácido silícico aplicados. **Bragantia** 66:637-647.

Chandra S, Bandopadhyay R, Kumar V, Chandra R (2010) Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters** 32:1199-1205.

Chugh S, Guha S, Rao U (2009) Micropropagation of orchid: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulture** 122:507-520.

Cid LPB, Teixeira J (2010) **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília: Embrapa informação tecnológica. 325p.

Datnoff LE, Snyder GH, Korndörfer GH (2001) **Silicon in agriculture. Studies in plant science**. Amsterdam: Elsevier, 403 p.

El-Housini EA, Ahmed MA, Hassanein MS, Tawfik MM (2014) Effect of salicylic acid on growth and quality of stevia (*Stevia rebaudiana* bert.) under salt stress. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.** 14:275-281.

Govaerts RHA. **The Plant List**. Disponível em: [http:// www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org). Acesso em: 02 jan. 2020.

Hazarika BN (2006) Morphophysiological disorders *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae** 108:105-120.

Horváth E, Szalai G, Janda, T (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. **Journal Plant Growth Regulation** 26:290-300.

Jiao-Jing L, Shao-Hang L, Pei-Lei X, Xiu-Juan W, Ji-Gang B (2009) Effects of Exogenous silicon on the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in chilling-stressed cucumber leaves. **Agricultural Sciences in China** 8:1075-1086.

Korndorfer GH, Pereira HS, Camargo MS (2004) **Silicato de cálcio e magnésio na agricultura**. Uberlândia: UFU, 23 p. (Boletim técnico 1).

Lando AP, Wolfart MR, Fermino Jr PCP, Santos M (2016) Structural effects on *Cattleya xanthina* leaves cultivated *in vitro* and acclimatized *ex vitro*. **Biologia Plantarum** 60:219-225.

- Martinez C, Baccou JC, Bresson E, Baissac Y, Daniel JF, Jalloul A, Montillet JL, Geiger JP, Assigbetsé K, Nicole M (2000) Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. **Plant Physiology** 122:757-766.
- Martín-Mex R, Villanueva-Couoh E, Herrera-Campos T, Larqué-Saavedra A (2005) Positive effect of salicylates on the flowering of African violet. **Scientia Horticulturae** 103:499-502.
- Mateos-Naranjo E, Andrades-Moreno L, Davy AJ (2013) Silicon alleviates deleterious effects of high salinity on the halophytic grass *Spartina densiflora*. **Plant Physiology and Biochemistry** 63:115-121.
- Pasqual M, Soares JDR, Rodrigues FA, Araujo AG, Santos RR (2011) Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira** 29:324-329.
- Resende RS, Rodrigues FA, Soares JM, Casela CR (2009) The influence of silicon on components of resistance of anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines. **European Journal of Plant Pathology** 124:533-541.
- Reynolds OL, Keeping MG, Meyer JH (2009) Silicon-augmented resistance of plants to herbivorous insects: a review. **Annals of Applied Biology** 155:171-186.
- Roberts DL, Dixon K W (2008) Orchids. **Current Biology** 18:325-329.
- Ruffini CM, Cremonini R (2009) Nanoparticles and higher plants. **Caryologia** 62:161-165.
- Sivanesan I, Park S (2014) The Role of Silicon in Plant Tissue Culture. **Frontiers Plant Science** 5:571.
- Shi Y, Wang Y, Flowersb TJ, Gong H (2013) Silicon decreases chloride transport in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions. **Journal of Plant Physiology** 170:847-853.
- Silva, JT (2013) Orchids: advances in tissue culture, genetics, phytochemistry and transgenic biotechnology. **Floriculture Ornamental Biotechnology** 7:1-52.
- Tombolato AFC, Costa AMM (1998) **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 72 p. (Boletim técnico, 174).
- Van Huylenbroeck J, Piqueras A, Debergh P (1998) Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. **Plant Science** 134:21-30.
- Vendrame WA, Palmateer AJ, Pinares A, Moore KA, Datnoff LE (2010) Silicon fertilization affects growth of hybrid *Phalaenopsis* orchid liners. **HortTechnology** 20:603-607.

Wiese H, Nikolic M, Romheld V (2007) Silicon in plant nutrition - effects on zinc, manganese and boron leaf concentrations and compartmentation. In: Sattelmacher B, Horst WJ (Ed.) **The apoplasto of higher plants**: compartment of storage, transport and reactions. London: Springer, p. 33-37.

Zhou T (1995) The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annual Botany** 75:605–607.

Yuan Z, Cong G, Zhang J (2014) Effects of exogenous salicylic acid on polysaccharides production of *Dendrobium officinale*. **South African Journal of Botany** 95: 78-84.

CAPÍTULO 2 - Toxicidade de ácido salicílico no cultivo *in vitro* de *Cymbidium atropurpureo* e *Phalaenopsis* 'Golden Peoker'¹

Resumo

O ácido salicílico (AS) dependendo da concentração e da espécie cultivada pode induzir toxicidade, mas não há informações para orquídeas sob cultivo *in vitro*. Objetivou-se avaliar concentrações de ácido salicílico no cultivo *in vitro* de *Cymbidium atropurpureo* e *Phalaenopsis* Golden Peoker para verificar os prejuízos biológicos da sua toxicidade. Por isso, foi realizado experimento com as orquídeas *Cymbidium atropurpureo* e *Phalaenopsis* Golden Peoker que foram semeadas *in vitro* em meio MS e aos 90 dias após a semeadura foram transferidas para o meio MS acrescido dos tratamentos com ácido salicílico: 0; 50; 100; 200; 300; 400; 500 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AS durante 210 dias. Aos 300 dias após a semeadura foram avaliadas as variáveis biométricas das plântulas e o extravasamento de eletrólitos. Os resultados indicam que a adição de AS influenciou de forma negativa o crescimento e desenvolvimento *in vitro* das plântulas de *Cymbidium atropurpureo* e *Phalaenopsis* Golden Peoker pois reduziu todas as variáveis de crescimento avaliadas e aumentou o extravasamento de eletrólitos, conseqüentemente induziu toxicidade.

Palavras - chave: nutrição de orquídeas, Orchidaceae, cultura de tecidos, regulador de crescimento

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico publicado na revista HortScience 54: 344 – 347, 2019.

1 Introdução

O ácido salicílico (AS) participa da sinalização de estresses e a aplicação exógena pode proporcionar proteção contra estresses bióticos ou abióticos. O efeito da aplicação do AS depende de numerosos fatores, tais como a espécie vegetal e seu estágio de desenvolvimento, o modo e a concentração de aplicação, bem como seu nível endógeno na planta (Horváth et al., 2007). Os estudos com AS em plantas ornamentais estão restritos a algumas espécies, mas com fornecimento exclusivamente via pulverização foliar, à exemplo da *Stevia rebaudiana* (El-Housini et al., 2014) e violetas (Martin-Mex et al., 2005).

O cultivo *in vitro* de orquídeas tem se expandido e a inclusão do AS no meio de cultivo poderia potencializar seu crescimento, entretanto, tem-se o risco de induzir toxicidade dependendo da espécie, mas inexistem estudos para as orquídeas, apenas a avaliação dos efeitos do AS na produção de polissacarídeos em *Dendrobium officinale* (Yuan et al., 2014) cultivado *in vitro* onde a aplicação exógena de AS favoreceu as características estudadas.

A toxicidade de AS pode ocorrer devido a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), que induz oxidação de lipídeos das membranas celulares tendo exclusão do citosol para espaço livre aparente das células (Horváth et al., 2007), induzindo prejuízos no metabolismo, podendo refletir nas variáveis de crescimento de forma distinta.

Diante disso, assumindo a hipótese que as orquídeas sob cultivo *in vitro* são sensíveis a toxicidade de AS e o fornecimento de AS no meio de cultivo induz a toxicidade nas orquídeas dependendo da espécie dado ao aumento do extravasamento de eletrólitos celular refletindo nas variáveis biológicas das plantas.

Por isso, este experimento teve como objetivo avaliar concentrações de ácido salicílico no cultivo *in vitro* de *Cymbidium atropurpureo* e *Phalaenopsis* Golden Peoker para verificar os prejuízos biológicos da sua toxicidade.

2 Material e Métodos

Cápsulas fechadas com sementes maduras das orquídeas *Cymbidium atropurpureo* e *Phalaenopsis* Golden Peoker foram superficialmente desinfestadas em etanol 70% por cinco minutos, seguido de hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo durante 30 minutos e enxaguadas três vezes com água destilada e autoclavada, sendo posteriormente abertas no interior de câmara de fluxo. As sementes foram inoculadas em frascos de vidro transparentes, com 250 mL de capacidade e contendo 40 mL de meio nutritivo MS reduzido e autoclavados à 121 °C e 1,1 atm durante 15 min (Caldas et al., 1998).

O meio MS reduzido apresenta a formulação proposta por Murashige e Skoog (1962), com metade da concentração de sais macronutrientes e concentração total de micronutrientes, suplementado com vitaminas, inositol e glicina (Costa et al., 2009), 2% de sacarose, pH ajustado para 5,7 e geleificado com 0,7% de ágar. A germinação e crescimento ocorreram em sala de incubação com temperatura de 25 ± 2 °C, iluminação de aproximadamente $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h luz.

Decorridos 90 dias, plântulas de *Cymbidium atropurpureo* e de *Phalaenopsis* Golden Peoker foram subcultivadas em meio MS, contendo 2% de sacarose, 0,7% de ágar; acrescido dos tratamentos com ácido salicílico: 0; 50; 100; 200; 300; 400; 500 e $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AS (Dinâmica P.A., peso molecular: $138,12 \text{g mol}^{-1}$) dissolvido em etanol 70%, sendo ajustado o valor pH para 5,7.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Para cada tratamento utilizou-se quatro repetições contendo 12 plântulas, totalizando 768 plântulas.

Após 210 dias de crescimento das plântulas inoculadas nos tratamentos (300 dias após a semeadura) foram realizadas as seguintes avaliações para as orquídeas estudadas: número de folhas, por meio de contagem de cada primórdio foliar totalmente desenvolvido; altura da parte aérea, obtida a 2 cm da base do caule por meio de leituras com paquímetro digital (Starrett®727-2001); número de raízes (contagem das raízes maiores do que 2 mm); comprimento da maior raiz por meio de leituras com paquímetro digital (Starrett®727-2001); área foliar (cm^2) obtida de todas as folhas das plantas utilizando medidor eletrônico (Li-Cor, modelo L1-3100®); massa seca (g) da parte aérea e das raízes (o material vegetal foi conduzido à estufa com circulação forçada de ar à temperatura de $65 \text{ °C} \pm 5$ durante 96 horas, e em seguida

foi feita a pesagem com o auxílio de uma balança analítica Chimadzu, precisão de 0,001 g) e vazamento de eletrólitos (Dionisio-Sese e Tobita, 1998).

Todos os dados avaliados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e quando significativos foram realizados também estudos de regressão polinomial, empregando o programa estatístico AgroEstat (Barbosa e Maldonado Jr, 2014).

3 Resultados

3.1 Efeito do ácido salicílico no vazamento de eletrólitos

O vazamento de eletrólitos foi influenciado pela presença de AS com comportamento quadrático negativo para as duas espécies de orquídeas sendo o ponto mínimo observado na concentração de 275 e 155 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AS, para *Cymbidium atropurpureo* e *Phalaenopsis Golden Peoker*, respectivamente (Figura 1A).

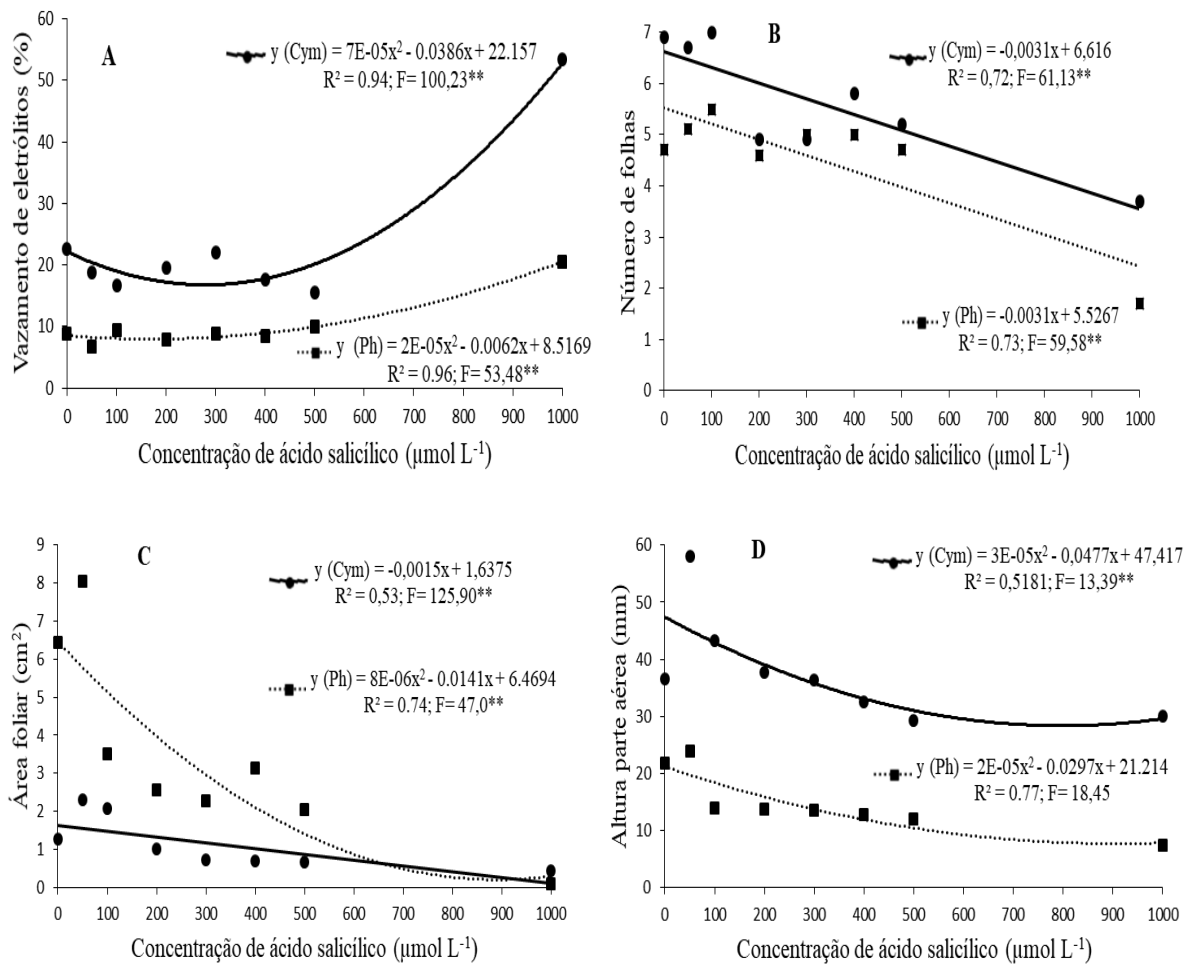


Figura 1. Vazamento de eletrólitos (A), número de folhas (B) área foliar (C) e altura da parte aérea (D) de *Cymbidium atropurpureo* (Cym) e *Phalaenopsis Golden Peoker* (Ph) com o aumento das concentrações exógenas de ácido salicílico após 300 dias de cultivo *in vitro*

3.2 Efeito do ácido salicílico no crescimento e desenvolvimento

A presença de AS no MS prejudicou o número de folhas com ajuste linear negativo para as duas espécies estudadas, sendo, na concentração de 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AS, diminuiu em 46% e 64% as folhas das plantas comparado ao tratamento controle, para *Cymbidium atropurpureo* e *Phalaenopsis Golden Peoker*, respectivamente (Figura 1B).

De forma análoga ao número de folhas, a área foliar também foi prejudicada pela presença de AS no meio MS, sendo observado ajuste linear negativo para a *Cymbidium atropurpureo* promovendo diminuição de 66% na área foliar, na maior concentração estudada ($1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AS) em comparação ao tratamento controle. A presença de AS no meio de cultivo das plantas de *Phalaenopsis* Golden Peoker diminuiu com ajuste quadrático negativo, com o ponto mínimo observado na concentração de $881 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AS (Figura 1C).

A altura das plantas também foi prejudicada pela presença de AS no meio MS com ajuste quadrático negativo, sendo os pontos mínimos observados nas concentrações de 795 e $742 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AS para *Cymbidium atropurpureo* e *Phalaenopsis* Golden Peoker, respectivamente (Figura 1D).

A presença de AS no meio de cultivo também afetou o desenvolvimento do sistema radicular com ajuste linear negativo, sendo que a concentração de $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AS, promoveu diminuição do número de raízes iguais a 74% e 88%, para *Cymbidium atropurpureo* e *Phalaenopsis* Golden Peoker, respectivamente, comparados ao tratamento controle (Figura 2A). De forma análoga ao número de raízes, o comprimento também foi prejudicado pela presença de AS, com ajuste linear negativo para a *Phalaenopsis* Golden Peoker com redução de 59% no comprimento das raízes, em comparação ao tratamento controle (Figura 2B). Na espécie *Cymbidium atropurpureo* foi observado ajuste quadrático do comprimento de raiz em função da concentração de AS, com ponto mínimo na concentração de $623 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AS (Figura 2B).

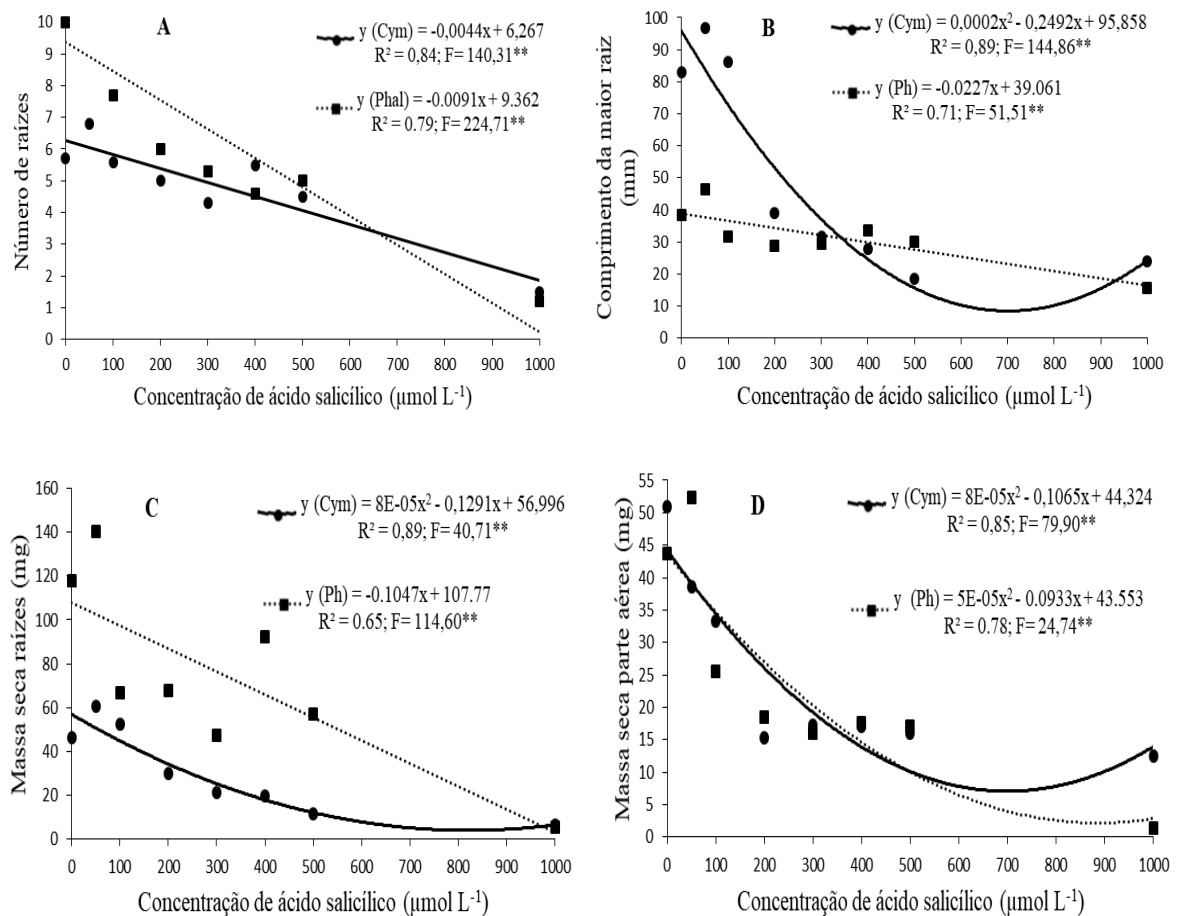


Figura 2. Número de raízes (A), comprimento da maior raiz (B), massa seca de raízes (C) e massa seca parte aérea (D) de *Cymbidium atropurpureo* (Cym) e *Phalaenopsis Golden Peoker* (Ph) com o aumento das concentrações exógenas de ácido salicílico

A massa seca da raiz decresceu com ajuste linear para a *Phalaenopsis Golden Peoker*, sendo observado redução de 95% na concentração de 1000 µmol L⁻¹ de AS em comparação ao tratamento controle. *Cymbidium atropurpureo* apresentou ajuste quadrático para a produção de massa seca em função da concentração de AS, com ponto mínimo observado na concentração de 806 µmol L⁻¹ de AS (Figura 2C).

Por fim, a massa seca da parte aérea também foi afetada de forma negativa pela presença de AS nas duas espécies de orquídeas, sendo observado ajuste quadrático com pontos mínimos nas concentrações de 665 e 933 µmol L⁻¹ de AS para

Cymbidium atropurpureo e *Phalaenopsis* Golden Peoker, respectivamente (Figura 2D).

A orquídea *Phalaenopsis* Golden Peoker foi mais prejudicada com o aumento das concentrações de AS do que a *Cymbidium atropurpureo* (Figura 3).

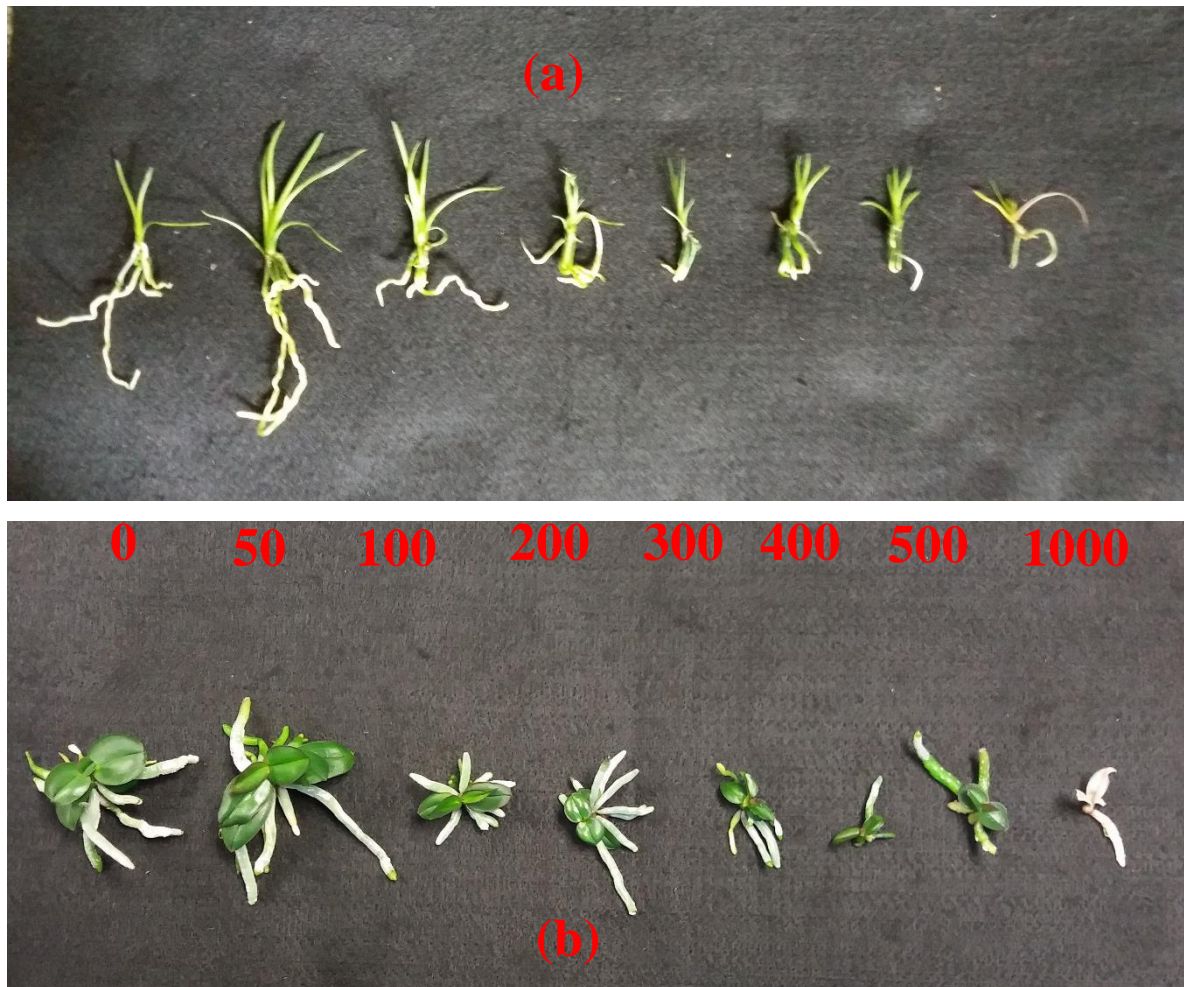


Figura 3. Plântulas de *Cymbidium atropurpureo* (a) e *Phalaenopsis* Golden Peoker (b) com o aumento das concentrações exógenas de ácido salicílico (0; 50; 100; 200; 300; 400; 500 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AS) após 300 dias de cultivo *in vitro*.

4 Discussão

4.1 Vazamento de eletrólitos

O aumento no vazamento de eletrólitos em *Cymbidium atropurpureo* e *Phalaenopsis* Golden Peoker ocorreu devido ao excesso de ácido salicílico, que pode ter causado alterações de várias reações metabólicas. O excesso de AS provavelmente causou estresse oxidativo nas orquídeas, parcialmente através do acúmulo de peróxido de hidrogênio (Horváth et al., 2007).

4.2 Crescimento e desenvolvimento

Concentrações elevadas de ácido salicílico *in vitro* diminuíram o crescimento e desenvolvimento de *Cymbidium atropurpureo* e *Phalaenopsis* Golden Peoker pois causaram níveis de estresse oxidativo que as mudas de orquídeas podem ser incapazes de superar, assim como mostrado por Chen et al. (1993), ao verificar que o ácido salicílico inibiu a atividade da enzima catalase e induziu aumento nas concentrações de peróxido de hidrogênio.

Em plantas de *Arabidopsis thaliana*, Rao et al. (1997), também verificaram que o tratamento com AS causou peroxidação lipídica, dano oxidativo às proteínas e formação de isômeros de clorofila e caroteno. Estas alterações devem-se em parte à inativação da catalase e do ascorbato, enzimas de peroxidase, resultando em menor crescimento das orquídeas como sintomas fitotóxicos do AS.

5 Conclusões

A adição de AS no meio de cultivo MS a partir da concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ induz vazamento de eletrólitos celular e diminui o crescimento *in vitro* das mudas de *Cymbidium atropurpureo* e *Phalaenopsis* Golden Peoker. A orquídea *Cymbidium atropurpureo* é mais tolerante ao AS em relação à *Phalaenopsis* Golden Peoker.

6 Referências

Barbosa, J.C., Maldonado, J.R.W., 2014. AgroEstat - System for statistical analysis of agronomic trials - version 1.1.0.711. 2014. Jaboticabal: Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences, Universidade Estadual Paulista.

- Caldas, L.S.; Haridasan, P.; Ferreira, M.E. Meios Nutritivos. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. 1998. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa Cenargen, pp. 87-132.
- Chen, Z., Silva, H., Klessig, D.F., 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*. 262, 1883–1886.
- Costa, M.A.P.C., Pereira, M.J., Rocha, M.A., Hamsen, D.S., Alves, R.M.O., Souza, E.H., Garcia, F.R., 2009. Micropropagação de orquídeas. In: Junghans, T.G.; Souza, A.S. Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Cruz das Almas: Embrapa MFT, pp. 351-370.
- Dionisio-Sese, M.L., Tobita, S., 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science* 135: 1-9.
- El-Housini, E. A., Ahmed, M. A., Hassanein, M. S., Tawfik, M. M., 2014. Effect of salicylic acid on growth and quality of stevia (*Stevia rebaudiana* bert.) under salt stress. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 14, 275-281.
- Horváth, E., Szalai, G., Janda, T., 2007. Induction of Abiotic Stress Tolerance by Salicylic Acid Signaling. *Journal Plant Growth Regulation*. 26, 290-300.
- Kong, J., Dong, Y., Zhang, X., 2015. Effects of exogenous salicylic acid on physiological characteristics of peanut seedlings under iron-deficiency stress. *Journal of Plant Nutrition*. 38, 127-144.
- Martín-Mex, R., Villanueva-Couoh, E., Herrera-Campos, T., Larqué-Saavedra A., 2005. Positive effect of salicylates on the flowering of African violet. *Scientia Hort.* 103, 499-502.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for a rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB (1997) Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes. *Plant Physiol.* 115, 137-149.
- Yuan, Z. Cong, G. Zhang, J., 2014. Effects of exogenous salicylic acid on polysaccharides production of *Dendrobium officinale*. *South African Journal of Botany*, 95, 78-84.

CAPÍTULO 3 - Silício pode induzir toxicidade dependendo da fonte e concentração adicionada no cultivo *in vitro* de orquídeas epífitas²

Resumo

A inclusão do silício (Si) como elemento benéfico no meio de cultivo *in vitro* de orquídeas pode aumentar o sucesso da cultura de tecidos. No entanto, o fornecimento do Si no cultivo pode causar toxicidade dependendo da fonte, mas ainda não há relatos sobre isso, indicando as concentrações tóxicas deste elemento. Foram realizados dois experimentos com duas espécies de orquídeas. As plântulas foram obtidas por semeadura de cápsulas contendo sementes maduras em condições assépticas. Aos 120 dias após a semeadura (DAS), plântulas da orquídea *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum* foram recultivadas em meio MS acrescido dos tratamentos fontes de Si (nanossílica, mistura de silicato de potássio e silicato de sódio e ácido monossilícico) e concentrações de silício (0,00; 14,15; 28,30; 42,45 e 56,6 mmol L⁻¹ de Si) em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x5, em quatro repetições com 10 plântulas. Aos 300 dias após a semeadura, o experimento foi finalizado e as plântulas retiradas dos frascos para quantificação do acúmulo de Si nos tecidos vegetais, avaliação dos dados fisiológicos, pigmentos, dados biométricos e a porcentagem de sobrevivência através da aclimatização de 20 plântulas de cada tratamento. O Si no cultivo *in vitro* de orquídeas pode favorecer o crescimento ou provocar toxicidade dependendo da fonte, concentração do elemento no meio de cultivo e da espécie. A nanossílica foi a fonte mais promissora para o cultivo de orquídeas, especialmente para *Cymbidium atropurpureo* e na concentração de 21,4 mmol L⁻¹ de Si. O ácido monossilícico foi a fonte mais tóxica pois provocou danos fisiológicos em concentrações maiores do que 14,1 e 11,2 mmol L⁻¹ de Si para *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum*, respectivamente.

Palavras - chave: Orchidaceae, nanossílica, silicato, ácido monossilícico, *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum*

² Este capítulo corresponde ao artigo científico publicado na revista Scientia Horticulturae, 265 (2020) 109272.

1 Introdução

A inclusão do silício como elemento benéfico no meio de cultivo de plantas pode aumentar o sucesso da cultura de tecidos, melhorando as características morfológicas, anatômicas e fisiológicas das plântulas *in vitro* (Sivanesan e Park, 2014). As fontes solúveis de Si mais utilizadas em solução nutritiva são o silicato de potássio (K_2SiO_3) e o silicato de sódio (Na_2SiO_3) que, em dissolução e hidrólise em água, forma H_4SiO_4 . No entanto, é importante estudar novas formulações com adição de estabilizantes nestas fontes para diminuir risco de polimerização. Uma fonte de Si que surgiu foi a nanossilica, que está na forma de SiO_2 em uma dispersão coloidal (Ruffini e Cremonini, 2009), por isso diminui os riscos de toxicidade. Outra fonte inovadora de Si é o ácido monossilícico (H_4SiO_4) estabilizado, estando na forma prontamente absorvida pelas plantas. No entanto, essa última fonte não é estável no estado livre, tendo risco da polimerização, que depende do valor pH e da concentração de Si na solução nutritiva (Annenkov et al., 2017).

As fontes de Si apresentam particularidades que podem beneficiar o crescimento das plantas mas ainda não estão claros os riscos da toxicidade que pode induzir prejuízos na fisiologia de plantas de orquídea. O problema da toxicidade é importante porque existe um relato inédito em que a aplicação via foliar de 39 e 18 $mmol L^{-1}$ Si na forma de ácido monossilícico no cultivo de híbridos de *Phalaenopsis* e *Dendrobium*, respectivamente diminuiu a produção de massa de matéria seca destas espécies (Mantovani et al., 2018). No entanto, ainda não é conhecido o efeito da toxicidade de Si em orquídeas cultivadas *in vitro* com fornecimento deste elemento no meio de cultivo permitindo a sua absorção radicular.

A toxicidade de qualquer elemento é dependente de vários fatores a exemplo da fonte e da concentração no meio de cultivo e o tempo ou frequência de aplicação deste elemento ao longo do ciclo da cultura (Prado, 2008). Nas plantas sob estresse nutricional como uma toxicidade, pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que promovem reações de oxidação degradando diferentes compostos orgânicos, induzindo aumento no índice de vazamento de eletrólitos celular, diminuindo o crescimento das plantas (Balakhnina e Borkowska, 2013).

Para avançar no conhecimento de fontes de Si em orquídeas surgem as hipóteses que o Si fornecido no meio de cultivo *in vitro* pode beneficiar as orquídeas e o excesso causa toxicidade, tendo aumento no vazamento de eletrólitos celulares, na produção de malondialdeído e no teor de peróxido de hidrogênio, dependendo da concentração de Si e da fonte empregada.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta de orquídeas epífitas em função da adição de fontes e concentrações de silício no cultivo *in vitro* de *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum*.

2 Material e Métodos

2.1 Material vegetal e condições de crescimento

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas Ornamentais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus de Jaboticabal, Brasil.

Cápsulas fechadas com sementes maduras das orquídeas *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum* foram superficialmente desinfestadas em etanol 70% por 5 minutos, seguido de hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo durante 30 minutos, e enxaguadas três vezes com água destilada e autoclavada, sendo posteriormente abertas no interior de câmara de fluxo. As sementes foram inoculadas em frascos plásticos transparentes, com 250 mL de capacidade e contendo 40 mL de meio nutritivo MS e autoclavados a 121°C e 1,1 atm durante 15 min (Caldas et al., 1998).

O meio MS apresenta a formulação proposta por Murashige e Skoog (1962), suplementado com vitaminas, inositol e glicina (Costa et al., 2009), 2% de sacarose, pH ajustado para 5,7 e geleificado com 0,7% de ágar.

A germinação e crescimento das duas espécies ocorreram em sala de incubação com temperatura de 25 ± 2 °C, iluminação com lâmpadas fluorescentes de aproximadamente $75 \mu\text{mol.m}^{-2}$ e fotoperíodo de 16 h luz.

Aos 120 dias após a semeadura (DAS) as plântulas da orquídea *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum* foram recultivadas em meio MS acrescido dos tratamentos.

2.2 Tratamentos e delineamento experimental

Foram avaliadas três fontes de silício: nanossílica Bindizil® (Si_Nano) (77 g L^{-1} de Si; diâmetro médio: 4 nm; área superficial: $750 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$); mistura de silicato de potássio e silicato de sódio estabilizado com sorbitol, Sinake (Si_K) (107 g L^{-1} de Si ; $34,7 \text{ g L}^{-1}$ de K_2O ; $45,0 \text{ g L}^{-1}$ de Na); e ácido monossilícico Zumsil™ (Si_Mono) ($79,3 \text{ g L}^{-1}$ de Si; 125 g L^{-1} de Na; densidade = 1,15; fabricado pela TERRATECH CORP. Miami, Florida, USA); e cinco concentrações: 0,00; 14,15; 28,30; 42,45 e 56,6 mmol L^{-1} de Si presente no meio MS. O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 5, com quatro repetições e 10 plântulas em cada parcela. Em todos os tratamentos as concentrações de potássio e sódio foram balanceadas.

2.3 Avaliações biométricas

Ao término do cultivo *in vitro* (aproximadamente 300 dias após a semeadura), os experimentos foram finalizados e as plântulas de *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum* foram retiradas dos frascos.

Nas duas espécies foram avaliados: o número de raízes, área foliar (foram coletadas todas as folhas das plântulas para determinação em medidor eletrônico de área foliar Li-Cor, modelo L1-3100®), massa seca total (o material vegetal foi conduzido à estufa com circulação forçada de ar à temperatura de $65 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 96 horas, foram obtidas as massas secas com o auxílio de uma balança analítica, precisão de 0,001 g). A altura da parte aérea (determinada do colo da muda à inserção da primeira folha completamente desenvolvida) e número de folhas foram determinadas somente para *Cymbidium atropurpureo*.

2.4 Teor de clorofila e carotenoides

Foram coletadas, de cada tratamento, quatro plântulas de *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum* e pesados cerca de 0,50 mg de massa fresca de folhas e adicionadas em tubo com 2 mL de acetona (80%). Depois de permanecerem em repouso por 72 h a 4 °C, as amostras foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 470 nm para carotenoides e 645 nm para clorofila *a*. Os teores dos pigmentos foram calculados conforme descrito por Lichtenthaler (1987).

2.5 Teor de Si

Após determinação da massa seca de *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum*, as amostras foram moídas em moinho do tipo Willey. Em sequência, foi realizada análise do teor de Si total, através de digestão alcalina com H₂O₂ e NaOH em estufa de circulação fechada de ar a 90 °C por 4 horas (Kraska e Breitenbeck, 2010), seguida por leitura colorimétrica em espectrofotômetro (Korndorfer et al., 2004). A partir dos dados de produção de massa seca e teor de Si, foi calculado o acúmulo do elemento através do produto do teor e massa de matéria seca.

2.6 Avaliações do estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi mensurado em *Cymbidium atropurpureo* a partir do índice de vazamento de eletrólitos e em *Dendrobium secundum* através da produção de malondialdeído (MDA) e de peróxido de hidrogênio.

A integridade física das membranas das células foliares de *Cymbidium atropurpureo* foi determinada pelo índice de vazamento de eletrólitos (Dionisio-Sese e Tobita, 1998). Coletaram-se discos de 200 mg das folhas, transferiu-os para snap-caps (25 mL) e adicionou-se 20 ml de água destilada, permanecendo por 1 h. Mediu-se a condutividade elétrica inicial (CE₁). Em seguida, as amostras foram emergidas

em água destilada a 100°C permanecendo por 2 h, período necessário para que a solução estivesse com temperatura ambiente (25°C, aproximadamente). Mediu-se a condutividade elétrica final (CE₂). O vazamento de eletrólitos (VE, %) foi calculado como: $VE = (CE_1/CE_2) * 100$.

Ao término do cultivo *in vitro* foram coletadas folhas de *Dendrobium secundum* e armazenadas a -80 °C por um período de 30 dias para as análises de estresse oxidativo. O teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinado conforme metodologia proposta por Alexieva et al. (2001). Os tecidos foliares das plantas foram homogeneizados em ácido tiobarbitúrico (0,1%) e centrifugados a 10.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante obtido foi adicionado a 100 mmol L⁻¹ de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e solução de iodeto de potássio (1 mol L⁻¹), em seguida incubado em gelo durante uma hora. A leitura foi realizada em absorbância de 390 nm e o teor de H₂O₂ determinado em função da curva padrão de concentração de H₂O₂. A peroxidação lipídica foi obtida através do método descrito por Heath e Packer (1968), e estimada através do teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O teor de malondialdeído (MDA) foi obtido por leitura realizada em espectrofotômetro entre 535 e 600 nm, os dados obtidos foram submetidos a um cálculo com base no coeficiente de extinção de 1,55 x 10⁻⁵ mol⁻¹ cm⁻¹ (Gratão et al., 2012).

2.7 Aclimatização

Aos 300 dias após a semeadura, 20 plântulas de *Cymbidium atropurpureo* e de *Dendrobium secundum* de cada tratamento foram retiradas dos frascos aleatoriamente e aclimatizadas, sendo colocadas em bandejas de plástico com substrato esfagno seco. Receberam quinzenalmente a solução nutritiva completa de Sarruge (1975) a 50%, via fertirrigação, em casa de vegetação (com 80% de sombreamento), por 120 dias, e foram avaliadas quanto à porcentagem de sobrevivência.

2.8 Análises estatísticas

Os dados foram analisados separadamente para cada espécie. Foi realizado o teste de variância (teste F) a 1 e 5% de probabilidade, e, quando significativo, para doses, foi realizado estudo de regressão polinomial. Para as fontes, quando significativa a variância, foi realizado o teste de comparação de médias (Tukey a 5% de probabilidade). Os cálculos foram realizados com o auxílio do programa estatístico AgroEstat® (Barbosa e Maldonado Júnior, 2014).

3 Resultados

3.1 Acúmulo de silício

Houve interação entre as fontes de Si e as concentrações aplicadas para o acúmulo de Si em *Cymbidium atropurpureo*. Esta variável respondeu às concentrações de Si, com ajuste quadrático, com máximos nas concentrações de 29,8; 27,2 e 11,4 mmol L⁻¹ de Si quando se utilizou nanossílica (336,31 mg por planta), mistura de silicato de potássio e silicato de sódio (293,46 mg por planta) e ácido monossilícico (157,79 mg por planta), respectivamente (Fig. 1A). Na menor concentração estudada (14,15 mmol L⁻¹), o maior acúmulo foi observado com o uso de mistura de silicato de potássio e silicato de sódio (286,85 mg por planta) seguido da nanossílica (252,95 mg por planta); e na maior concentração estudada (56,6 mmol L⁻¹) não houve diferença entre o uso de mistura de silicato de potássio e silicato de sódio e da nanossílica.

A fonte ácido monossilícico resultou no menor acúmulo de Si nas plântulas de *Cymbidium atropurpureo* em todas as concentrações estudadas (Figura 1A).

Houve interação entre as fontes e as concentrações de Si para o acúmulo de Si em *Dendrobium secundum*. Esta variável apresentou incremento, com ajuste quadrático, em função do aumento das concentrações de Si com ponto máximo de 175,17; 133,43 e 62,49 mg por planta, nas concentrações de 31,55; 26,23 e 14,88 mmol L⁻¹ de Si para nanossílica, mistura de silicato de potássio e silicato de sódio e ácido monossilícico, respectivamente (Fig. 2A). Na concentração de 14,15 mmol L⁻¹ de Si, para acúmulo de Si, não houve diferença entre a nanossílica e a mistura de

silicato de potássio e silicato de sódio, sendo ambas maiores que o acúmulo observado com o uso da fonte ácido monossilícico. Nas demais concentrações a nanossilica se destacou por resultar no maior acúmulo de Si na parte aérea de *Dendrobium secundum* (Figura 2A).

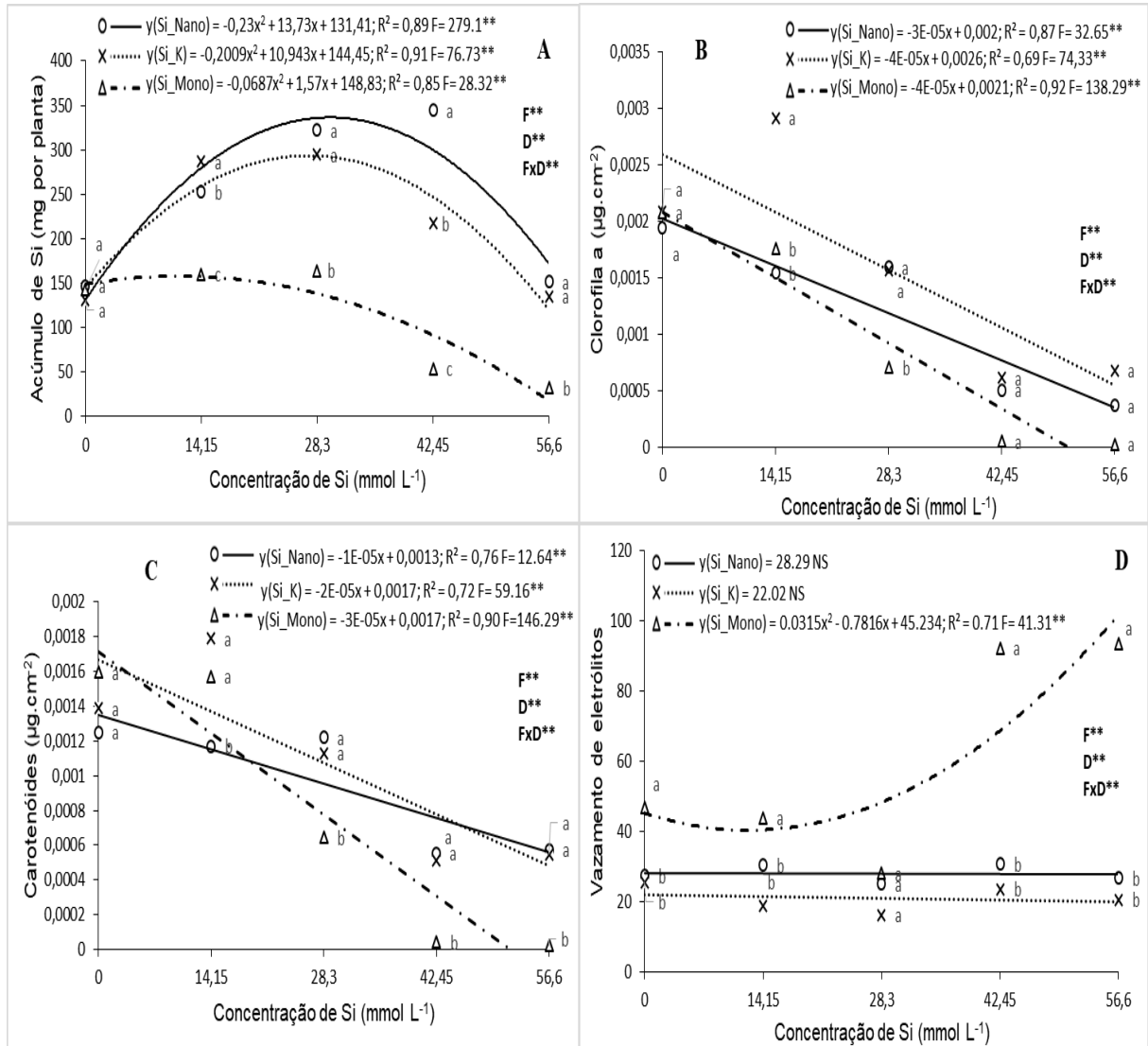


Figura 1. Acúmulo de Si (mg por planta) (A), teores de clorofila a (µg.cm⁻²) (B), carotenóides (µg.cm⁻²) (C) e vazamento de eletrólitos (%) (D) em plântulas de *Cymbidium atropurpureo* 300 dias após a semeadura. * p<0,05; ** p<0,01; NS não significativo pelo teste F.

F para fonte de Si, D para concentração de Si e FxD para interação.

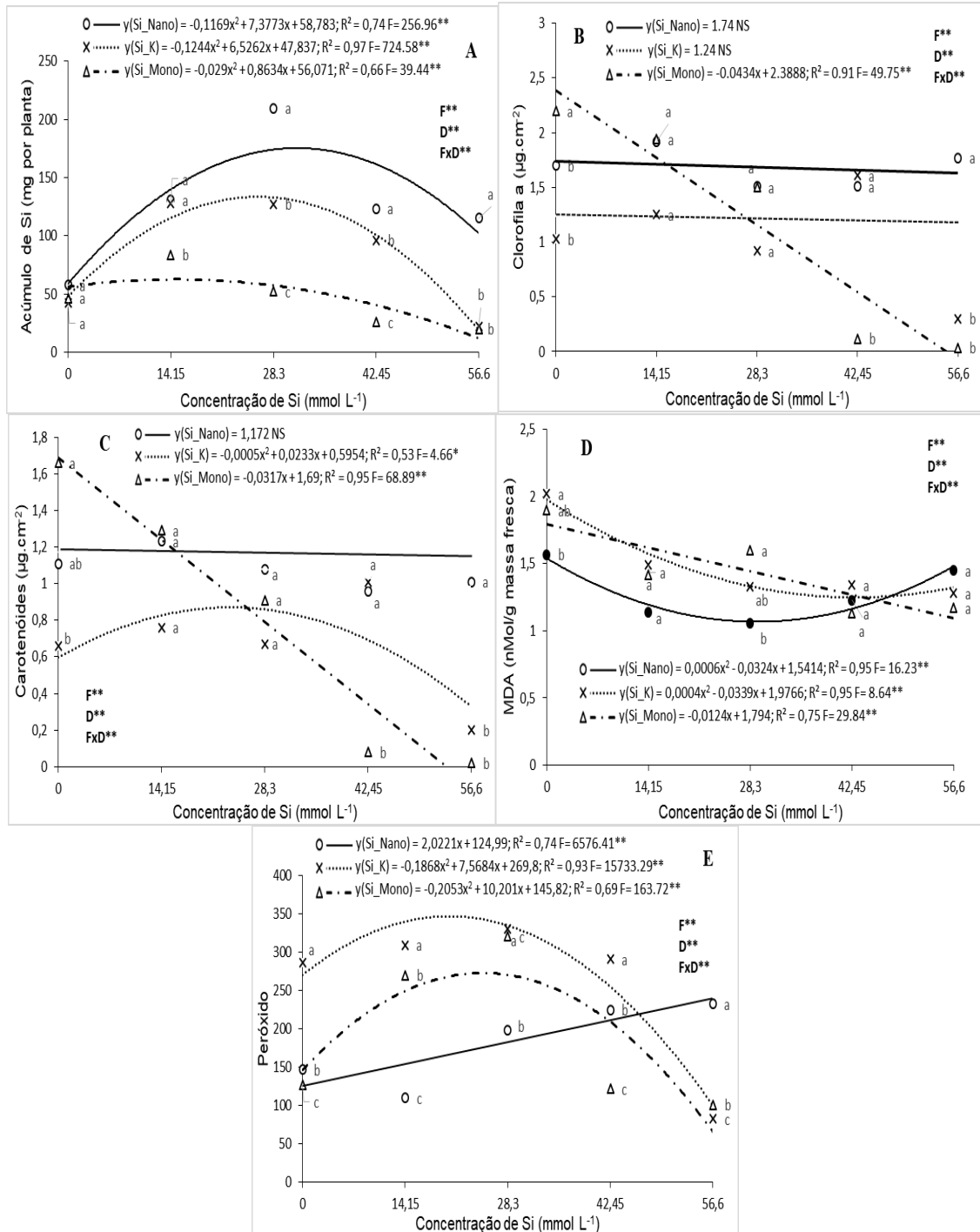


Figura 2. Acúmulo de Si (mg por planta) (A), teor de clorofila a (µg.cm⁻²) (B), teor de carotenóides (µg.cm⁻²) (C), teor de MDA (nMol por grama de massa fresca) (D) e peróxido de hidrogênio (E), em plântulas de *Dendrobium secundum* 300 dias após a semeadura. * p<0,05; ** p<0,01; NS não significativo pelo teste F.

F para fonte de Si, D para concentração de Si e FxD para interação.

3.2 Clorofila e carotenoides

Os teores de pigmentos do *Cymbidium atropurpureo* dependem da fonte e das concentrações de Si empregadas durante o cultivo. O teor de clorofila *a* e carotenóides decresceu linearmente em função do aumento das concentrações de Si independente da fonte utilizada (Fig. 1B e 1C). Na menor concentração estudada (14,15 mmol L⁻¹ de Si), a mistura de silicato de potássio e silicato de sódio se destacou, resultando no maior teor de clorofila *a* (Fig. 1B). Nesta mesma concentração, não houve diferença entre a mistura de silicato de potássio e silicato de sódio e o ácido monossilícico para o teor de carotenóides (Fig. 1C). Na concentração de 28,3 mmol L⁻¹ de Si, para as variáveis de pigmentos, não houve diferença entre as fontes mistura de silicato de potássio e silicato de sódio e nanossílica, sendo ambas maiores comparadas ao ácido monossilícico. Para as concentrações mais altas (42,45 e 56,6 mmol L⁻¹ de Si) não foi observado diferença entre as fontes para clorofila *a*; no entanto, nestas mesmas concentrações, houve menor produção de carotenoides quando utilizada a fonte ácido monossilícico.

Em *Dendrobium secundum*, foi observada interação entre as fontes e as concentrações para a produção de clorofila *a* e de carotenoides (Figura 2B e 2C). Não houve ajuste significativo da nanossílica para o teor de clorofila *a* e carotenóides. Para a fonte ácido monossilícico ocorreu decréscimo no teor de clorofila *a* em função do aumento da concentração de Si aplicada, com ajuste linear, apresentando na maior concentração estudada (56,6 mmol L⁻¹ de Si) diminuição de 98,4% de clorofila *a* (0,036 µg.cm⁻²) em comparação ao tratamento controle (0 mmol L⁻¹). O teor de carotenóides decresceu em função do aumento da concentração de Si, com ajuste linear, para o ácido monossilícico, com produção de 0,02 µg.cm⁻² na maior concentração estudada (56,6 mmol L⁻¹ de Si), sendo 98,8% menor comparada ao tratamento controle. O aumento das concentrações de Si na forma de mistura de silicato de potássio e silicato de sódio aumentou de forma quadrática o teor de carotenóides, atingindo ponto de máximo (0,87 µg.cm⁻²) com a adição de 23,3 mmol L⁻¹ de Si. A maior concentração de Si aplicada (56,6 mmol L⁻¹) na forma de nanossílica promoveu o maior teor de clorofila

a, não havendo diferença comparado a mistura de silicato de potássio e silicato de sódio na concentração de 42,45 mmol L⁻¹ e entre mistura de silicato de potássio e silicato de sódio, e ácido monossilícico nas demais concentrações (Fig. 2B).

3.3 Estresse oxidativo

As concentrações de nanossílica e mistura de silicato de potássio e silicato de sódio não influenciaram o extravazamento de eletrólitos em *Cymbidium atropurpureo*; apenas o ácido monossilícico provocou incremento de forma quadrática com ponto de mínimo (40,4%) aplicando-se 12,4 mmol L⁻¹ de Si. O máximo extravazamento de eletrólitos (93,4%) foi verificado com a adição de 56,6 mmol L⁻¹ de Si na forma de ácido monossilícico (Fig. 1D).

Houve efeito significativo para o teor de MDA e de peróxido de hidrogênio em *Dendrobium secundum* em função do aumento da concentração de Si (Figura 2D e 2E). Ocorreu incremento de forma linear do teor de peróxido de hidrogênio e diminuição de forma quadrática no teor de MDA atingindo ponto de mínimo (1,1) com a adição de 27 mmol L⁻¹ de Si na forma de nanossílica. Na concentração de 14,15 e 28,3 mmol L⁻¹ de Si, a nanossílica resultou em menor teor de peróxido de hidrogênio, no entanto, esta fonte provocou a maior produção de peróxidos na maior concentração estudada (56,6 mmol L⁻¹ de Si).

O aumento das concentrações de Si na forma de mistura de silicato de potássio e silicato de sódio promoveu incremento e diminuição de forma quadrática no teor de peróxido de hidrogênio e MDA, respectivamente; com ponto de máximo (346,4) e de mínimo (1,25) com a adição de 20,2 e 42,3 mmol L⁻¹ de Si, respectivamente (Fig. 2E e 2D). Na menor (14,15 mmol L⁻¹ de Si) e na segunda maior concentração estudada (42,45 mmol L⁻¹ de Si) a mistura de silicato de potássio e silicato de sódio se destacou, negativamente, com a maior produção de peróxido de hidrogênio pelas plantas.

O aumento das concentrações de Si na forma de ácido monossilícico promoveu incremento de forma quadrática no teor de peróxido de oxigênio e diminuição de forma linear no teor de MDA. O ponto de máximo teor de peróxido de hidrogênio (272,5) foi com a adição de 24,84 mmol L⁻¹ de Si na forma de ácido monossilícico (Fig. 2D e 2E).

3.4 Crescimento e desenvolvimento das plântulas

Houve interação para área foliar, número de folhas, altura da parte aérea, número de raízes e produção de massa de matéria seca total de *Cymbidium atropurpureo* (Fig. 3A, 3B, 3C, 3D e 3E).

A área foliar de *Cymbidium atropurpureo* aumentou de forma quadrática com o aumento das concentrações de Si na forma de nanossílica e da mistura de silicato de potássio e silicato de sódio; e diminuiu linearmente com o aumento das concentrações de Si na forma de ácido monossilícico. Os pontos de máxima área foliar em *Cymbidium atropurpureo* (3,1 e 2,8 cm²) foram observados com a aplicação de 20,4 e 22 mmol L⁻¹ de Si na forma de nanossílica e da mistura de silicato de potássio e silicato de sódio, respectivamente (Fig. 3A).

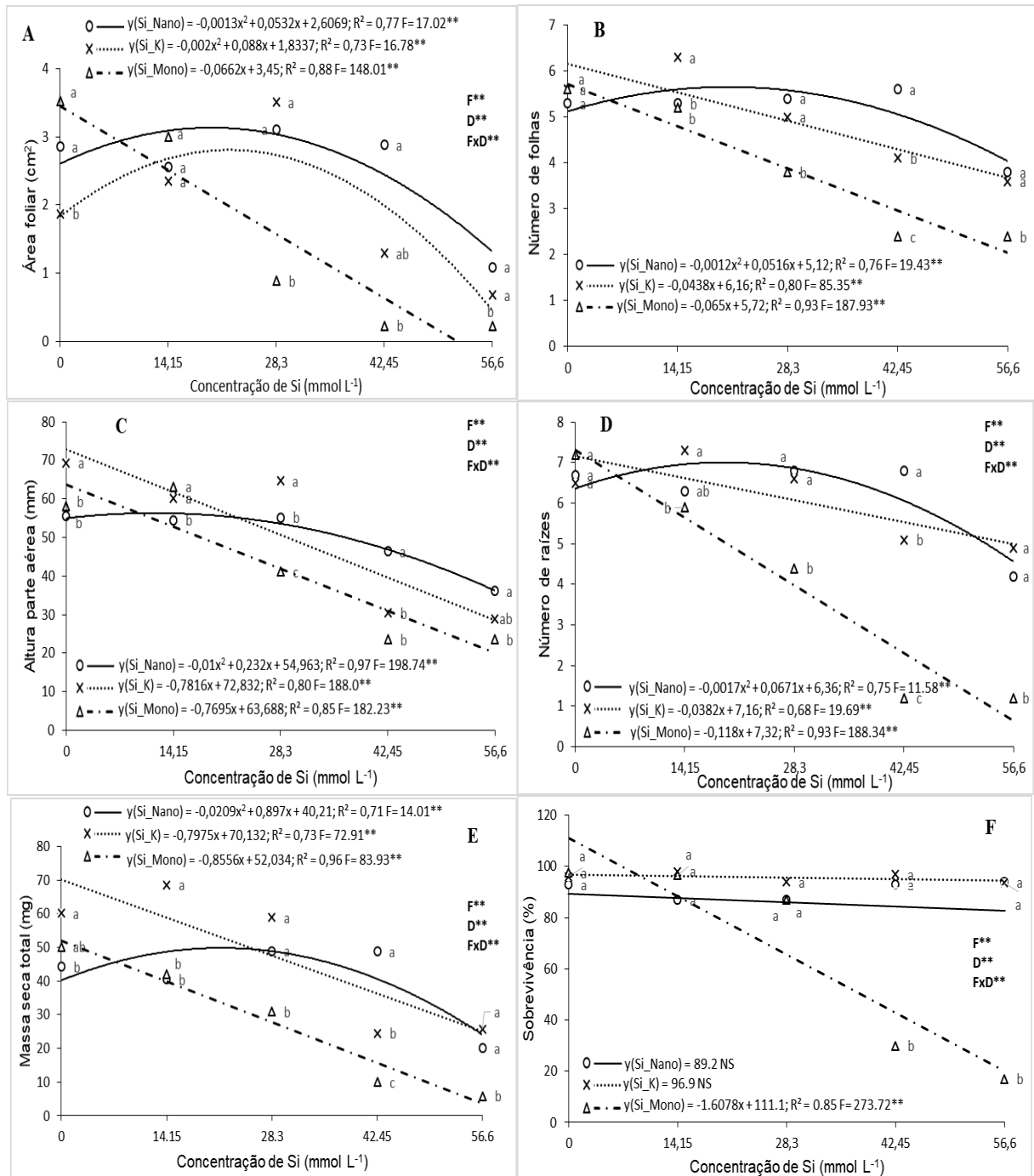


Figura 3. Área foliar (cm²) (A), número de folhas (B), altura da parte aérea (mm) (C), número de raízes (D) e massa seca total (mg) (E) de plântulas de *Cymbidium atropurpureo* 300 dias após a semeadura e sobrevivência de plântulas (%) (F) após 120 dias de aclimatização. * p<0,05; ** p<0,01; NS não significativo pelo teste F.

F para fonte de Si, D para concentração de Si e FxD para interação.

O número de folhas, a altura da parte aérea, o número de raízes e a massa seca total decresceram com o aumento das concentrações de Si, com ajuste linear para ácido monossilícico e mistura de silicato de potássio e silicato de sódio, e com ajuste quadrático para nanossílica. Os pontos máximos para nanossílica foram observados nas concentrações de 21,5; 11,6; 19,7 e 21,4 mmol L⁻¹ de Si para número de folhas (5,7), altura da parte aérea (56,3 mm), número de raízes (7,0) e massa seca total (49,8 mg), respectivamente (Fig. 3B, 3C, 3D e 3E).

A fonte ácido monossilícico foi a que mais prejudicou o crescimento e o desenvolvimento de *Cymbidium atropurpureo*, comparado às demais fontes estudadas, por resultar no menor número de folhas, número de raízes e produção de massa seca total, quando utilizadas as concentrações entre 28,3 e 56,6 mmol L⁻¹ de Si.

Houve interação entre as concentrações de Si e as fontes utilizadas para área foliar, número de raízes e massa seca total de *Dendrobium secundum* (Fig. 4A, 4B e 4C). O aumento nas concentrações de Si na forma de nanossílica não tiveram efeito sob a área foliar, número de raízes e massa de matéria seca total das plântulas de *Dendrobium secundum*. O aumento das concentrações de Si na forma da mistura de silicato de potássio e silicato de sódio promoveu incremento de forma quadrática na área foliar e diminuição de forma linear no número de raízes; enquanto o ácido monossilícico promoveu a diminuição de forma linear nesses parâmetros (Fig. 4A, 4B e 4C).

A massa seca total para *Dendrobium secundum* aumentou de forma quadrática com o aumento das concentrações de Si na forma da mistura de silicato de potássio e silicato de sódio e do ácido monossilícico atingindo os pontos de máximo (61 e 45 mg) com a aplicação de 20,9 e 11,2 mmol L⁻¹ de Si, respectivamente (Fig. 4C).

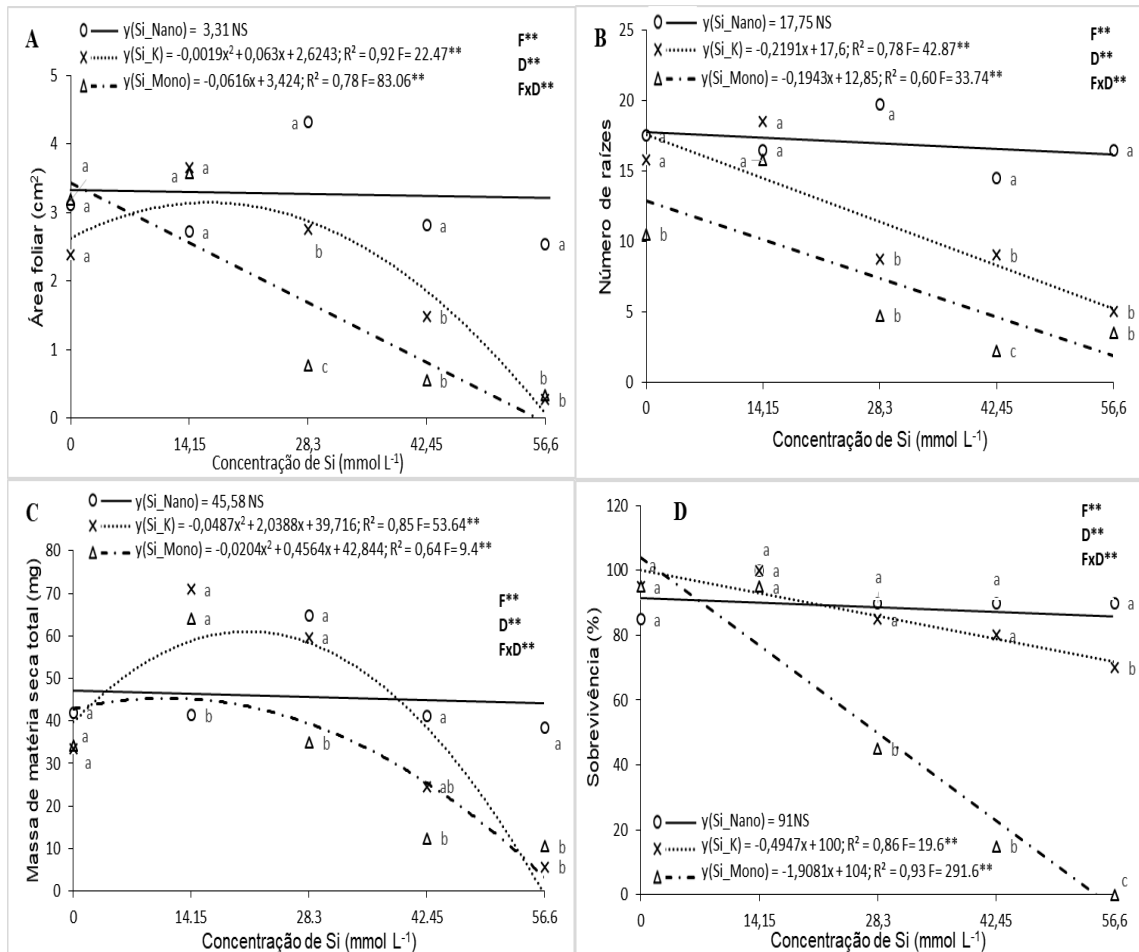


Figura 4. Área foliar (cm²) (A), número de raízes (B) e massa seca total (mg) (C) de plântulas de *Dendrobium secundum* 300 dias após a semeadura, e sobrevivência de plântulas (%) (D) após 120 dias de aclimatação.
 * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ^{NS} não significativo pelo teste F.
 F para fonte de Si, D para concentração de Si e FxD para interação.

3.5 Sobrevivência de plântulas na aclimatação

A porcentagem de sobrevivência das plântulas de *Cymbidium atropurpureo* não foi influenciada pelas concentrações de Si na forma de nanossílica e mistura de silicato de potássio e silicato de sódio; e diminuiu de forma linear com o aumento das concentrações de Si na forma de ácido monossilícico (Fig. 3F).

Para *Dendrobium secundum*, a porcentagem de sobrevivência das plântulas também não foi influenciada pelas concentrações de Si na forma de nanossílica; e diminuiu de forma linear com o aumento das concentrações de Si na forma de ácido monossilícico e mistura de silicato de potássio e silicato de sódio (Fig. 4D).

4 Discussão

Este estudo demonstrou que as orquídeas absorveram Si do meio de cultivo aplicado nas formas de nanossílica ou mistura de silicato de potássio e silicato de sódio estabilizados ou ácido monossilícico. Portanto, tem-se o primeiro relato que indica que as espécies *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum* em cultivo *in vitro* tem habilidade para absorção de Si com essas novas fontes, especialmente a nanossílica e a mistura silicato de potássio e silicato de sódio estabilizado. O emprego de outras fontes de Si também indicaram que as orquídeas absorvem o Si como silicato de cálcio (Zhou, 1995; Pasqual et al., 2011; Soares et al., 2012) e também silicato de potássio e silicato de sódio (Soares et al., 2011) isolados, mas sem estabilizantes e ainda os autores não realizaram o balanceamento dos elementos acompanhantes das fontes, o que poderia interferir na absorção de Si.

A fonte mistura de silicato de potássio e silicato de sódio proporcionou o maior acúmulo de Si nas menores concentrações (Fig. 1A e 2A) indicando alta eficiência desta fonte em fornecer o elemento para orquídeas em meio de cultura. Nas concentrações de Si intermediárias a nanossílica se destacou possivelmente tendo maior estabilidade e menor taxa de polimerização (Annenkov et al., 2017).

Com o aumento da concentração para 56,6 mmol L⁻¹ houve menor absorção do elemento nas orquídeas em todas as fontes, indicando que deve ter ocorrido a polimerização na solução nutritiva, impossibilitando sua absorção. Este problema da polimerização do Si ocorre pela formação de ligações silanol (Si-O-Si) entre os tetraedros de silício, formando cadeias longas em seguida a sílica gel (Annenkov et al., 2017).

Todas as fontes de Si adicionadas *in vitro* prejudicaram o teor de clorofila *a* e de carotenóides em *Cymbidium atropurpureo*, demonstrando como essa espécie de orquídea é sensível à toxicidade de Si, pois a clorofila constitui um fator indicativo de

estresse. Essa diminuição da produção de clorofila *a* ocorreu para as concentrações de Si estudadas (14,15 a 56,6 mmol L⁻¹) e pelo tempo de fornecimento do elemento durante o cultivo. Em outros estudos com concentrações de Si inferiores houve incremento da clorofila verificado no cultivo *in vitro* de plantas comerciais como: morangueiro (Braga et al., 2009), antúrio (Dias et al., 2017) e bromélia (Martins et al., 2019).

O *Dendrobium secundum* foi tolerante ao excesso de Si e apenas a fonte ácido monossilícico prejudicou a síntese de clorofila *a* e carotenóides, pois a capacidade de absorção e acúmulo de silício pelas plantas é variável de acordo com a forma e disponibilidade do elemento, bem como a espécie estudada (Haghighi e Pessarakli, 2013), e como as fontes estudadas são inéditas no cultivo *in vitro* de orquídeas, os resultados não seguiram a mesma tendência para espécie e fonte.

O aumento do vazamento de eletrólitos em *Cymbidium atropurpureo* ocorreu devido ao excesso de Si que pode ter causado mudanças nas reações metabólicas das plântulas e pode ter induzido a produção de ERO. Essas espécies degradam diferentes compostos orgânicos induzindo aumento no índice de vazamento de eletrólitos celular diminuindo o crescimento das plantas (Balakhnina e Borkowska, 2013).

Em *Dendrobium secundum* a adição de 31,5 mmol L⁻¹ de Si na forma de nanossilica correspondeu ao maior acúmulo de Si e ao alto teor de MDA, sinalizando que o maior acúmulo de Si pode aumentar a produção de ERO e induzir o estresse oxidativo nas células das plantas e, que são altamente reativas e podem induzir a peroxidação lipídica causando danos para enzimas, proteínas e ácidos nucleicos (Mishra et al., 2006; Duman e Koca, 2014).

Os maiores teores de peróxido de hidrogênio corresponderam aos menores teores de MDA, sinalizando menor dano no tecido foliar, devido a concentração moderada e benéfica de Si utilizadas. Essa diminuição no teor de MDA foi visto em *Dendrobium moniliforme* cultivada sob frio e submetida a aplicação de concentração baixa de Si (0,4 mmol L⁻¹) na forma de silicato de sódio (Duan et al., 2013).

Para as três fontes de Si testadas, o aumento na concentração de Si gerou uma sinalização em *Dendrobium secundum* em que as plântulas prejudicadas pelo ácido monossilícico diminuiu o teor de MDA e a concentração tóxica de Si favoreceu a

formação de H_2O_2 . É conhecido que a produção de ERO é aumentada como resultado de todos os tipos de estresse (Qin e Tian, 2009); nesse caso o excesso de Si constituiu estresse abiótico.

A maior concentração de Si das fontes testadas prejudicou o crescimento *in vitro* de *Cymbidium atropurpureo*, que é mais sensível ao aumento das concentrações de Si do que a espécie *Dendrobium secundum*. Essa diferença, possivelmente, ocorreu porque a absorção de Si pode variar dentro da mesma espécie de planta ou genótipo (Sivanesan e Park, 2014).

O efeito deletério do fornecimento de Si na forma de ácido monossilícico em todas as variáveis avaliadas, indica efeito tóxico desta fonte para fornecimento via meio de cultura para *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum* a partir de concentrações maiores do que $11,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de Si.

A mistura de silicato de potássio e silicato de sódio possibilitou a maior área foliar com 22 e $16,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de Si para *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum*, respectivamente. Esse efeito benéfico da adição de silicato no cultivo *in vitro* de orquídeas corrobora com os resultados verificados por Soares et al. (2011) que utilizaram o meio Knudson C, observaram aumento do número de raízes e comprimento de parte aérea e raiz em plântulas de *Cattleya loddigesii* com a adição de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de potássio e $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de sódio.

O silicato pode favorecer o cultivo *in vitro* de orquídeas, dependendo da fonte e concentração utilizada. Para *Cymbidium atropurpureo*, a adição da mistura de silicato de potássio e silicato de sódio prejudicou o acúmulo de massa de matéria seca total; mas para *Dendrobium secundum* a adição de $20,9 \text{ mmol L}^{-1}$ de Si dessa fonte promoveu os melhores resultados, assim como a inclusão de silicato de cálcio a $0,5$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ao meio MS estimulou o crescimento de *Brassavolva perrinii* e ((*Laeliacattleya* Culminant "Tuilerie" x *Laeliacattleya* Sons Atout Rotunda) x *Brassolaeliacattleya* Startifire Moon Beach), respectivamente (Soares et al., 2012).

A nanossílica foi a melhor fonte de Si para o cultivo *in vitro* de *Cymbidium atropurpureo*, pois incrementou o número de folhas, a altura da parte aérea, a área foliar, o número de raízes, a massa de matéria seca total. Essa fonte estando na forma de SiO_2 estaria presente abaixo da cutícula e na parede celular da folha tendo papel estrutural e não sendo possível aumentar o teor de Si no citoplasma por não ter

carregadores específicos para essa forma de Si que poderia auxiliar para atravessar a membrana plasmática. Apesar da nanossílica ainda não ter sido testada para cultivo *in vitro* de orquídeas, sabe-se que os nanomateriais por causa de seu pequeno tamanho apresentam características específicas. Por exemplo, eles têm maior área superficial do que materiais a granel e, devido a essa maior área de superfície, sua solubilidade e reatividade superficial tendem a ser mais altas (Ruffini e Cremonini, 2009).

A absorção do Si *in vitro* na forma de nanossílica não influenciou a sobrevivência das plântulas de *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum*, pois o Si só tem efeito benéfico em condições de estresse abiótico que pode ocorrer nessa fase de aclimatização do cultivo *in vitro* para o cultivo *ex vitro*, das plântulas. O Si se deposita abaixo da camada de cutícula nas folhas, causando diminuição na taxa de transpiração; portanto, mantém alto teor relativo de água nas folhas, o que faz com que a planta não consuma mais água sob alto potencial osmótico (Sangster et al., 2001). Esse efeito benéfico do Si ($5,8 \text{ mmol L}^{-1}$) na aclimatização ocorreu para plântulas de bromélias *Billbergia zebrina* que foram cultivadas *in vitro* com a adição de silicato ao meio de cultura e tiveram taxas de sobrevivência superiores em relação àquelas cultivadas no tratamento controle sem Si (Martins et al., 2018).

Já a absorção do Si *in vitro* na forma de ácido monossilícico diminuiu a sobrevivência das plântulas de *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum*, pois o Si em excesso pode causar toxicidade visto nas variáveis indicadoras de estresse dito anteriormente. Mantovani et al. (2018) também observaram prejuízo em orquídeas com aplicação de Si em concentrações altas (39 e 18 mmol L^{-1}) na forma de ácido monossilícico mas utilizando a pulverização foliar.

5 Conclusões

O Si no cultivo *in vitro* de orquídeas pode favorecer o crescimento ou provocar toxicidade, dependendo da fonte, concentração do elemento no meio de cultivo e da espécie. A nanossílica foi a fonte mais promissora para cultivo de orquídeas especialmente para *Cymbidium atropurpureo* e na concentração de $21,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de Si. O ácido monossilícico foi a fonte mais tóxica, pois provocou danos fisiológicos em

concentrações maiores do que 14,1 e 11,2 mmol L⁻¹ de Si para *Cymbidium atropurpureo* e *Dendrobium secundum*, respectivamente.

6 Referências

- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 24, 1337-1344.
- Annenkov, V.V., Danilovtseva, E.N., Pal'shin, V.A., Ol'ga, N.V., Zelinskiy, S.N., Krishnan, U.M., 2017. Silicic acid condensation under the influence of water-soluble polymers: from biology to new materials. *RSC Advances*, 7, 20995-21027.
- Balakhnina, T., Borkowska, A. 2013. Effects of silicon on plant resistance to environmental stresses. *International Agrophysics*, 27, 225-232.
- Barbosa, J.C., Maldonado, JR.W., 2014. AgroEstat - System for Statistical Analysis of Agronomic Trials - Version 1.1.0.711. Jaboticabal: Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences, Universidade Estadual Paulista.
- Braga, F. T., Nunes, C. F., Favero, A. C., Pasqual, M., de Carvalho, J. G., de Castro, E. M. 2010. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(2), 128-132.
- Caldas, L.S., Haridasan, P., Ferreira, M.E. 1998. Meios Nutritivos. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (Ed.), *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa Cenargen, Brasília, pp. 87-132.
- Costa, M. A. P. C., Pereira, M. J., Rocha, M. A., Hamsen, D.S., Alves, R.M.O., Souza, E.H., Garcia, F.R. 2009. Micropropagação de orquídeas. In: Junghans, T.G., Souza, A.S. *Aspectos práticos da micropropagação de plantas*. Embrapa MFT, Cruz das Almas, pp. 351-370.
- Dias, G. D. M. G., Soares, J. D. R., Ribeiro, S. F., Martins, A. D., Pasqual, M., Alves, E. 2017. Morphological and physiological characteristics *in vitro* antherium plantlets exposed to silicon. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 17, 18-24.
- Dionisio-Sese, M. L., Tobita, S. 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, Shannon, 135, 1-9.
- Duan, X., Tang, M., Wang, W. 2013. Effects of silicon on physiology and biochemistry of *Dendrobium moniliforme* plantlets under cold stress. *Agric Biotechnol* 2, 18–21.

- Duman, F., Koca, F. D. 2014. Single and combined effects of exposure concentration and duration on biological responses of *Ceratophyllum demersum* L. Exposed to Cr species. *Int. J. Phytoremediation* 16, 1192–1208.
- Gratão, P. L., Monteiro, C. C., Carvalho, R. F., Tezotto, T., Piotto, F. A., Peres, L. E., Azevedo, R. A. 2012. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 56, 79-96.
- Haghighi, M., Pessarakli, M. 2013. Influence of silicon and nano-silicon on salinity tolerance of cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) at early growth stage. *Scientia Horticulturae*, 161, 111-117.
- Heath, R. L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125, 189-198.
- Korndörfer, G.H., Pereira, H. S., Nolla, A. 2004. Silicon analysis: soil, plant and fertilizer. Uberlândia MG. Institute of Agrarian Sciences. Federal University of Uberlândia. Technical Bulletin, 2.
- Kraska, J.E., Breitenbeck, G.A. 2010. Simple, Robust Method for quantifying silicon in plant tissue. *Communication in soil science and plant analysis*, 41, 2075-2085.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148, 350–382.
- Mantovani, C., Prado, R. M., Pivetta, K. F. L. 2018. Silicon foliar application on nutrition and growth of *Phalaenopsis* and *Dendrobium* orchids. *Scientia Horticulturae*, 241, 83-92.
- Martins, A. D., Martins, J. P. R., Batista, L. A., Dias, G. M., Almeida, M. O., Pasqual, M., Santos, H. O. 2018. Morpho-physiological changes in *Billbergia zebrina* due to the use of silicates *in vitro*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 3449-3462.
- Martins, J. P. R., de Almeida Rodrigues, L.C., dos Santos Silva, T., Santos, E.R., Falqueto, A.R., Gontijo, A.B.P.L. 2019. Sources and concentrations of silicon modulate the physiological and anatomical responses of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) during *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 137, 397-410.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V., Prasad, M.N.V., 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monniera*. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 25–37.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Pasqual, M., Soares, J. D. R., Rodrigues, F. A., Araujo, A. G., Santos, R. R. 2011. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridadas. *Horticultura Brasileira*, 29, 324-329.

- Qin, G. Z., Tian, S. P. 2005. Enhancement of biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* by silicon and the possible mechanisms involved. *Phytopathology*, 95, 69-75.
- Prado, R. M. 2008. Introdução a nutrição de plantas. In: Prado, R. M. (Ed), Plant nutrition. UNESP, Jaboticabal, p. 7 - 46.
- Ruffini, C.M., Cremonini, R., 2009. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia* 62, 161–165.
- Sangster A. G., Hodson, M. J., Tubb, H. J. 2001. Silicon deposition in higher plants. L.E. Datnoff, G.H. Snyder, G.H. Korndörfer (Eds.), *Silicon in Agriculture*, Elsevier, Amsterdam, pp. 85–113.
- Sarruge, J. R. 1975. Nutrition solutions. *Summa Phytopathol.* 1, 231–233.
- Sivanesan, I., Park, S. 2014. The role of silicon in plant tissue culture. *Front. Plant Sci.* 5, 571.
- Soares, J. D. R., Pasqual, M., Rodrigues, F. A., Villa, F., Araujo, A. G. D. 2011. Silicon sources in the micropropagation of the *Cattleya* group orchid. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33, 503-507.
- Soares, J. D. R., Pasqual, M., Araujo, A. G. D., Castro, E. M. D., Pereira, F. J., Braga, F. T. 2012. Leaf anatomy of orchids micropropagated with different silicon concentrations. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 34, 413-421.
- Zhou, T., 1995. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Annu. Bot.* 75, 605–607.