

Anatomia de Plantas de *Phyllanthus tenellus* Roxb. Cultivadas *In Vitro* sob Diferentes Qualidades de Luz

Cistiane Pimentel Victório¹, Eliana Schwartz Tavares² e Celso Luiz Salgueiro Lage³

Introdução

A pressão de fatores ambientais, como a qualidade de luz, seleciona características imprescindíveis para sobrevivência vegetal, que ao longo do seu ciclo de vida se mantém fixo ao substrato [1]. A exposição a fatores abióticos [2] pode modificar várias características estruturais das folhas, tais como: tamanho da lâmina foliar, densidade e distribuição dos estômatos na face abaxial e adaxial da folha, número e espessura das camadas da epiderme e do tecido parenquimático, estruturas de defesa mecânica – tricomas e espinhos e defensores químicos [3].

Em 1996, Campos [4] fez estudos anatômicos da espécie *Phyllanthus tenellus* Roxb. – Euphorbiaceae. Com base na descrição anatômica da planta de campo, este estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes espectros luminosos e ausência de luz, nas características estruturais da lâmina foliar de *P. tenellus* cultivado *in vitro*.

O presente estudo apresenta caráter inédito para os tratamentos com luz verde, amarela e radiação UV-A, sendo também importante para a avaliação dos outros espectro luminosos pouco estudados em relação a anatomia vegetal.

Material e Métodos

A. Caracterização morfo-anatômica

A planta-matriz da espécie *P. tenellus* utilizada para iniciar os experimentos foi devidamente identificada e incorporada ao Herbário do Museu Nacional do Rio de Janeiro (R) sob o número 200872.

A caracterização morfo-anatômica foi efetuada a partir das folhas do 3º nó, retiradas de indivíduos monoclonais cultivados *in vitro* por 60 dias, sob lâmpadas fluorescentes (Sylvania F20W T12) que proporcionavam intensidade luminosa de $23\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nas qualidades: branca (controle), verde, vermelha, amarela, azul e branca acrescida de ultravioleta A (UV-A) e condição de escuro. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

B. Microscopia óptica

Para observação da epiderme foliar em vista frontal, as folhas foram diafanizadas e coradas com safranina; depois, montadas em lâmina com glicerina 50%. Foi

utilizado o microscópio Carl Zeiss equipado com câmara clara.

Para o estudo das secções transversais, as folhas foram desidratadas e emblocadas com historesina básica (Leica Historesin), para posterior corte transversal com o micrótomo rotativo de Spencer, considerando o terço médio foliar e do pecíolo. Os cortes foram corados com azul de toluidina 0,05% e o material foi montado em lâmina com bálsamo-do-canadá natural para confecção de lâminas permanentes.

As fotografias foram obtidas utilizando máquina fotográfica acoplada ao microscópio óptico Carl Zeiss. Foi utilizado o filme Fuji Superia Asa 400.

As medidas anatômicas foram efetuadas utilizando o microscópio óptico Zeiss Axoskop 2, modelo DEI-750D, CE equipado com computador, vídeo e câmara fotográfica digital Optronics, programa Axion Vision 3.0. Para cada parâmetro foram feitas entre 26 e 32 mensurações. Foi avaliada a espessura da face adaxial da epiderme, incluindo a maior altura das papilas; do parênquima paliçádico e esponjoso.

C. Avaliação estatística

Os dados foram comparados pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas para dados com distribuição normal e desvios padrões significativamente semelhantes, considerando $P < 0,05$. Foi utilizado o programa Graph Pad InStat 3.0 para Windows®.

Resultados e Discussão

A. Descrição da Lâmina Foliar

Os cristais são estruturas comumente encontradas em diferentes tecidos e órgãos vegetais; a morfologia é variada e conservada conforme o grupo taxonômico, assim como a localização no vegetal [5].

Na face adaxial da epiderme são visualizados cristais de oxalato de cálcio do tipo prismático. A presença de cristais foi verificada em menor quantidade no tratamento com luz verde, luz amarela e luz branca acrescida de UV-A, ao contrário do tratamento com luz azul (Fig. 1).

Uma das funções dos cristais está relacionada à dissipação de energia luminosa em excesso, influenciando no processo fotossintético [6].

As modificações na espessura foliar estão relacionadas

1. Aluna de Doutorado do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Laboratório de Fisiologia Vegetal, Bloco G – Sala G2-050, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária - Ilha do Fundão, CEP: 21949-900 – Rio de Janeiro – R.J. E-mail: crisvp@biof.ufrj.br

2. Professor Adjunto do Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Laboratório de Anatomia Vegetal, Bloco G - Sala: A1-104, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária - Ilha do Fundão, CEP: 21949-900 – Rio de Janeiro – R.J.

3. Professor Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Laboratório de Fisiologia Vegetal, Bloco G - Sala: G2-050, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária - Ilha do Fundão, CEP: 21949-900 – Rio de Janeiro – R.J.

Apoio financeiro: CAPES, CNPq

com o número de camadas do tecido foliar, espessura da epiderme, hipoderme e parênquimas, altura das células do parênquima paliádico, entre outros [7]. A maior espessura da epiderme em sua face adaxial foi obtida com o tratamento sob luz vermelha que apresentou diferenças significativas quando comparada com a luz verde. A seguir vem o tratamento com luz branca acrescida de UV-A e luz azul que apresentaram epiderme espessa, mas sem diferir do controle (Tab. 1). Macedo [8] obteve o maior resultado, para o parâmetro espessura foliar, quando manteve as plantas sob luz verde, diferente do verificado neste trabalho. Os tecidos foliares quando alvos de irradiação podem sofrer modificações em suas estruturas que influenciam na penetração da radiação através das folhas [9]. O aumento da espessura da epiderme foliar é um destes mecanismos de proteção por reduzir a penetração da radiação nos tecidos sensíveis do mesofilo foliar [10,11].

Todos os parâmetros avaliados para condição de escuro foram significativamente inferiores em comparação com os tratamentos de luz (Tab. 1). Considerando que há uma redução luminosa em um ambiente de sombra, os resultados de diminuição da espessura foliar de plantas de *Physalis angulata*, obtidos por Vasconcellos [12], quando cultivadas em ambiente de sombra, da mesma forma que nas plantas de *P. tenellus* cultivadas na ausência de luz, em relação às plantas mantidas sob luz, aponta para um mecanismo de proteção foliar não necessário quando há redução ou ausência de luz [10].

As papilas são protuberâncias da parede acompanhada pelo protoplasto das células epidérmicas [4]. As papilas ocorrem nas espécies *P. tenellus*, *P. urinaria* e *P. amarus*, enquanto os tricomas já foram visualizados nas espécies *P. tenellus* e *P. urinaria*, sendo escassos e caducos. Karabourniotis & Bornman [13] verificaram que a presença de tricomas atenua a radiação incidente, nas faixas do azul, UV-A e UV-B, protegendo os tecidos foliares de plantas xerófitas. A atenuação provocada pelos tricomas é devido às propriedades de refletância e dispersão, principalmente em relação às faixas espectrais da radiação fotossintética (400-700 nm) [14]. Como analogia, as variações papilares podem indicar uma ação protetora, conforme a qualidade de luz incidente. A epiderme das folhas mantidas sob luz verde é bastante regular, apresentando poucas variações papilares, coincidindo com os menores valores para espessura da face adaxial da epiderme neste tratamento (Tab. 1), da mesma forma para o tratamento com luz azul. Para os tratamentos sob luz branca, vermelha e luz branca acrescida de UV-A, foi verificada maior variação papilar na face abaxial da epiderme. As folhas mantidas no escuro quase não apresentaram papilas.

O mesofilo é do tipo dorsiventral em secção transversal, composto pelo parênquima paliádico uniestratificado e pelo parênquima esponjoso constituído de dois estratos de células, disposição igual à planta *ex vitro* [4].

Alguns tratamentos luminosos não interferiram nos aspectos anatômicos, sendo o parâmetro parênquima paliádico o único no qual houve diferenças estatísticas significativas entre o controle e o tratamento sob luz azul

e luz branca acrescida de UV-A onde o tecido apresentou maior espessura. O aumento da espessura foliar devido à intensidade luminosa está muitas vezes relacionado ao grande desenvolvimento do paliádico [15].

Para espessura do parênquima esponjoso, foram obtidos os maiores valores para os tratamentos sob luz azul, luz branca acrescida de UV-A e controle (Tab. 1).

Os resultados para luz azul e luz branca acrescida de UV-A estão bastante próximos para todos os parâmetros avaliados (Tab. 1), podendo indicar que a percepção para estas qualidades de luz se dá através do mesmo cromóforo, como já citado [16,17].

Para o padrão anatômico, as plantas cultivadas *in vitro*, sob luz branca, apresentaram estrutura da epiderme e do parênquima foliar semelhantes às plantas *ex vitro* de *P. tenellus* descritas por Santiago *et al.* [18], mas não sendo verificada a presença de tricomas.

Referências

- [1] GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A. C. & BORIN, M.R. M.B. 1996. Biodiversidade: um enfoque químico biológico. Rio de Janeiro, Editora UFRJ. 268p.
- [2] GUTSCHICK, V.P. 1999. Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure. *New Phytologist*, 143(1): 3-18.
- [3] SAEBO, A.; KREKLING, T. & APPELGREN, M. 1995. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 41: 177-185.
- [4] CAMPOS, D.L. 1996. *Phyllanthus* L. (Euphorbiaceae) –Espécies e subespécies ruderais ocorrentes no município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 80p. Dissertação de Mestrado. Curso de pós-graduação em Ciências Biológicas – Botânica/ Museu Nacional.
- [5] NAKATA, P.A. 2003. Review: Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science*, 164: 901-909.
- [6] FRANCESCHI, V. 2001. Calcium oxalate in plants. *Trends in Plant Science*, 6(7): 331.
- [7] CHABOT, B.F. & CHABOT, J.F. 1977. Effects of light and temperature on leaf anatomy and photosynthesis in *Fragaria vesca*. *Oecologia*, 26(4): 363-377.
- [8] MACEDO, A. F. 2003. Estudo dos efeitos dos meios de cultura e diversas condições de iluminação nas características morfológicas, fitoquímicas e farmacológicas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze. Rio de Janeiro/Brasil. 230p. Tese de Doutorado - Programa de Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- [9] NAGEL, M.L.; BASSMAN, J.H.; EDWARDS, G.E.; ROBERECHT, R. & FRANCESCHI, V.R. 1998. Leaf anatomical changes in *Populus trichocarpa*, *Quercus rubra*, *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus ponderosa* exposed to enhanced ultraviolet-B radiation. *Physiologia Plantarum*, 104: 385-396.
- [10] DAY, T.A. 1993. Relating UV-B radiation screening effectiveness of foliage to absorbing-compound concentration and anatomical characteristics in a diverse group of plants. *Oecologia*, 95: 542-550.
- [11] SULLIVAN, J.H.; HOWELLS, B.W.; RUHLAND, C.T. & DAY, T.A. 1996. Changes in leaf expansion and epidermal screening effectiveness in *Liquidambar styraciflua* and *Pinus taeda* in response to UV-B radiation. *Physiologia Plantarum*, 98:349-357.
- [12] VASCONCELLOS, A.G.; GOMES, D.M. & ESQUIBEL, M.A. 1998. Anatomical plasticity of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) monoclonal plants in relation to light intensity. *Leandra*, 13: 17-27.
- [13] KARABOURNIOTIS, G. & BORNMAN, J.F. 1999. Penetration of UV-A, UV-B and blue light through the leaf trichome layers of two xeromorphic plants, olive and oak, measured by optical fiber microprobes. *Physiologia Plantarum*, 105(4): 655-661.
- [14] SKALTSA, H.; VERYKOKIDOU, E.; HARVALA, C.; KARABOURNIOTIS, G. & MANETAS, Y. 1994. UV-B

protective potential and flavonoid content of leaf hairs of *Quercus ilex*. *Phytochemistry*, 37(4): 987-990.

- [15] STRAUSS-DEBENEDETTI, S. & BERLYN, G.P. 1994. Leaf anatomical responses to light in five tropical Moraceae of different successional status. *American Journal of Botany*, 81(12): 1582-1591.
- [16] JENKINS, G.I.; CHRISTIE, J.M.; FUGLEVAND, G.; LONG, J.C. & JACKSON, J.A. 1995. Plant responses to UV and blue light: biochemical and genetic approaches. *Plant Science*, 112: 117-138.
- [17] DEVLIN, P.F. & KAY, S.A. 1999. Cryptochromes – bringing the blues to circadian rhythms. *Trends in Cell Biology*, 9: 295 – 298.
- [18] SANTIAGO, L.J.M.; LOURO, R.P. & OLIVEIRA, D.E. 2000. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate. *Annals of Botany*, 86: 1023-1032.

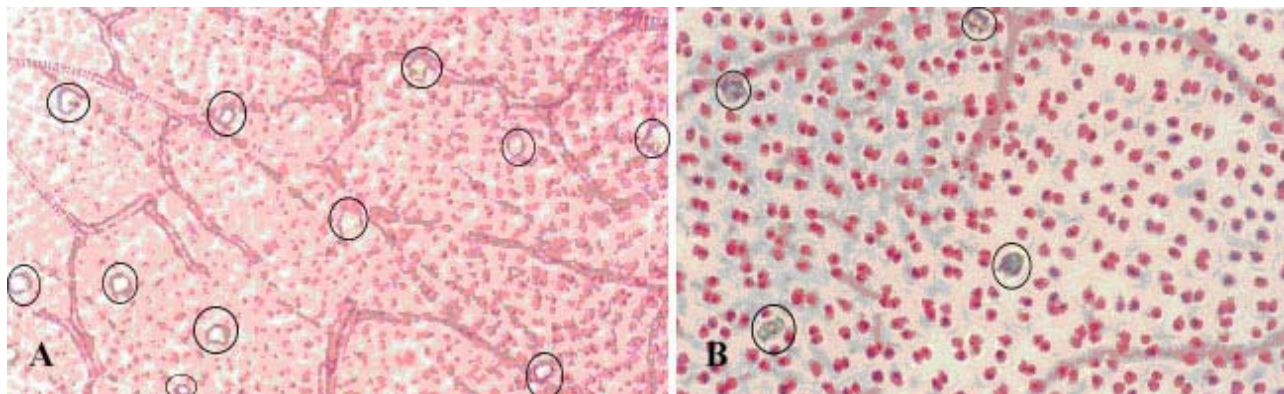


Figura 1. Folhas clarificadas de *P. tenellus*, detalhe para os cristais de oxalato de cálcio, tipo prismático, dispersos na face adaxial da epiderme: Fig. 1A, luz azul; Fig. 1B, luz amarela, menor quantidade de cristais. 400x.

Tabela 1. Espessura da face adaxial da epiderme, do parênquima paliçádico e esponjoso da folha, em secção transversal, em diferentes tratamentos de luz após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamento de luz	Espessura (µm)		
	Epiderme	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso
Branca	8,81±3,54 ^{ab}	19,13±5,70 ^a	29,19±4,63 ^a
Vermelha	10,66±4,58 ^a	20,52±3,10 ^{ac}	25,20±4,17 ^{bc}
Verde	7,28±2,21 ^b	18,74±2,97 ^a	22,45±3,03 ^b
Azul	8,83±2,24 ^{ab}	23,29±4,48 ^b	29,06±5,80 ^{ac}
Amarela	7,97±2,51 ^{ab}	18,92±3,96 ^a	24,25±4,60 ^b
Branca+UV-A	9,57±2,78 ^{ab}	22,50±3,30 ^{bc}	28,40±7,81 ^{ac}
Escuro	1,85±0,48 ^c	5,72±0,81 ^d	6,55±1,21 ^d

Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de $P < 0,05$, Teste de Tukey.