



RENATA ALVES LARA SILVA

**ESTRESSE SALINO *in vitro* E SILÍCIO NAS
CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE
PHYSALIS**

LAVRAS – MG

2015

RENATA ALVES LARA SILVA

**ESTRESSE SALINO *in vitro* E SILÍCIO NAS CARACTERÍSTICAS
FISIOLÓGICAS DE PHYSALIS**

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

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

Coorientadora

Dra. Joyce Dória Rodrigues Soares

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Renata Alves Lara.

Estresse salino *in vitro* e silício nas características
fisiológicas de *physalis* / Renata Alves Lara Silva. – Lavras :
UFLA, 2015.

143 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. Salinidade. 2. Elemento benéfico. 3. Fisiologia. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

RENATA ALVES LARA SILVA

**ESTRESSE SALINO *in vitro* E SILÍCIO NAS CARACTERÍSTICAS
FISIOLÓGICAS DE PHYSALIS**

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

APROVADA em 25 de fevereiro de 2015.

Dra. Leila Aparecida Salles Pio	UFLA
Dr. Rafael Hansen Madail	IFSULDEMINAS
Dr. Ângelo Albérico Alvarenga	EPAMIG
Dra. Cynthia de Oliveira	UFLA

Dr. Moacir Pasqual
Orientador

LAVRAS – MG

2015

*A Deus e Nossa Senhora
por sempre guiarem os meus passos*

OFEREÇO

*Aos meus pais, Carlos e Jane,
ao meu irmão Bruno e
ao Ramiro, meu amor,
por todo apoio, incentivo e amor e por sempre estarem ao meu lado.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e a **Nossa Senhora**, por me mostrarem que a fé está acima de tudo, pelas graças a mim concedidas e por permitirem que mais uma etapa pudesse ser concluída depois de tantos obstáculos.

À **Universidade Federal de Lavras**, em especial ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade de cursar a pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia.

Aos meus pais, **Carlos** e **Jane**, pelo amor e apoio constantes, por sempre torcerem e rezarem por mim e por me incentivarem em todos os momentos tornando minha caminhada mais leve.

Ao **Ramiro**, meu amor, por todo seu amor, apoio e carinho e por ser meu amigo e confidente com quem sempre posso contar.

Ao professor **Moacir Pasqual**, pela orientação, apoio e amizade, por, desde o início, ter depositado sua confiança em mim e por ter me incluído em sua equipe de trabalho, da qual me orgulho muito.

Ao **CNPq**, pela concessão da bolsa de estudos.

A **Joyce Dória Rodrigues Soares**, pela coorientação e por ser uma amiga tão especial com quem sempre pude contar e por ter participado da condução e análise dos experimentos com todo seu conhecimento.

Ao **Filipe Almendagna Rodrigues**, por ser um grande amigo e por toda disposição em me ajudar, especialmente na condução do experimento em casa de vegetação.

Ao **Edwaldo dos Santos Penoni**, pela amizade, incentivo e por todo auxílio no experimento na casa de vegetação.

A **Helôisa Santos Oliveira**, pelo seu bom humor e por toda disposição e imensa ajuda no Laboratório de Eletroforese da UFLA.

A **Simone Abreu Asmar**, por ser uma amiga tão generosa e pela sua atenção e preocupação comigo.

Aos membros da banca, **Rafael Hansen Madail**, **Leila Aparecida Salles Pio**, **Ângelo Albérico Alvarenga** e **Cynthia de Oliveira**, que gentilmente aceitaram participar da avaliação deste trabalho.

Aos amigos **Vantuil Rodrigues** e **Antônio Claret**, pelo auxílio constante, pelo incentivo e por sempre me proporcionarem boas risadas.

A todos os queridos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, pela amizade e ótimo convívio.

Ao professor **Paulo César Lima**, ao **Rafael Lemos Bastos** e ao **Ben Deivide de Oliveira Batista**, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À professora **Maria Lígia de Souza Silva** e ao **Anderson Ricardo Trevisam**, por todo auxílio e disposição a mim concedidos para realização das análises no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas da UFLA.

Ao professor **Roberto Alves Braga Júnior**, por ter me recebido tão bem e por permitir a utilização do Laboratório de Óptica do Departamento de Engenharia, além de contribuir com todo seu conhecimento na análise dos dados do Biospeckle *laser*.

Ao **Renan Oliveira Reis**, pela paciência e auxílio no Laboratório de Óptica e a **Gabriela Breder Sathler Soares**, pela imensa ajuda no processamento de imagens do Biospeckle *laser*.

A todos os amigos da Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, pelas aulas compartilhadas e pela amizade.

Aos meus familiares, em especial ao meu irmão **Bruno** e meu avô **José**, que sempre torceram pela realização de mais esta etapa.

À secretária da Fitotecnia, **Marli dos Santos Túlio**, pela atenção.

Às funcionárias **Karine Luiz**, **Luciana Martins** e **Arlete Viana**, pela amizade.

Às queridas amigas, **Paulyene Nogueira, Thaiana Sousa e Natálie Alves**, pelo companheirismo diário.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”*

(Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito do estresse salino induzido por NaCl *in vitro* e da aplicação de silício (Si) como elemento atenuador do estresse sobre as características fisiológicas de *physalis*, bem como avaliar o efeito da aplicação de Si em *physalis* cultivada em casa de vegetação. Os trabalhos em condições *in vitro* iniciaram-se com um estudo preliminar da sensibilidade de *physalis* à salinidade e para isso dois tipos de explantes (segmentos nodais e plântulas oriundas de sementes) foram inoculados em meio MS com concentrações crescentes de NaCl (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%). Após 30 dias, foram avaliados o crescimento e a expressão da esterase das plantas. Deu-se continuidade ao trabalho de estresse salino, porém com adição de Si ao meio de cultura. Para isso, apenas segmentos nodais foram inoculados em meio MS salino (0,5 e 1,0% de NaCl) com diferentes concentrações de ácido silícico (0; 0,5 e 1,0 g L⁻¹). Crescimento, teor de pigmentos fotossintéticos, trocas gasosas, extravasamento de eletrólitos, anatomia foliar, expressão isoenzimática, teores de prolina e de CO₂ e atividade biológica foram avaliados após 30 dias. No estudo preliminar, o número de gemas e o comprimento da parte aérea diminuíram e a enzima esterase teve maior expressão com o aumento da concentração de NaCl. Verificou-se que todas as variáveis de crescimento e os teores de pigmentos fotossintéticos, bem como fotossíntese e extravasamento de eletrólitos foram prejudicados com aumento do nível salino. O conteúdo de DNA não foi afetado por nenhum dos fatores. Verificou-se redução da densidade estomática e maior espessamento do limbo com aumento da concentração de NaCl. Todas as enzimas tenderam a aumentar sua expressão com o aumento da concentração de sal. Os teores de prolina e de CO₂ aumentaram e a atividade biológica foliar foi maior com a elevação da concentração de sal. O Si mostrou-se significativamente eficaz apenas na mitigação dos danos aos pigmentos e às variáveis anatômicas, bem como nas enzimas superóxido dismutase, esterase e malato desidrogenase e na taxa respiratória. Para realização do estudo em casa de vegetação, realizou-se aplicação de ácido silícico (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g kg substrato⁻¹) via *drench* e após 60 dias procedeu-se às avaliações de quantidade de Si foliar, estimativa do teor de clorofila via índice SPAD, trocas gasosas, teor de lignina e expressão da enzima polifenoloxidase. A aplicação de diferentes doses de Si não influenciou no teor de Si foliar, porém verificou-se maior teor do elemento nas folhas velhas. Como consequência, as características fisiológicas avaliadas não sofreram nenhum efeito. A *physalis* apresenta comportamento de planta não acumuladora de Si.

Palavras-chave: Salinidade. Cloreto de sódio. Ácido silícico. Elemento benéfico. Fisiologia.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the effect of salt stress NaCl-induced and silicon (Si) application as mitigating element of stress on the physiological characteristics of *Physalis*. Furthermore, we also evaluated the effect of Si in *Physalis* grown in greenhouse. Studies carried out on *in vitro* conditions began with a preliminary study about the sensitivity of *Physalis* to salinity and thus, two types of explants were cultured on MS medium with increasing concentrations of NaCl (0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0%). After 30 days, we evaluated growth and esterase expression of plants. We continued with salt stress studies, but with Si on culture medium. For this, nodal segments were inoculated in MS medium with salt (0.5 and 1.0% NaCl) with different Si concentrations (0, 0.5 and 1.0 g L⁻¹). Growth, photosynthetic pigments content, gas exchange, electrolyte leakage, leaf anatomy, isozyme expression, proline content, CO₂ content and biological activity were evaluated after 30 days. In the preliminary study, it was observed that the number of buds and shoot length decreased and esterase enzyme increased its expression with increasing NaCl concentration. All growth variables and the contents of photosynthetic pigments as well as photosynthesis and electrolyte leakage were impaired with increased salt level. The DNA content was not affected by any of the factors. There was a reduction in stomatal density and greater thickness of the leaf blade with increase of NaCl percentage. All enzymes tended to increase its expression with increasing salt concentration. The proline and CO₂ levels increased and biological activity of the leaves was higher with increase in salt concentration. The Si was significantly effective only in mitigating the damage to pigments and anatomical variables, as well as in superoxide dismutase, esterase and malate dehydrogenase enzymes and respiratory rate (CO₂ content). To conduct the study in the greenhouse, we carried out the application of Si (0.0, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 g kg substrate⁻¹) and after 60 days we evaluated the amount leaf Si, estimation of chlorophyll content via SPAD index, gas exchange, lignin content and expression of polyphenoloxidase. The results of greenhouse experiment showed that the application of different Si doses did not affect the leaf Si content, but there was a higher content of element in the old leaves. Consequently, the measured physiological characteristics suffered no effect. *Physalis* presents a Si non-accumulator species behavior.

Keywords: Salinity. Sodium chloride. Silicic acid. Beneficial element. Physiology.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Número de gemas formadas e comprimento da parte aérea de plantas de *physalis* cultivadas *in vitro* sob condições de salinidade crescente. PS, SN: plântula oriunda de semente e segmento nodal, respectivamente.....55
- Figura 2 Plantas de *physalis* cultivadas *in vitro* na presença de NaCl. Comportamento das plântulas oriundas de semente (A) e oriundas de segmentos nodais (B) após 30 dias de exposição a concentrações crescentes de NaCl. Sintomas de toxidez por NaCl nas folhas de *physalis* (C)56
- Figura 3 Padrão isoenzimático de plantas de *physalis* cultivadas *in vitro* em diferentes níveis de salinidade, revelados para a enzima esterase (EST). Esquerda: plantas oriundas de segmentos nodais; Direita: plantas oriundas de sementes.....59
- Figura 4 Sintomas de toxidez verificados nas folhas de *physalis* cultivada em meio salino em ambas as concentrações de NaCl (A e B).....64
- Figura 5 Número de gemas formadas em plantas de *physalis* cultivadas *in vitro* em relação às concentrações crescentes de Si65
- Figura 6 Conteúdos de clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenoides de folhas de *physalis* cultivada *in vitro* com diferentes combinações de NaCl (0,5% e 1,0%) e silício (0; 0,5 e 1,0 g L⁻¹) 70
- Figura 7 Taxa fotossintética (A) de plantas de *physalis* cultivadas *in vitro* em relação às concentrações crescentes de Si.....72

- Figura 8 Densidade estomática da face abaxial de folhas de *physalis* cultivada *in vitro* com diferentes combinações de NaCl (0,5% e 1,0%) e silício (0; 0,5 e 1,0 g L⁻¹). **A:** controle; **B:** 0,5% NaCl + 0,0 g L⁻¹ Si; **C:** 0,5% NaCl + 0,5 g L⁻¹ Si; **D:** 0,5% NaCl + 1,0 g L⁻¹ Si; **E:** 1,0% NaCl + 0,0 g L⁻¹ Si; **F:** 1,0% NaCl + 0,5 g L⁻¹ Si; **G:** 1,0% NaCl + 1,0 g L⁻¹ Si. Barra = 25 µm 78
- Figura 9 Histogramas gerados a partir da análise de folhas de plantas de *physalis* cultivadas em meio com diferentes combinações de NaCl e Si. (A) Controle; (B) Tratamento com 0,5% de NaCl; (C) Tratamento com 1,0% de NaCl. Picos nas cores branca e preta pertencem ao padrão de referência (tomateiro) e ao *physalis*, respectivamente..... 83

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Padrões isoenzimáticos de plantas de *physalis* cultivadas *in vitro* em condições de salinidade e suplementação com Si, revelados para as isoenzimas superóxido dismutase – SOD (A), catalase – CAT (B) e peroxidase – POD (C)..... 101
- Figura 2 Padrões isoenzimáticos de plantas de *physalis* cultivadas *in vitro* em condições de salinidade e suplementação com Si, revelados para as isoenzimas esterase – EST (A) e malato desidrogenase – MDH (B)..... 104
- Figura 3 Teor de prolina de folhas de *physalis* cultivada *in vitro* com diferentes combinações de NaCl (0,5% e 1,0%) e silício (0; 0,5 e 1,0 g L⁻¹) 107
- Figura 4 Teor de CO₂ em folhas de *physalis* cultivada *in vitro* com diferentes combinações de NaCl (0,5% e 1,0%) e silício (0; 0,5 e 1,0 g L⁻¹) 110

Figura 5	Atividade biológica em folhas de <i>physalis</i> cultivada <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de silício	113
Figura 6	Imagens geradas a partir da iluminação com o biospeckle <i>laser</i> de folhas de plantas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> em meio salino com adição de silício. A: controle; B: 0,5% NaCl + 0,0 g L ⁻¹ Si; C: 0,5% NaCl + 0,5 g L ⁻¹ Si; D: 0,5% NaCl + 1,0 g L ⁻¹ Si; E: 1,0% NaCl + 0,0 g L ⁻¹ Si; F: 1,0% NaCl + 0,5 g L ⁻¹ Si; G: 1,0% NaCl + 1,0 g L ⁻¹ Si. A barra colorida representa a escala da atividade biológica, em que as cores que tendem para o azul indicam baixa atividade (B), enquanto as que tendem para o vermelho indicam alta atividade (A)	114

CAPÍTULO 4

Figura 1	Início do experimento com realização da semeadura em tubetes (a), crescimento das mudas (b) e instalação do experimento em casa de vegetação (c-d). Aspecto das plantas no momento da aplicação de Si (e) e 60 dias após (f). Lavras, 2014.....	127
Figura 2	As três regiões de coleta (apical, mediana e basal) das folhas de <i>physalis</i> para quantificação de Si e análises fisiológicas em função de doses crescentes de ácido silícico. Lavras, 2014	128
Figura 3	Estimativa do teor de clorofila pelo índice SPAD em folhas de <i>physalis</i> coletadas em três posições na planta (apical, mediana e basal), aos 60 dias, em função das doses de ácido silícico (0 - 4). Lavras, 2014.....	133
Figura 4	Fotossíntese (A), transpiração (E), condutância estomática (gs) e conteúdo de carbono interno (C _i) em folhas de <i>physalis</i> coletadas em três posições na planta (A – apical, M – mediana	

	e B – basal), aos 60 dias, em função das doses de ácido silícico (0 -4). Lavras, 2014.....	134
Figura 5	Teor de lignina em folhas de physalis coletadas em três posições na planta (apical, mediana e basal), aos 60 dias, em função das doses de ácido silícico (0 - 4). Lavras, 2014	135
Figura 6	Padrões de expressão da enzima polifenoloxidase (PPO) de folhas de physalis coletadas em três posições na planta (apical, mediana e basal), aos 60 dias, em função das doses de ácido silícico (0 - 4). Lavras, 2014.....	137

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Significância do teste F em relação aos fatores (NaCl e Si) e à interação (NaCl x Si) para todas as variáveis avaliadas	61
Tabela 2	Efeito da salinidade nas características fitotécnicas de plantas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i>	63
Tabela 3	Efeito da salinidade nas características fitotécnicas de plantas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> , em relação ao controle	63
Tabela 4	Conteúdos de pigmentos fotossintéticos de folhas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> com diferentes combinações de NaCl e silício (Si), dentro de cada nível de Si.....	68
Tabela 5	Conteúdo de pigmentos fotossintéticos em folhas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> com diferentes combinações de NaCl e silício (Si), em relação ao tratamento controle.....	69
Tabela 6	Efeito da salinidade nas trocas gasosas de plantas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> em meio salino.....	71
Tabela 7	Efeito da salinidade nas trocas gasosas de plantas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> , em relação ao controle.....	72
Tabela 8	Efeito da salinidade na condutividade elétrica e extravasamento de eletrólitos de folhas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i>	74
Tabela 9	Efeito da salinidade na condutividade elétrica e extravasamento de eletrólitos de folhas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> , em relação ao controle.....	75
Tabela 10	Densidade estomática da face abaxial e espessura do limbo foliar de plantas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> com diferentes combinações de NaCl e silício (Si)	76

Tabela 11	Densidade estomática e espessura do limbo foliar em folhas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> sob estresse salino e presença de silício, em relação ao controle.....	77
Tabela 12	Relação diâmetro polar/diâmetro equatorial (DP/DE) dos estômatos da face abaxial de folhas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> na presença de NaCl ou na de silício (Si)	79
Tabela 13	Relação diâmetro polar/diâmetro equatorial (DP/DE) dos estômatos da face abaxial de folhas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> na presença de NaCl ou na de silício (Si), em relação ao controle.....	80
Tabela 14	Conteúdo de DNA e coeficiente de variação de folhas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> na presença de NaCl ou na de silício (Si).....	82
Tabela 15	Conteúdo de DNA e coeficiente de variação da análise citométrica de folhas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> na presença de NaCl ou na de silício, em relação ao controle	82

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Conteúdo de prolina ($\mu\text{mol g de peso fresco}^{-1}$) e de CO_2 ($\% \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em <i>physalis</i> cultivada <i>in vitro</i> em meio salino (0,5 e 1,0% de NaCl) adicionado de silício (Si) (0; 0,5 e 1,0 g L^{-1}), dentro de cada nível de Si, e significância do teste F	106
Tabela 2	Conteúdos de prolina ($\mu\text{mol g de peso fresco}^{-1}$) e de CO_2 ($\% \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em <i>physalis</i> cultivada <i>in vitro</i> sob estresse salino e presença de silício (Si), em relação ao tratamento controle	108
Tabela 3	Atividade biológica (AB) em folhas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> em meio salino (0,5 e 1,0% de NaCl), e significância do teste F	111

Tabela 4	Atividade biológica (AB) em folhas de <i>physalis</i> cultivadas <i>in vitro</i> em meio salino (0,5 e 1,0% de NaCl) em relação ao tratamento controle.....	112
----------	---	-----

CAPÍTULO 4

Tabela 1	Teores de silício em folhas coletadas de três posições diferentes na planta de <i>physalis</i> em função de doses crescentes de ácido silícico. Lavras, 2014	131
----------	--	-----

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral	20
1	INTRODUÇÃO	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1	Gênero <i>Physalis</i>	24
2.2	<i>Physalis peruviana</i> Linnaeu	25
2.3	Salinização	27
2.3.1	Plantas halófitas e glicófitas	28
2.3.2	Efeito do estresse salino nas plantas	30
2.3.3	Estudo do estresse salino em condições artificiais	31
2.4	Silício	32
2.4.1	Absorção, transporte e redistribuição	32
2.4.2	Silício como elemento benéfico	34
2.4.3	Silício no combate ao estresse salino	35
	REFERÊNCIAS	37
	CAPÍTULO 2 Efeito do estresse salino induzido <i>in vitro</i> e da utilização de silício nas características fisiológicas e anatômicas de <i>physalis</i>	45
1	INTRODUÇÃO	47
2	MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1	Material vegetal e condições iniciais de cultivo	49
2.2	Experimento 1: Sensibilidade de <i>physalis</i> ao estresse salino <i>in vitro</i> induzido por NaCl	49
2.3	Experimento 2: Efeito do estresse salino induzido por NaCl e da utilização de silício em <i>physalis</i> cultivada <i>in vitro</i>	51
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1	Estudo preliminar da <i>physalis</i> cultivada em meio salino	55
3.2	Efeito do estresse salino e da utilização de silício nas características fisiológicas de <i>physalis</i>	60
3.2.1	Análise fitotécnica	62
3.2.2	Pigmentos fotossintéticos	67
3.2.3	Trocas gasosas	71
3.2.4	Extravasamento de eletrólitos	73
3.2.5	Anatomia foliar	75
3.2.6	Quantificação de DNA	81
4	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS	85
	CAPÍTULO 3 Expressão enzimática, teores de prolina e de CO ₂ e atividade biológica de <i>physalis</i> cultivada <i>in vitro</i> sob estresse salino e suplementação com silício	93

1	INTRODUÇÃO	95
2	MATERIAL E MÉTODOS	97
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
4	CONCLUSÕES	115
	REFERÊNCIAS	116
	CAPÍTULO 4 Efeito da utilização de silício nas características fisiológicas de physalis cultivada em casa de vegetação	122
1	INTRODUÇÃO	124
2	MATERIAL E MÉTODOS	126
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	131
4	CONCLUSÕES	139
	REFERÊNCIAS	140

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

Physalis peruviana Linnaeu, popularmente conhecida como physalis, joá ou cape gooseberry, é uma espécie pertencente à família Solanaceae e originária das Américas do Sul e Central. Possui porte herbáceo e frutos de pequeno calibre muito apreciados pelo consumidor devido ao seu sabor agradável e à sua aparência diferenciada uma vez que ficam alojados dentro do cálice remanescente (PUENTE et al., 2011). A physalis tem sido foco de muitos estudos por apresentar frutos ricos em sua composição nutricional, com teores expressivos de vitaminas, minerais e compostos bioativos como fisalinas e vitanolídeos. Esses últimos, a propósito, têm merecido destaque na pesquisa científica uma vez que mostram evidências de que sejam moléculas com potencial para serem utilizadas no combate a diversas doenças, entre elas o câncer (YEN et al., 2010).

No Brasil, a physalis é popular nas regiões Norte e Nordeste, com aumento de seu consumo sendo observado também no Sul e Sudeste (CHAVES, 2006). O cultivo dessa frutífera é uma alternativa de exploração agrícola, com boas perspectivas de comercialização devido ao elevado conteúdo nutracêutico e por apresentar baixo custo de implantação e produção, bom retorno econômico em curto prazo, boa adaptação edafoclimática e grande exigência de mão de obra contribuindo para geração de empregos (MUNIZ et al., 2011; VELASQUEZ; GIRALDO; ARANGO, 2007). Entretanto, a physalis ainda é pouco explorada no país devido ao efeito da sazonalidade da produção, ao pouco hábito do brasileiro em consumir pequenos frutos e à escassez de resultados de pesquisa colocados à disposição do agricultor (MUNIZ et al., 2012). Tudo isso colabora para que a produção comercial de physalis no Brasil seja dificultada

fazendo com que boa parte dos frutos comercializados sejam importados de países produtores, a exemplo da Colômbia.

A Colômbia é considerada o maior produtor mundial de physalis. Em 2011, o cultivo dessa espécie ocorreu em mais de 700 ha nesse país, chegando a uma produção de 11 mil toneladas (AGRONET, 2014). Em decorrência disso, a physalis tornou-se a segunda fruta mais exportada pela Colômbia, país que possui uma área de 600 mil ha afetada pela salinidade que é considerada um dos estresses ambientais mais graves (MIRANDA et al., 2014).

A physalis é considerada uma espécie que não possui tolerância à salinidade, assim como a grande maioria das plantas hortícolas. O estresse salino é considerado uma das principais ameaças ambientais à agricultura devido aos efeitos drásticos que pode causar nas plantas, podendo levá-las até mesmo à morte. Aproximadamente 30 milhões de ha do planeta são afetados pela salinidade e a área salinizada continua aumentando em função de sistemas de irrigação e desmatamento (WILLADINO; CAMARA, 2010). A absorção desordenada de íons Na^+ , considerados tóxicos para as plantas em quantidades elevadas, pode causar disfunções na membrana, alterações da homeostase intracelular, inibição do crescimento, injúrias nos tecidos e modificações nas rotas metabólicas. É naturalmente inerente às plantas responderem a qualquer tipo de estresse, seja ele biótico ou abiótico. No caso do estresse salino, as plantas mostram respostas das mais variadas para tentar se desvencilhar da condição salina a que estão expostas (DIAS; BLANCO, 2010). Nesse cenário, destaca-se a importância de estudos que elucidem as respostas morfológicas, fisiológicas e moleculares do vegetal, responsáveis pela adaptação aos estresses ambientais.

É nesse contexto, que são propostos os trabalhos visando estudar os efeitos danosos do estresse salino. Grande parte desses trabalhos é normalmente conduzida em condições hidropônicas ou em solo, mas na literatura é proposto

que ensaios sobre estresses ambientais também possam e devam ser realizados *in vitro* devido às vantagens que essa técnica proporciona. O estudo do estresse salino em condições artificiais é frequentemente utilizado para representar as diferentes condições de campo nas quais as plantas são acometidas por estresses. Muito do que se sabe atualmente sobre tolerância das plantas à salinidade é graças a esses tipos de trabalhos conduzidos *in vitro* (CLAYES et al., 2014).

Crescimento reduzido, alterações enzimáticas e produção de osmólitos são exemplos de alguns artifícios que os vegetais utilizam para se manterem íntegros (PARIDA; DAS, 2005). Porém, na maioria das vezes, a planta não consegue mais apresentar crescimento e desenvolvimento normais nas situações de estresse. Para tentar controlar essa situação, muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de encontrar novas formas de fazer com que a planta consiga tolerar a condição salina. Uma das alternativas que já foi proposta na comunidade científica é a adoção da adubação silicatada. O silício (Si) não faz parte do grupo dos elementos essenciais às plantas, mas é considerado benéfico por favorecer várias características de interesse (MA; MIYAKE; TAKAHASHI, 2001). Além de estimular e melhorar o crescimento vegetal, o Si também mostra atividade contra estresses abióticos. Na literatura, existem muitos trabalhos que relatam a eficácia do Si em mitigar os efeitos estressantes da salinidade (ZHU; GONG, 2014). O Si também mostra ser benéfico no sentido de melhorar a estrutura da planta, aumentar as taxas de trocas gasosas e contribuir para a rigidez foliar (EPSTEIN, 2001).

Em razão de todos os problemas mencionados e levando-se em conta o contexto em que estão inseridas todas essas informações, objetivou-se com a realização deste trabalho, avaliar os efeitos do estresse salino induzido *in vitro* sobre diferentes características morfofisiológicas da *physalis* e verificar se a adição de Si pode ser considerada uma ferramenta importante no combate à

salinidade, bem como na melhoria de características fisiológicas de physalis cultivada em casa de vegetação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero *Physalis*

O gênero *Physalis*, pertencente à família Solanaceae, abrange aproximadamente 100 espécies, entre plantas herbáceas perenes e anuais, dentre as quais muitas são comestíveis e cultivadas, outras silvestres e pouco conhecidas (PALOMINO, 2010). As espécies mais conhecidas são: *P. alkekengi*, *P. ixocarpa*, *P. peruviana*, *P. angulata*, *P. minima*, *P. floridana*, *P. viscosa*, *P. pubescens*, *P. pruinosa*, *P. philadelphica* e *P. neesiana*. Destas, muitas são utilizadas com fins de ornamentação enquanto outras são exploradas comercialmente por serem comestíveis. A espécie *P. peruviana* é a única comercializada com fins econômicos devido à grande palatabilidade de seus frutos e à aceitação pelos consumidores (RUFATO et al., 2012).

Com exceção de *P. alkekengi* L. que é euroasiática, todas as demais espécies são americanas (HUNZIKER, 2001). O centro de diversidade da espécie *P. ixocarpa* L. se encontra no México, sendo que existem dois terços de espécies do gênero *Physalis* que são endêmicas. Na América do Sul, ocorrem cerca de 12 espécies (HUNZIKER, 2001; SOARES et al., 2009).

A etimologia do seu nome vem do grego e faz referência ao cálice inflado que envolve o fruto, em que “physis” significa bexiga ou bolha, característica facilmente notada nas espécies do gênero (RUFATO et al., 2012). No início da frutificação, o cálice possui cor verde e com o amadurecimento dos frutos torna-se de cor palha devido à desidratação dos tecidos e à remobilização de nitrogênio da clorofila para enzimas envolvidas na maturação. Os frutos são pequenos e esféricos, assemelhando-se a mini tomates, e possuem cores que variam com a espécie, podendo ser desde o amarelo-claro ao alaranjado intenso como é o caso de *P. alkekengi* (RUFATO et al., 2008).

A physalis está inserida no chamado grupo das pequenas frutas, juntamente com mirtilo, framboesa, amora-preta e morango (CHAVES; SCHUCH; ERIG, 2005). Tais frutas são mundialmente conhecidas pelo seu alto teor de compostos antioxidantes, fazendo que seu consumo seja estimulado. Nos últimos anos, grande atenção tem sido dada à physalis, devido às descobertas que vêm sendo obtidas na área farmacológica. Diversos estudos apontam que, nas plantas de *Physalis* sp., é encontrado um dos principais grupos de vitaesteroides, as chamadas fisalinas, além de muitos vitanolídeos, todos considerados compostos bioativos antitumorais e com ações anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante (AL-OLAYAN et al., 2014; HELVACI et al., 2010; TAKIMOTO et al., 2014; TORABZADEH; PANAH, 2013; YEN et al., 2010).

2.2 *Physalis peruviana* Linnaeu

A espécie *Physalis peruviana* L. é considerada a mais importante economicamente dentre àquelas constituintes do gênero *Physalis*, sendo originária das regiões Amazônica e Andina (PUENTE et al., 2011). É uma planta herbácea, semiarbastiva, de hábito decumbente, com ramificações densas e é perene nas zonas subtropicais (GONÇALVES et al., 2012).

Seu fruto é uma baga carnosa arredondada, com diâmetro que varia entre 1,25 e 2,5 cm e massa entre 4 a 10 g, envolto por um cálice de coloração inicialmente verde, que seca gradativamente, adquirindo tonalidade amarelada à medida que o fruto amadurece. O fruto é muito apreciado pela população devido ao seu sabor doce levemente acidulado e é normalmente consumido na forma *in natura*, podendo também ser aproveitado na forma de molhos, sucos, doces e geleias (GARCÍA; RODRÍGUEZ; MORALES, 2012). Apresenta conteúdos

elevados de vitaminas A, C e do complexo B, além de expressivos teores de ferro e fósforo (PUENTE et al., 2011).

A *physalis* pode ser propagada por sementes, estacas ou micropropagação (CHAVES; SCHUCH; ERIG, 2005). Apesar da propagação por sementes ser considerada fácil e rápida, a micropropagação merece destaque, pois sua utilização está associada aos metabólitos secundários que essa espécie produz. Pelo fato de apresentar propósitos medicinais, a *physalis* tem recebido grande enfoque de instituições de pesquisa e indústrias farmacêuticas. É nesse contexto, que as ferramentas biotecnológicas têm se destacado, pois desempenham papel importante na propagação rápida, conservação e incremento da produção de metabólitos das rotas secundárias (RAMAR; AYYADURAI; ARULPRAKASH, 2014). Segundo Rao e Ravishankar (2002), esses compostos podem ser produzidos *in vitro* e até de forma mais rápida, uma vez que o ciclo de crescimento nas condições artificiais é mais curto.

O maior produtor mundial de *physalis* é a Colômbia, seguido por Quênia, Zimbábue, Austrália, Nova Zelândia, Índia e Equador. No ano de 2011, a Colômbia utilizou mais de 700 ha de sua área agrícola com o cultivo da *physalis* (localmente conhecida como 'uchuva'), chegando a uma produção de quase 11 mil t, com produtividade média de 14,5 t ha⁻¹ (FISCHER; ALMANZA-MERCHÁN; MIRANDA, 2014).

No Brasil, a exploração de *physalis* vem aumentando e produções de 2 a 3 t ano⁻¹ de fruto já foram relatadas, com comercialização sendo realizada em grandes mercados com preço do quilo de fruto variando de R\$30,00 a R\$50,00 (FISCHER; ALMANZA-MERCHÁN; MIRANDA, 2014).

2.3 Salinização

A salinização é o processo que conduz ao aumento da concentração de sais solúveis na solução do solo para níveis prejudiciais ao desenvolvimento vegetal (IANNETTA; COLONNA, 2015).

Este fenômeno pode ter origem natural ou induzida. A natural, também chamada de salinização primária, está associada à ocorrência de poucas chuvas, elevada evaporação, acúmulo gradual de íons oriundos do intemperismo de rochas e presença de toalhas de água de origem marinha (GHEYI; DIAS; LACERDA, 2010). A origem induzida ou secundária está relacionada à ação antrópica decorrente principalmente do manejo inadequado da irrigação e adubação (ESTEVES; SUZUKI, 2008). Segundo Batista et al. (2002), todo solo situado em regiões climáticas caracterizadas por baixas precipitações e altos défices hídricos climáticos e que, seja mal drenado, com o tempo tende a se tornar salino com a irrigação, mesmo que esta seja feita com água de boa qualidade.

Estima-se que aproximadamente 20% das terras aráveis em todo o mundo sejam afetadas pela salinização (RASOOL et al., 2013). Esse processo é particularmente evidente nas regiões áridas e semiáridas. No Brasil, embora a informação sobre as áreas salinas não esteja bem definida, estima-se que 20 a 25% das áreas irrigadas enfrentem essa limitação (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2006). Este problema é notável na região Nordeste, que possui área de 155 milhões de hectares, sendo que 52% dessa superfície são semiáridas. Nessa região, o clima quente da região causa forte evaporação que retira água do subsolo, a qual possui salinidade elevada, levando os sais até a superfície, próximo ao sistema radicular das plantas (OLIVEIRA; GOMES-FILHO; ENÉAS-FILHO, 2010).

Em ambientes protegidos, a salinização está fortemente relacionada à prática da fertirrigação, que quando executada de forma incorreta causa diversos transtornos, uma vez que as plantas em ambientes protegidos não possuem sistemas de drenagem eficientes e não sofrem lixiviação de sais para camadas mais profundas por não haver precipitações elevadas. Essa situação faz com que os solos se comportem de maneira semelhante às condições semiáridas apresentando elevação da salinidade em menor tempo (DIAS et al., 2005).

A salinização dos solos além de contribuir para redução da área arável, uma vez que o solo fica inutilizado para cultivos agrícolas, também prejudica o crescimento e desenvolvimento das plantas em situações onde ainda se faz o cultivo (OLIVEIRA; GOMES-FILHO; ENÉAS-FILHO, 2010).

2.3.1 Plantas halófitas e glicófitas

Os efeitos deletérios da elevada salinidade podem ser observados ao nível da planta como um todo. Muitas plantas desenvolvem mecanismos de resposta para excluir os sais do ambiente celular ou para tolerar sua presença (PARIDA; DAS, 2005).

Existem dois tipos de plantas no que diz respeito à tolerância à salinidade: as halófitas e as glicófitas. As halófitas são aquelas capazes de se desenvolver naturalmente em ambientes com elevadas concentrações de sais, através de mecanismos de exclusão de Na^+ e Cl^- em glândulas secretoras e tricomas vesiculares e abscisão de folhas velhas que acumularam sais (WILLADINO; CAMARA, 2010). Já as glicófitas são as plantas que não conseguem completar seu ciclo de vida em condições salinas, constituindo-se na maioria das plantas cultivadas.

A tolerância à salinidade é uma característica poligênica e por isso as vias bioquímicas que levam aos processos de tolerância estão propensas a

agirem de forma aditiva e sinérgica. Logo, a vantagem das halófitas sobre as glicófitas reside no fato de que as primeiras desempenham mecanismos bioquímicos de forma mais eficiente. Em condições salinas, as halófitas possuem maior eficiência do uso da água, baixa concentração interna de CO_2 , acúmulo eficiente de solutos e baixo nível de Na^+ e Cl^- no citoplasma e cloroplastos, enquanto que as glicófitas comportam-se de forma comparativamente menos eficiente (PARIDA; DAS, 2005).

A partir do momento que a homeostase hídrica/iônica é quebrada, danos moleculares, inibição do crescimento ou mesmo a morte da planta podem ocorrer. Para tolerar a salinidade, alguns aspectos importantes do metabolismo devem estar relacionados, pois levam a planta a evitar ou mitigar os danos (WILLADINO; CAMARA, 2010; ZHU, 2001). A tolerância nas glicófitas depende da seletividade no processo de absorção pelas células radiculares, do carregamento do xilema, preferencialmente com K^+ (em detrimento de Na^+) e da remoção do sal do xilema na parte superior de raízes, caule e folhas. Esses mecanismos dependem da espécie e/ou cultivar, ocorrendo em diferentes graus (MUNNS et al., 2002).

A *Physalis peruviana* é uma espécie glicófita, como a maioria das plantas hortícolas (GRATTAN; GRIEVE, 1999). Como já comentado, a maior produção dessa cultura ocorre na Colômbia, que ironicamente, é um país que sofre com problemas de salinização. Aproximadamente 600 mil ha da área cultivada desse país são afetados pela salinidade (CASIERRA; EBERT; LÜDDERS, 2000). Embora solos salinizados sejam comumente encontrados em áreas de cultivo de *physalis*, são poucos os trabalhos conduzidos visando conhecer o comportamento da planta nessas condições.

2.3.2 Efeito do estresse salino nas plantas

O estresse salino provoca dois tipos de efeito nas plantas: o osmótico e o iônico (ou tóxico). O osmótico diz respeito à elevada concentração de sais na solução do solo ou qualquer outro ambiente de cultivo, acarretando em déficit hídrico devido à redução do potencial osmótico, enquanto o efeito iônico é decorrente dos elevados níveis dos íons Na^+ e Cl^- e da alteração da relação K^+/Na^+ e demais nutrientes (WILLADINNO; CAMARA, 2010).

Para tentar se manter no ambiente salino, as plantas desenvolvem algumas estratégias bioquímicas e morfológicas. Na maioria das vezes, o primeiro órgão a ser afetado pela salinidade é a raiz. Logo, provavelmente é ela que vai perceber inicialmente os componentes osmótico e iônico da salinidade, por meio da membrana plasmática e, assim, desencadear as transduções de sinais (PRISCO; GOMES FILHO, 2010).

Algumas estratégias bioquímicas desempenhadas pelas plantas são: acúmulo seletivo ou exclusão de íons, controle da absorção de íons pelas raízes e do transporte para a parte aérea, compartimentalização de íons ao nível celular e ao nível de planta inteira, síntese de compostos solúveis, mudanças no processo fotossintético, alterações na estrutura da membrana e indução de enzimas antioxidantes e de hormônios vegetais (PARIDA; DAS, 2005).

Os mecanismos de tolerância aos sais podem ser de baixa ou alta complexidade. Os de baixa complexidade parecem estar envolvidos nas mudanças de muitas rotas bioquímicas, enquanto que os mecanismos de alta complexidade envolvem modificações que protegem processos maiores tais como fotossíntese e respiração e aqueles que preservam características importantes como citoesqueleto, parede celular, interações membrana plasmática x parede celular e mudanças na estrutura da cromatina e de cromossomos (PARIDA; DAS, 2010).

2.3.3 Estudo do estresse salino em condições artificiais

Os estudos sobre estresses abióticos em plantas realizados em condições *in vitro* são frequentemente utilizados para representar as diferentes condições de campo nas quais as plantas são acometidas por estresses (CLAEYS et al., 2014). Esses experimentos baseiam-se na adição de compostos ao meio de cultura que irão interferir de alguma forma no crescimento e desenvolvimento vegetal. Em ensaios para estudo do estresse salino, por exemplo, pesquisadores utilizam o cloreto de sódio (NaCl) para simular a salinização e assim tentar entender como cada espécie se comporta em diferentes níveis de salinidade (MUNNS; TESTER, 2008).

Experimentos em condições artificiais apesar de não serem perfeitos, oferecem muitas vantagens práticas como total controle do início e nível do estresse, baixa variabilidade e possibilidade de cultivar muitas plantas em pouco espaço físico (LAWLOR, 2013). Muito do conhecimento que se tem hoje sobre a fisiologia do estresse na espécie *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, foi obtido por meio de condições *in vitro*, e isso resultou na identificação de muitos genes que aumentam a tolerância ao estresse (CLAYES et al., 2014; GILL; TUTEJA, 2010). A pré-seleção de genótipos *in vitro* que sejam tolerantes à salinidade atualmente é possível por meio da técnica de cultura de tecidos que apresenta numerosas vantagens além da relação custo-benefício (SAKHANOKHO; KELLEY, 2009).

Segundo Jain et al. (2001), a seleção *in vitro* pode encurtar consideravelmente o tempo de seleção para características desejáveis sob pressão de seleção, podendo otimizar a seleção feita em campo, uma vez que apenas as plantas pré-selecionadas *in vitro* seguem para o ambiente externo.

2.4 Silício

O silício (Si) é um dos elementos mais abundantes no ambiente terrestre, ficando atrás somente do oxigênio (ZHU; GONG, 2014). Por ser tão abundante, sua essencialidade para as plantas superiores é muito difícil de ser comprovada, baseado nos critérios de essencialidade dos elementos propostos por Arnon e Stout (1939). Ocorre na natureza na forma de óxidos ou silicatos, sendo raro encontrá-lo na forma de cristais puros (EPSTEIN, 1994) e quando presente em excesso, não é considerado prejudicial para as plantas (MA et al., 2001).

O Si solúvel (ácido monossilícico - H_4SiO_4) é a principal forma encontrada na solução do solo (EPSTEIN, 1999) e pode ser oriunda da transformação de compostos minerais do solo, fertilizantes silicatados ou da decomposição de restos vegetais, sendo a principal forma absorvida pelas plantas (POSTEK, 1981).

2.4.1 Absorção, transporte e redistribuição

O Si é absorvido pelas raízes na forma de ácido silícico ($Si(OH)_4$), uma molécula monomérica neutra a $pH < 9$ (MA; TAKAHASHI, 2002). Os mecanismos de absorção de Si diferem grandemente entre as espécies, o que resulta na classificação de diferentes grupos de plantas em função da sua capacidade de acumular esse elemento.

O Si pode ser absorvido de forma ativa através da passagem do elemento em locais específicos da membrana, como nos canais proteicos de entrada de água ou através de proteínas específicas que atuam na absorção (RAVEN, 2001). A absorção de forma passiva também ocorre na forma de difusão ou fluxo de massa (MITANI; MA, 2005). Atualmente, as gramíneas são o grupo de plantas que possuem o maior detalhamento de seus mecanismos de absorção de

Si. Nessas plantas, a absorção é feita por transportadores específicos, sendo que o primeiro transportador foi identificado em arroz (MA et al., 2006).

A absorção de Si pelas plantas é uma linha de pesquisa que vem sendo muito estudada, uma vez que ainda existem controvérsias acerca de como esse processo ocorre nas plantas que possuem baixa taxa de absorção desse elemento. Sabe-se que as plantas diferem bastante na sua capacidade de absorver Si, até mesmo quando se analisa genótipos de uma mesma espécie (LIMA FILHO; LIMA; TSAI, 1999). Miyake e Takahashi (1985) caracterizaram as plantas em função de sua absorção de Si, sendo consideradas acumuladoras aquelas que apresentavam teor elevado do elemento com a absorção ligada à respiração aeróbica, como ocorre, por exemplo, em arroz, cana-de-açúcar e cevada; enquanto as não acumuladoras referiam-se àquelas que possuíam baixos níveis de Si, indicando a ocorrência de algum mecanismo de exclusão, a exemplo do tomateiro. Plantas intermediárias eram aquelas que apresentavam quantidade considerável do elemento, como as cucurbitáceas e a soja. Mais tarde, Takahashi, Ma e Miyake (1990) dividiram as plantas em acumuladoras, sendo elas as gramíneas (Poaceae) que têm processo ativo de absorção com teor foliar acima de 10 g kg^{-1} de Si na matéria seca. As não acumuladoras, em geral leguminosas (Fabaceae) e solanáceas, caracterizam-se por absorver Si a favor de um fluxo transpiratório de forma mais lenta que a absorção de água e discriminam o Si na absorção via simplasto, com teor foliar menor que 5 g kg^{-1} de Si na matéria seca.

A absorção de Si em plantas não acumuladoras está relacionada a algum tipo de defesa contra estresses. Assim, as plantas absorvem mais esse elemento quando expostas a condições adversas (DALLAGNOL et al., 2009).

Após ser absorvido, o Si é transportado para a parte aérea via xilema onde se deposita na forma de sílica amorfa hidratada inicialmente nos tecidos mais jovens e, posteriormente, vai acumulando-se nas partes mais senescentes,

sob a forma de sílica (DAYANANDAN; KAUFMAN; FRAKIN, 1983). Nas gramíneas essa deposição acontece de forma rápida e normalmente a sílica fica combinada às frações de celulose e hemicelulose da parede celular e espaços intercelulares (RAFI; EPSTEIN, 1999). Estudos mostram que esses depósitos de sílica podem atuar como barreira contra insetos-praga e patógenos, uma vez que a sílica incorpora-se à face exterior da epiderme formando uma camada espessa combinada à cutícula (KIM et al., 2002).

Quanto à sua redistribuição na planta, ou seja, sua mobilidade de um local da planta para outro qualquer (folha, fruto, ramo), o Si é considerado um elemento pouco móvel (SHAKOOR; BHAT, 2014).

2.4.2 Silício como elemento benéfico

Os efeitos benéficos do Si podem ser divididos em físicos e fisiológicos. Os físicos referem-se ao acúmulo de Si nas paredes celulares melhorando a arquitetura das plantas, reduzindo a perda de água pelos estômatos e dificultando a penetração de patógenos e insetos (BOTELHO et al., 2005; POZZA; POZZA, 2003). Os benefícios fisiológicos são pouco estudados, mas muitos trabalhos relatam que o Si pode favorecer o aumento da taxa fotossintética (FERRAZ et al., 2014), dos teores de pigmentos fotossintetizantes (ÁVILA et al., 2010; BRAGA et al., 2009) e da produtividade (PAULINO et al., 2013).

Em plantas acumuladoras, a adubação silicatada vem se mostrando eficiente devido às importantes respostas apresentadas por essas plantas, principalmente quanto ao controle de pragas e doenças (NASCIMENTO et al., 2014). Porém, segundo Ma e Yamaji (2008), os efeitos benéficos do Si são verificados comumente em plantas em condições de estresse.

2.4.3 Silício no combate ao estresse salino

Elevadas concentrações de sais resultam no aumento do acúmulo de íons Na^+ e Cl^- considerados deletérios às células vegetais quando presentes em grandes quantidades (WANG; HAN, 2007). A utilização de Si parece reduzir o acúmulo de íons Na^+ nas raízes e/ou parte aérea de monocotiledôneas. O Si age de forma a mitigar os efeitos adversos da salinidade por evitar a absorção de Na^+ e/ou seu transporte das raízes para a parte aérea (ZHU; GONG, 2014).

Outra forma de atuação do Si contra o estresse salino é na atenuação do dano oxidativo ocasionado pelo sal. A elevada salinidade leva à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO's) que causam distúrbios no metabolismo e danos às membranas (BARBOSA et al., 2014). A atenuação desses problemas é realizada por meio da ativação de complexos enzimáticos (ZHU; GONG, 2014). Maior atividade e/ou expressão de enzimas antioxidantes, tais como catalase e peroxidase, são exemplos de como o Si pode diminuir o dano oxidativo. Componentes não enzimáticos como ácido ascórbico, glutatona e compostos fenólicos também contribuem na mitigação dos danos (KIM; KWAK, 2010). Todos esses componentes (enzimáticos e não enzimáticos) podem evitar a produção de radicais livres, sequestrá-los ou mesmo promover sua degradação (BARBOSA et al., 2014). Para algumas culturas, já foi demonstrado que a adição de Si diminuiu a peroxidação lipídica, processo decorrente da formação de ERO's. Essa redução contribui para a manutenção da integridade e permeabilidade da membrana (LIANG et al., 2003; ZHU et al., 2004). O fato da adição de Si melhorar a defesa antioxidante indica que ele pode estar envolvido na atividade metabólica da planta como observado em cevada, tomate e pepino submetidos à salinidade (AL-AGHABARY; ZHU; CHI, 2004; LIANG et al., 2003; ZHU et al., 2004).

O aparato fotossintético também pode ser protegido do dano salino pelo Si. Isso pode ser atribuído ao fato de que a absorção de Na^+ é desfavorecida e o sistema antioxidante é estimulado (LIANG, 1998).

O Si também atua na regulação da biossíntese de compostos solúveis como a prolina, glicina betaína e carboidratos (LEE et al., 2010), além de afetar a biossíntese de lignina e regular os níveis de hormônios vegetais e poliaminas (KUMAR; BANDHU, 2005; ZHU; GONG, 2014).

REFERÊNCIAS

- AGRONET. **Red de información y comunicación estratégica del sector agropecuario**. Disponível em: <<http://www.agronet.gov.co/>>. Acesso em: 10 jul. 2014.
- AL-AGHABARY, K.; ZHU, Z. J.; SHI, Q. H. Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 27, n. 12, p. 2101-2115, Feb. 2004.
- AL-OLAYAN, E. M. et al. The potential protective effect of *Physalis peruviana* L. against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats is mediated by suppression of oxidative stress and downregulation of MMP-9 expression. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Cairo, v. 2014, p. 1-12, 2014.
- ARNON, D. I.; STOUT, P. R. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 14, p. 371-375, 1939.
- ÁVILA, F. W. et al. Interação entre silício e nitrogênio em arroz cultivado sob solução nutritiva. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 41, n. 2, p. 184-190, 2010.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BATISTA, M. J. et al. **Drenagem como instrumento de dessalinização e prevenção da salinização dos solos**. 2. ed. Brasília: CODEVASF, 2002. 216 p.
- BOTELHO, D. M. S. et al. Intensidade da cercosporiose em mudas de cafeeiro em função de fontes e doses de silício. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 582-588, 2005.
- BRAGA, F. T. et al. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 128-132, fev. 2009.

CASIERRA, F.; EBERT, G.; LÜDDERS, P. Efecto de la salinidade por cloruro de sodio sobre el balance de nutrientes em plantas de lulo (*Solanum quitoense*). **Agronomía Colombiana**, Bogota, v. 17, p. 85-90, 2000.

CHAVES, A. C. **Propagação e avaliação fenológica de *Physalis* sp. na região de Pelotas-RS**. 2006. 65 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* (L). **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, nov./dez. 2005.

CLAYES, H. et al. What is stress?: dose-response effects in commonly used *in vitro* stress assays. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 165, n. 1, p. 519-517, 2014.

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

DAYANANDAN, P.; KAUFMAN, P. B.; FRAKIN, C. I. Detection of silica in plants. **American Journal of Botany**, New York, v. 70, n. 10, p. 1079-1084, 1983.

DIAS, N. S.; BLANCO, F. F. Efeitos dos sais no solo e na planta. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. (Ed.). **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCTSal, 2010. p. 132-144.

DIAS, N. S. et al. Manejo da fertirrigação e controle da salinidade do solo sob ambiente protegido, utilizando-se extratores de solução do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, n. 4, p. 496-504, out./dez. 2005.

EPSTEIN, E. The anomaly of silicon plant biology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, n. 1, p. 11-17, Jan. 1994.

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

EPSTEIN, E. Silicon in plants. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture: studies in plant science**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001. p. 1-15.

ESTEVEVES, B. S.; SUZUKI, M. S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 4, p. 662-679, 2008.

FERRAZ, R. L. S. et al. Trocas gasosas e eficiência fotoquímica de cultivares de algodoeiro herbáceo sob aplicação de silício foliar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 735-748, 2014.

FISCHER, G.; ALMANZA-MERCHÁN, P. J.; MIRANDA, D. Importancia y cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 1-15, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Water in agriculture: opportunity untapped**. Rome, 2006. 4 p.

GARCÍA, F. E. V.; RODRÍGUEZ, M. C.; MORALES, M. O. R. Cinética del color durante el almacenamiento de caramelos blandos de uchuva adicionados de calcio y sin sacarosa. **Revista Lasallista de Investigación**, Caldas, v. 9, n. 2, p. 11-25, 2012.

GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCTSal, 2010. 472 p.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GONÇALVES, E. D. et al. **Aspectos técnicos do cultivo de fisális para o Sul de Minas**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2012. 6 p. (Circular Técnica, 162).

GRATTAN, S. R.; GRIEVE, C. S. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 78, n. 1/4, p. 127-157, 1999.

HELVACI, S. et al. Antimicrobial activity of the extracts and physalin D from *Physalis alkekengi* and evaluation of antioxidant potential of physalin D. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 48, n. 2, p. 142-150, 2010.

HUNZIKER, A. T. **The genera of Solanaceae**. Ruggell: G. Verlang, 2001. 500 p.

- IANNETTA, M.; COLONNA, N. **Salinização**. Disponível em:
<http://geografia.fcsh.unl.pt/lucinda/booklets/B3_Booklet_Final_PT.pdf>.
Aceso em: 23 jan. 2015.
- JAIN, M. et al. Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cells lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, n. 5, p. 463-468, Feb. 2001.
- KIM, S. G. et al. Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 10, p. 1095-1103, 2002.
- KIM, Y. H.; KWAK, S. S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S. D. (Ed.). **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science, 2010. p. 129-150.
- KUMAR, A. P.; BANDHU, A. D. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 60, n. 3, p. 324-349, Mar. 2005.
- LAWLOR, D. W. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 83-108, Nov. 2013.
- LEE, S. K. et al. Effect of silicon on growth and salinity stress of soybean plant grown under hydroponic system. **Agroforestry Systems**, Heidelberg, v. 80, n. 3, p. 333-340, 2010.
- LIANG, Y. C. Effects of Si on leaf ultrastructure, chlorophyll content and photosynthetic activity in barley under salt stress. **Pedosphere**, Bethesda, v. 8, n. 4, p. 289-296, Aug. 1998.
- LIANG, Y. C. et al. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, n. 10, p. 1157-1164, Oct. 2003.
- LIMA FILHO, O. F.; LIMA, M. T. G.; TSAI, S. M. **O silício na agricultura**. Piracicaba: POTAFÓS, 1999. 7 p. (Informações Agronômicas, 87).
- MA, J. F. et al. A silicon transporter in rice. **Nature**, London, v. 440, n. 7084, p. 688-691, Mar. 2006.

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

MA, J. F.; TAKAHASHI, E. **Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan**. New York: Elsevier Science, 2002. 281 p.

MA, J. F.; YAMAJI, N. Functions and transport of silicon in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 65, n. 19, p. 3049-3057, 2008.

MIRANDA, D. et al. Salinity effects on proline accumulation and total antioxidant activity in leaves of the cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Gottingen, v. 87, n. 1, p. 67-73, Jan. 2014.

MITANI, N.; MA, J. F. Uptake system of silicon in different plant species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 414, p. 1255-1261, Mar. 2005.

MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Effect of silicon on the growth of soybean plants in a solution culture. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 31, n. 4, p. 625-636, 1985.

MUNIZ, J. et al. Principais pesquisas realizadas com o cultivo de *Physalis* no Sul do Brasil. In: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DA PHYSALIS, 3., 2012, Lages. **Anais...** Lages: UDESC, 2012. p. 56-79.

MUNIZ, J. et al. Sistemas de condução para o cultivo de *physalis* no Planalto Catarinense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 830-838, 2011.

MUNNS, R. et al. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. **Plant and Soil**, The Hague, v. 247, n. 1, p. 93-105, Nov. 2002.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 651-681, 2008.

NASCIMENTO, A. M. et al. Não preferência a *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera: Noctuidae) induzida em arroz pela aplicação de silício. **Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 9, n. 2, p. 215-218, 2014.

OLIVEIRA, A. B.; GOMES-FILHO, E.; ENÉAS-FILHO, J. O problema da salinidade na agricultura e as adaptações das plantas ao estresse salino.

Enciclopédia Biosfera, Goiânia, v. 6, n. 11, p. 1-16, 2010.

PALOMINO, C. E. M. **Caracterización morfológica de accesiones de *Physalis peruviana* L. del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira**. 2010. 70 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Fitogenéticos Neotropicais) - Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2010.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 60, n. 3, p. 324-349, Mar. 2005.

PAULINO, A. S. et al. Helicônia “Golden Torch”: produtividade e qualidade pós-colheita sob diferentes fontes e doses de silício. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 6, p. 615-621, 2013.

POSTEK, M. T. The occurrence of silica in leaves of *Magnolia grandiflora*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 142, n. 1, p. 124-134, 1981.

POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. Manejo de doença de plantas com macro e micronutrientes. **Revista Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v. 28, p. 52-54, 2003. Suplemento.

PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. (Ed.). **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCTSal, 2010. p. 147-164.

PUENTE, L. A. et al. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: a review. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 1733-1740, Aug. 2011.

RAFI, M. M.; EPSTEIN, E. Silicon absorption by wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 211, n. 2, p. 223-230, Apr. 1999.

RAMAR, K.; AYYADURAI, V.; ARULPRAKASH, T. *In vitro* shoot multiplication and plant regeneration of *Physalis peruviana* L. an important medicinal plant. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, Tamilnadu, v. 3, n. 3, p. 456-464, 2014.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, New York, v. 20, n. 2, p. 101-153, 2002.

RASOOL, S. et al. Salt stress: causes, types and responses of plants. In: AHMAD, P.; AZOOZ, M. M.; PRASAD, M. N. V. (Ed.). **Ecophysiology and responses of plants under salt stress**. New York: Springer, 2013. p. 1-4.

RAVEN, J. A. Silicon transport at the cell and tissue level. In: DATONOFF, L.; SNYDER, G.; KORNDÖRFER, G. (Ed.). **Silicon in agriculture**. New York: Elsevier Science, 2001. p. 17-39.

RUFATO, L. et al. Aspectos técnicos da cultura da fisális. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 33, n. 268, p. 69-83, maio/jun. 2012.

RUFATO, L. et al. **Aspectos técnicos da cultura da physalis**. Lages: UFPel, 2008. 100 p.

SAKHANOKHO, H. F.; KELLEY, R. Y. Influence of salicylic acid on *in vitro* propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* (cv. 'Luna Red'). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 8, p. 1474-1481, Apr. 2009.

SHAKOOR, S. A.; BHAT, M. A. Biomineralisation of silicon and calcium in plants and its control: an overview. **Plant**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 6-13, 2014.

SOARES, E. L. de C. et al. O gênero *Physalis* L. (Solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisas Botânica**, São Leopoldo, n. 60, p. 323-340, 2009.

TAKAHASHI, E.; MA, J. F.; MIYAKE, Y. The possibility of silicon as an essential element for higher plants. **Comments on Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 2, n. 2, p. 99-122, Mar. 1990.

TAKIMOTO, T. et al. 4 β -Hydroxywithanolide E isolated from *Physalis pruinosa* calyx decreases inflammatory responses by inhibiting the NF- κ B signaling in diabetic mouse adipose tissue. **International Journal of Obesity**, London, v. 38, n. 11, p. 1432-1439, 2014.

TORABZADEH, P.; PANAHI, P. Evaluation of antifungal activity of *Physalis alkekengi* L. extracts on *Microsporium canis*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Nocardia asteroides*. **Middle-East Journal of Scientific Research**, Deira, v. 13, n. 7, p. 926-929, 2013.

VELASQUEZ, H. J. C.; GIRALDO, O. H. B.; ARANGO, S. S. P. Estudio preliminar de la resistencia mecánica a la fractura y fuerza de firmeza para fruta de uchuva (*Physalis peruviana* L.). **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, v. 60, n. 1, p. 3785-3796, 2007.

WANG, X. S.; HAN, J. G. Effects of NaCl and silicon on ion distribution in the roots, shoots and leaves of two alfalfa cultivars with different salt tolerance. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 53, n. 3, p. 278-285, June 2007.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 6, n. 11, p. 1-23, 2010.

YEN, C. Y. et al. 4 β -Hydroxy withanolide E from *Physalis peruviana* (Golden berry) inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis and G₂/M arrest. **BMC Cancer**, London, v. 10, n. 46, p. 1-8, 2010.

ZHU, J. K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 66-71, Feb. 2001.

ZHU, Y.; GONG, H. Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 34, n. 2, p. 455-472, 2014.

ZHU, Z. J. et al. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, Shannon, v. 167, n. 3, p. 527-533, Sept. 2004.

CAPÍTULO 2 Efeito do estresse salino induzido *in vitro* e da utilização de silício nas características fisiológicas e anatômicas de *physalis*

RESUMO

A salinidade é um dos estresses abióticos mais prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento vegetal. O silício (Si) é considerado um elemento benéfico para as plantas por apresentar indícios de elemento mitigador de muitos tipos de estresse. Neste estudo objetivou-se avaliar o efeito do estresse salino *in vitro* induzido por NaCl em plantas de *physalis* e o possível efeito atenuante do Si em condições salinas. No primeiro experimento, foram inoculados dois tipos de explante em meio MS com concentrações crescentes de NaCl (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) para investigar a sensibilidade de *physalis* à salinidade induzida *in vitro*. Após 30 dias, foram avaliados o crescimento e o padrão isoenzimático das plantas. No segundo experimento, segmentos nodais foram inoculados em meio MS salino (0,5 e 1,0% de NaCl) com diferentes concentrações de silício (0; 0,5 e 1,0 g L⁻¹). Crescimento, teor de pigmentos fotossintéticos, trocas gasosas, extravasamento de eletrólitos e anatomia foliar foram avaliados após 30 dias. No estudo preliminar, observou-se que o número de gemas e o comprimento da parte aérea diminuíram com o aumento da concentração de NaCl e que a enzima esterase teve maior expressão nas concentrações mais elevadas de sal. No segundo experimento, verificou-se que todas as variáveis de crescimento e os teores de pigmentos fotossintéticos, bem como fotossíntese e extravasamento de eletrólitos foram prejudicados com aumento do nível salino. O conteúdo de DNA não foi afetado por nenhum dos fatores. Quanto à anatomia, verificou-se redução da densidade estomática e maior espessamento da nervura central e do limbo com aumento da concentração de NaCl. O Si mostrou-se significativamente eficaz apenas na mitigação dos danos aos pigmentos e às variáveis anatômicas quando o nível de salinidade era de 0,5%.

Palavras-chave: *Physalis peruviana* L. Salinidade. Ácido silícico. Cultivo *in vitro*. Pigmentos. Trocas gasosas. Conteúdo celular. Anatomia vegetal. DNA.

ABSTRACT

Salinity is one of the abiotic stresses more harmful to plant growth and development. Silicon (Si) is considered a beneficial element for plants for presenting indications to be a mitigating element of many types of stress. This study aimed at evaluating the effect of *in vitro* salt stress NaCl-induced in physalis plants and the possible mitigating effect of Si in saline conditions. In the first experiment, two types of explants (nodal segments and complete plants from seeds) were inoculated in MS medium with increasing concentrations of NaCl (0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0%) to investigate the sensitivity of physalis to salinity. After 30 days, growth and electrophoretic analyses of isoenzyme were evaluated. In the second experiment, nodal segments were inoculated in MS medium under saline conditions (0.5 and 1.0% NaCl) with different silicon concentrations (0, 0.5 and 1.0 g L⁻¹). Growth, photosynthetic pigments concentration, gas exchange, electrolyte leakage and leaf anatomy were evaluated after 30 days. In the preliminary study, we observed that the number of buds and stem length decreased with increasing NaCl concentration for both types of explantes, and the esterase enzyme had the highest expression at higher salt concentrations. In the second experiment, it was found that all growth variables, photosynthetic pigments content, photosynthesis and electrolytes leakage were negatively affected by increased salt level. DNA content was not affected by any factor. As for anatomy, there was a reduction in stomatal density and greater thickness of leaf blade with increase of NaCl percentage. Si showed significantly effective only in mitigating the damage to the pigments content and leaf anatomy variables when salinity level was 0.5%.

Keywords: *Physalis peruviana* L. Salinity. Silicic acid. *In vitro* culture. Pigments. Gas exchange. Cellular content. Plant anatomy. DNA.

1 INTRODUÇÃO

O estresse salino é considerado um dos fatores abióticos que mais limitam o crescimento e desenvolvimento das plantas (ZHU; GONG, 2014). A salinização consiste no excesso de sais em qualquer tipo de meio de cultivo. Esse tipo de estresse ocorre em inúmeras regiões de todo o mundo e estima-se que aproximadamente 7% dos solos e 20% das áreas aráveis sejam afetadas negativamente pela salinidade (RASOOL et al., 2013). A elevada concentração de sais provoca diversos danos estruturais, fisiológicos e bioquímicos nas plantas, sendo que os problemas mais recorrentes são o desequilíbrio de íons e a dificuldade de absorção de água devido às alterações do potencial osmótico, podendo levar a planta à morte (DIAS; BLANCO, 2010).

O estudo do estresse salino em condições *in vitro* é considerado uma alternativa viável por representar o ambiente externo no qual as plantas estão sujeitas às situações adversas (CLAYES et al., 2014). Esses tipos de ensaio possuem muitas vantagens práticas como o total controle do início e do nível de estresse, a baixa variabilidade e a possibilidade de cultivar muitas plantas utilizando pouco espaço físico (LAWLOR, 2013). Muito do conhecimento que se tem atualmente sobre estresse em plantas foi obtido utilizando condições artificiais (CLAYES et al., 2014). Essa metodologia já foi utilizada com sucesso, por exemplo, para avaliação do estresse salino em tomate (AMINI; EHSANPOUR, 2005), batata (HASHM; MOHAMED; ABO EL-FETOH, 2005), videira (IKBAL et al., 2014) e citros (KAUSHAL et al., 2013).

Uma das alternativas recentemente estudadas que visa minimizar os efeitos salinos nas plantas é a utilização da adubação silicatada. O silício (Si) é um dos elementos encontrados em maior quantidade na Terra, e apesar de não ter sua essencialidade comprovada para as plantas, é considerado um elemento benéfico, juntamente com selênio (Se) e cobalto (Co), devido aos efeitos

favoráveis que pode proporcionar, notadamente nas espécies monocotiledôneas (PILON-SMITS et al., 2009). Muitos estudos apontam que o Si pode apresentar variados efeitos atenuantes de estresses bióticos, a exemplo de indução de resistência contra pragas e doenças, e de efeitos abióticos como salinidade, seca e toxicidade por alumínio e metais pesados (CRUZ et al., 2014; DUFEY et al., 2014; KURABACHEW; WYDRA, 2014; SIVANESAN; JEONG, 2014; YIN et al., 2014).

A physalis (*Physalis peruviana* L.) é uma espécie pertencente à família Solanaceae e originária das Américas do Sul e Central. É uma planta de porte herbáceo e com frutos de pequeno calibre (diâmetro entre 1,25 e 2,5 cm), considerados comercialmente finos. No Brasil, sua exploração comercial é pequena e restrita a alguns locais, porém com o passar dos anos, o interesse por essa espécie vem sendo reforçado devido à relativa facilidade de condução da cultura e à comercialização de seus frutos que possuem preços elevados e apresentam inúmeros compostos bioativos apreciados pelo consumidor (PUENTE et al., 2011). A maior produção mundial de physalis ocorre na Colômbia, país que possui área de mais 700 ha cultivados com essa cultura, fazendo com que essa fosse a segunda fruta mais exportada por um país que sofre com problemas de salinidade em aproximadamente 600 mil ha de sua área agrícola (CASIERRA; EBERT; LÜDDERS, 2000; MIRANDA et al., 2014). A physalis é uma planta glicófita, ou seja, não tolera altos níveis de salinidade no meio de cultivo (GRATTAN; GRIEVE, 1999). Esse fato é importante, uma vez que o país que detém a maior produção dessa cultura apresenta problemas de salinização.

Levando-se em conta todos os problemas e informações comentados, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito do estresse salino *in vitro* induzido por NaCl e o possível efeito atenuante do silício nas condições de salinidade elevada sobre as respostas fisiológicas e anatômicas de plantas de physalis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições iniciais de cultivo

Foram utilizadas sementes de *P. peruviana* colhidas na safra de 2014, provenientes do município de Lavras no Sul de Minas Gerais. As sementes foram estabelecidas *in vitro* sendo primeiramente submetidas ao procedimento de assepsia, que consiste de imersão em água destilada, com duas gotas de detergente comercial por 1 min, seguida de imersão em álcool 70% v/v por 1 min e finalmente em solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 20 min, sob agitação constante. Posteriormente, os agentes desinfetantes foram lixiviados por meio de tríplex lavagem em água destilada e autoclavada, em câmara de fluxo laminar. Decorrido o processo de assepsia, as sementes foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 15 mL de meio de cultivo com os sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 1,8 g L⁻¹ de phytigel. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem à 121 °C por 15 min. As culturas foram mantidas em sala de crescimento à 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas.

Decorridos 15 dias da semeadura *in vitro*, as plântulas passaram pela primeira repicagem. Após 30 dias, foi realizado o segundo subcultivo no qual foram retirados os explantes para dar início aos experimentos.

2.2 Experimento 1: Sensibilidade de *physalis* ao estresse salino *in vitro* induzido por NaCl

Um estudo preliminar foi realizado com a finalidade de se conhecer a sensibilidade de *physalis* à salinidade *in vitro*. Para isso, plântulas completas

oriundas de sementes germinadas *in vitro* e segmentos nodais obtidos segundo metodologia anterior foram cultivados em meio MS (30 g L⁻¹ de sacarose, 1,8 g L⁻¹ de phytagel e pH ajustado para 5,8), com a adição de 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% de NaCl durante 30 dias em sala de crescimento a 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas.

Após esse período, foram avaliadas as seguintes características:

Análise fitotécnica: Número de gemas formadas e o comprimento da parte aérea (cm).

Análise eletroforética de isoenzima: As plantas foram coletadas e armazenadas à temperatura de -86 °C. O material foi macerado em almofariz pré-resfriado com nitrogênio líquido e adicionado do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP). Foram feitas subamostras de 100 mg do material macerado nas quais foram adicionados 300 µL do tampão Tris HCl 0,2M pH 8,0 e β-mercaptoetanol 0,1%. O material foi homogeneizado em vortex e mantido por 12 horas em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4 °C. A eletroforese foi realizada em sistema de géis de poli(acrilamida) em sistema descontínuo (7,5% gel separador e 4,5% gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-Glicina pH 8,9. Foram aplicados 60 µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética efetuada a 120 V por 5 horas. Após o término da corrida, os géis foram revelados para a enzima esterase (EST) conforme Alfenas et al. (2006). A interpretação dos resultados foi baseada na análise visual dos géis de eletroforese, levando-se em consideração a presença e a ausência e a intensidade de expressão de cada uma das bandas.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5 (dois tipos de explante e cinco concentrações de NaCl), com dez repetições, sendo cada repetição representada por um tubo com um explante. Os dados foram submetidos à análise de variância e, em caso de

ocorrência de significância, procedeu-se à análise de regressão com auxílio do *software* R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

2.3 Experimento 2: Efeito do estresse salino induzido por NaCl e da utilização de silício em *physalis* cultivada *in vitro*

Com base nos resultados obtidos no experimento anterior, segmentos nodais foram utilizados como explante para dar início ao segundo experimento deste trabalho. Assim, segmentos nodais oriundos de plantas de *physalis* previamente cultivadas *in vitro* foram inoculados em meio MS adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificados com 1,8 g L⁻¹ de phytigel e com pH ajustado para 5,8. O meio de cultivo foi adicionado de diferentes combinações de concentrações de NaCl (0,5% e 1,0%) e de ácido silícico (0; 0,5 e 1,0 g L⁻¹).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 (duas concentrações de NaCl e três concentrações de ácido silícico) + um tratamento adicional representado pelo controle (sem adição de nenhum dos fatores). Cada tratamento foi composto de 40 tubos de ensaio com uma planta em cada.

As concentrações de NaCl utilizadas neste experimento foram escolhidas com base nos resultados obtidos no experimento anterior. Concentrações acima de 1,0% mostraram-se muito tóxicas para *physalis*, acarretando em crescimento quase nulo.

O silício foi adicionado ao meio na forma de ácido silícico puríssimo (SiO₂.xH₂O). Após aplicação dos tratamentos, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com as mesmas condições descritas no experimento 1.

Após 30 dias, foram realizadas as seguintes avaliações:

Análise fitotécnica: Foram avaliados o número de gemas, número de folhas, comprimento da parte aérea (cm), comprimento da raiz (cm), massa fresca de parte aérea e raiz (g) e massa seca de parte aérea e raiz (g).

Conteúdo de pigmentos: Para estimar o conteúdo de clorofilas e carotenoides, 10 mg de folhas frescas foram maceradas em acetona 80% e o extrato formado foi filtrado utilizando filtro de papel. As absorvâncias da solução foram registradas a 663, 645 e 470 nm, para clorofila a, clorofila b e carotenoides, respectivamente, e o teor de pigmentos foi calculado segundo metodologia de Lichtenthaler (1987).

Trocas gasosas: As trocas gasosas foram mensuradas com analisador de trocas gasosas por infravermelho IRGA (Infra-Red Gas Analyzer) modelo LiCor-6400XT. Foram utilizadas cinco folhas por tratamento e a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos foi fixada na câmara do equipamento em $35 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com utilização de fonte artificial. Determinou-se assim a taxa fotossintética (A) em $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, taxa transpiratória (E) em $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e condutância estomática (gs) em $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Extravasamento de eletrólitos: Cinco discos foliares de 0,5 cm de diâmetro foram colocados em tubos de ensaio e posteriormente imersos em 15 mL de água deionizada. Os discos permaneceram sob agitação durante 24 horas e, após esse período, foi determinada a condutividade elétrica (CE1) da solução. Os tubos de ensaio foram então aquecidos em banho-maria com temperatura controlada para $90 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 hora e posteriormente resfriados à temperatura ambiente para que a condutividade elétrica (EC2) fosse novamente determinada. O extravasamento de eletrólitos foi calculado como porcentagem de EC1/EC2 segundo metodologia de Shi et al. (2006).

Anatomia foliar: Cinco folhas foram coletadas do terço médio das plantas de cada tratamento e fixadas em FAA_{70%} (formaldeído: ácido acético: etanol 70%) durante 72 horas, quando então foram armazenadas em etanol 70%.

Foram realizadas secções paradérmicas à mão livre com auxílio de lâmina de barbear e secções transversais obtidas em micrótomo de mesa (Cidepe). As secções foram alvejadas em solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 15 minutos (JOHANSEN, 1940), lavadas em água destilada e coradas com safranina 1% para as secções paradérmicas e solução de safrablau (safranina 1% + azul de astra 0,1%) para as transversais (BUKATSCH, 1972), sendo posteriormente montadas lâminas semipermanentes com gelatina glicerinada. As lâminas foram observadas em microscópio óptico com câmera acoplada e as medições nas imagens obtidas foram realizadas no *software* ImageTool 3.0. Foram avaliados: densidade estomática da face abaxial, relação diâmetro polar/diâmetro equatorial dos estômatos da face abaxial e espessura do limbo (medida na região do quarto feixe vascular).

Quantificação de DNA: Foram utilizados aproximadamente 50 a 60 mg de folhas jovens por tratamento, juntamente com amostra correspondente de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Stupické) utilizado como padrão de referência interno. O material foi triturado, com auxílio de um bisturi, em placa de Petri contendo 1 mL de tampão Marie gelado para liberação dos núcleos (DOLEZEL; BINAROVA; LUCRETTI, 1989). A suspensão de núcleos foi aspirada e, posteriormente, filtrada em filtros com malha de 50 µm. Essa suspensão foi mantida em um recipiente com gelo triturado para que não ocorresse deterioração do material. Em seguida, os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de iodeto de propídeo em cada amostra. Foram analisados 5 mil núcleos para cada amostra, com três repetições. A análise foi realizada no citômetro FACSCalibur quatro cores (Becton Dickinson) e os histogramas foram obtidos e analisados no *software* Cell Quest. O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008). Os dados foram submetidos à análise de variância e, em caso de ocorrência de diferenças significativas dos fatores ou da interação entre eles, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ou por regressão. As comparações com o tratamento adicional (controle) foram analisadas pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo preliminar da physalis cultivada em meio salino

Os resultados do experimento preliminar para avaliação da sensibilidade da physalis ao NaCl mostraram diferenças significativas quanto ao número de gemas formadas e comprimento da parte aérea, para ambos os tipos de explante (Figura 1; Figura 2A e 2B).

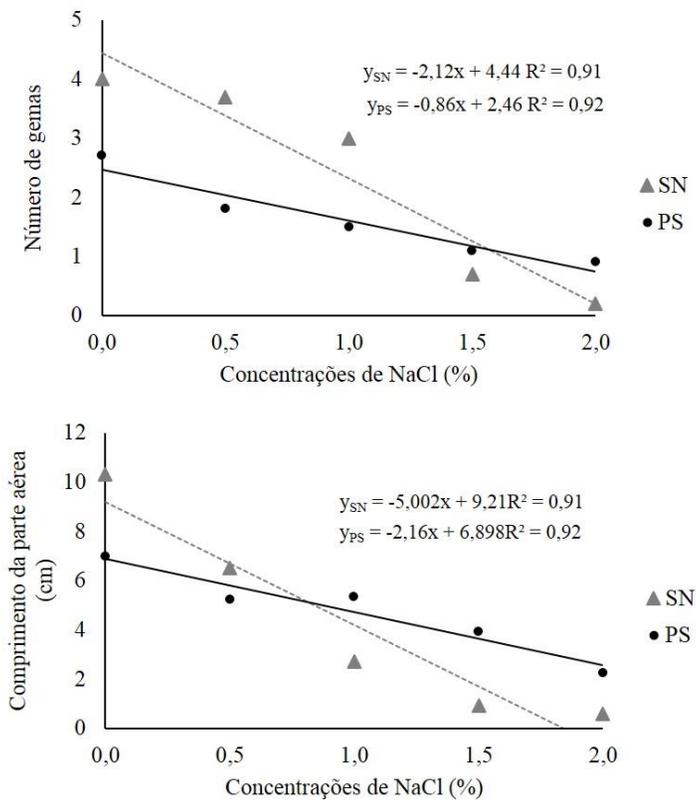


Figura 1 Número de gemas formadas e comprimento da parte aérea de plantas de physalis cultivadas *in vitro* sob condições de salinidade crescente. PS, SN: plântula oriunda de semente e segmento nodal, respectivamente

O principal sintoma de injúria por salinidade na planta é o retardamento do crescimento devido à inibição da alongação celular (BANDEOGLU et al., 2004). Neste trabalho, o aumento na concentração de NaCl acarretou em diminuição de forma linear no número de gemas formadas em ambos os tipos de explante. O NaCl é considerado tóxico para a célula devido ao desequilíbrio iônico que ocorre devido à desordenada entrada de Na^+ e Cl^- em detrimento de outros íons, além da toxidez por Na^+ que pode acarretar. O excesso desse sal também ocasiona deficiência de minerais e estresses osmótico e oxidativo (ZHU, 2002). Todos esses efeitos podem ter contribuído de forma conjunta ou isolada para a redução no número de gemas formadas.

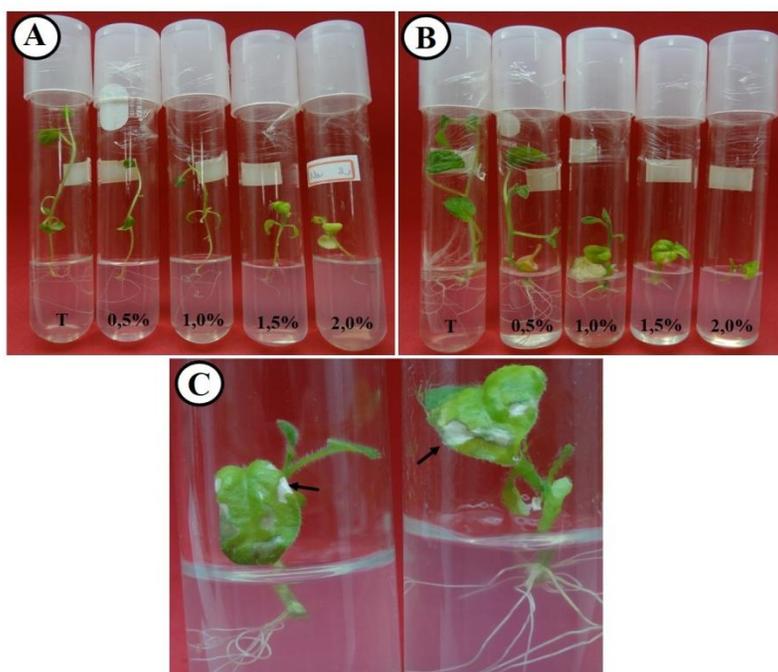


Figura 2 Plantas de physalis cultivadas *in vitro* na presença de NaCl. Comportamento das plântulas oriundas de semente (A) e oriundas de segmentos nodais (B) após 30 dias de exposição a concentrações crescentes de NaCl. Sintomas de toxidez por NaCl nas folhas de physalis (C)

Soundararajan et al. (2013) também encontraram reduções drásticas na formação de gemas quando cultivaram sálvia (*Salvia splendens*) *in vitro* na presença de NaCl. A utilização de concentrações maiores que 12 g L⁻¹ causaram efeitos letais em plantas de figo cultivadas *in vitro*, enquanto que concentrações menores que 11 g L⁻¹ foram capazes de causar efeitos adversos tais como diminuição no número e no comprimento de brotos (METWALI et al., 2014). A seleção *in vitro* de genótipos de bananeira resistentes à salinidade também foi fortemente afetada pela presença de NaCl no meio de cultivo, o qual inibiu a regeneração de brotos (ULISSES et al., 2000).

É interessante salientar que quando o explante utilizado foi a plântula oriunda de semente, o percentual de redução do número de gemas foi de 70%, enquanto que a utilização de segmentos nodais como fonte de explante levou a uma redução mais drástica, em torno de 95% (de 4,44 gemas para 0,2).

Neste trabalho, também se verificou que o comprimento da parte aérea diminuía à medida que se aumentava a concentração de NaCl do meio (Figura 2A e 2B). A redução no crescimento é um dos fenômenos mais comuns em plantas estressadas por sal sendo observada em cultivo de células, tecidos ou órgãos cultivados *in vitro* em meio suplementado com NaCl (RAI et al., 2011).

Essa redução no comprimento da planta observada neste trabalho possivelmente pode ser atribuída ao fato de que elevadas concentrações de sais causam déficit hídrico devido ao aumento no potencial osmótico do meio, dificultando a absorção de água pela planta (YUE et al., 2012). Além disso, a absorção desordenada de Na⁺ e Cl⁻ ocasiona toxidez nas plantas, além de dificultar a absorção de outros cátions como K⁺ e Ca²⁺ causando desequilíbrio nutricional (WANG; HAN, 2007). Esses resultados vão ao encontro daqueles encontrados por Harter et al. (2014) e Sá et al. (2014) que relataram diminuição do comprimento de plantas de gliricídia e mogango, respectivamente, à medida que se aumentavam as concentrações de NaCl do meio.

Quando foram utilizadas plântulas oriundas de semente, o aumento na concentração de NaCl do meio ocasionou redução de 62,6% no comprimento das plantas. Já o uso de segmentos nodais propiciou a diminuição do comprimento em mais de 95% (Figura 2A e 2B). Essa redução mais drástica quando se utilizaram segmentos nodais (redução que também foi observada para número de gemas) pode ser porque esse tipo de explante inicialmente não possuía sistema radicular formado, ficando mais sujeito ao efeito tóxico do sal.

O NaCl é um sal capaz de causar várias injúrias, dependendo da concentração que esteja em determinado meio de cultivo. Os íons Na^+ são considerados tóxicos para a grande maioria das plantas, enquanto que íons Cl^- podem impedir o crescimento vegetal quando presentes em altas concentrações (SOUNDARARAJAN et al., 2013). No presente estudo, foi possível notar a ocorrência de sintomas de toxidez causada pelo NaCl. Na Figura 2C, pode ser observada a formação de áreas de coloração cloróticas indicando a morte do tecido. Segundo Dias e Blanco (2010), o excesso de sais promove desbalanceamento e danos ao citoplasma, resultando em injúrias principalmente na bordadura e no ápice das folhas. Os sintomas de toxicidade podem aparecer em qualquer cultura se as concentrações de sais forem suficientemente altas ou acima dos níveis de tolerância.

Na Figura 3, estão representados os padrões de expressão da isoenzima esterase (EST) em plântulas oriundas de segmentos nodais e em plântulas oriundas de sementes. A EST é uma enzima que está diretamente associada ao metabolismo de lipídios, como os fosfolipídios das membranas (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005). Por isso, é considerada como uma enzima ligada aos processos de degradação de membranas que podem ocorrer quando qualquer estrutura do vegetal (tecido, órgão) está submetida a algum tipo de estresse (BASAVARAJAPPA; SHETTY; PRAKASH, 1991). Nesse contexto, preferiu-

se avaliar a expressão da esterase neste experimento, uma vez que sua atuação na célula está altamente ligada aos danos por estresse salino.



Figura 3 Padrão isoenzimático de plantas de *physalis* cultivadas *in vitro* em diferentes níveis de salinidade, revelados para a enzima esterase (EST). Esquerda: plantas oriundas de segmentos nodais; Direita: plantas oriundas de sementes

Foram detectadas bandas de EST em todos os tratamentos, porém foi possível observar que à medida que se aumentou a concentração de NaCl, a expressão da EST ficou mais pronunciada em ambos os explantes. Infere-se que o aumento da sua expressão possa estar associado ao dano causado pelos íons Na^+ e Cl^- à medida que ficam em excesso no meio. Segundo Silva et al. (2000), essa indução pelo NaCl pode ser decorrente da sensibilidade dessa enzima à interferência de fatores abióticos. Harter et al. (2014) também encontraram maior atividade da EST em plântulas de mogango submetidas à níveis crescentes de salinidade, com maior expressão da enzima sendo verificada no sistema radicular.

Maior expressão da EST foi verificada quando o explante utilizado era a plântula oriunda de semente. Este tipo de explante apresentou número de gemas

e comprimento da parte aérea menores mesmo na condição sem estresse, porém com a elevação da salinidade, a queda dessas variáveis foi menor para esse tipo de explante. A expressão da EST foi mais pronunciada provavelmente porque esse tipo de explante já possuía raízes formadas quando comparado ao segmento nodal e provavelmente as enzimas produzidas na raiz contribuíram para aumentar a expressão isoenzimática desse tipo de explante e torná-lo mais resistente.

3.2 Efeito do estresse salino e da utilização de silício nas características fisiológicas de *physalis*

Na Tabela 1 são apresentados os resultados do teste F em relação às significâncias para todas as variáveis avaliadas.

Tabela 1 Significância do teste F em relação aos fatores (NaCl e Si) e à interação (NaCl x Si) para todas as variáveis avaliadas

	Var.	NaCl	Si	NaCl x Si	Ft vs. Ad
Teste F	CPA	*	ns	ns	*
	CR	*	ns	ns	*
	NF	*	ns	ns	*
	NG	*	*	ns	*
	MFp	*	ns	ns	*
	MSp	ns	ns	ns	ns
	MFr	*	ns	ns	ns
	MSr	*	ns	ns	*
	Clo a	*	*	*	ns
	Clo b	*	*	*	ns
	Clo T	*	*	*	ns
	Carot	*	*	*	ns
	A	*	*	ns	ns
	E	ns	ns	ns	*
	gs	ns	ns	ns	*
	CE1	*	ns	ns	*
	CE2	*	ns	ns	*
	EE	*	ns	ns	ns
	DS	*	*	*	ns
	DP/DE	*	*	ns	*
	LF	*	*	*	*
	DNA	ns	ns	ns	*
	CV	*	ns	ns	ns

Var. = variáveis; Ft = fatorial; Ad. = tratamento adicional (controle).

CPA = comprimento da parte aérea; CR = comprimento da raiz; NF = número de folhas; NG = número de gemas; MFp = massa fresca da parte aérea; MSp = massa seca da parte aérea; MFr = massa fresca de raiz; MSr = massa seca de raiz; Clo a = clorofila a; Clo b = clorofila b; Clo T = clorofila total; Carot = carotenoides; A = taxa fotossintética; E = taxa transpiratória; gs = condutância estomática; CE1 = condutividade elétrica 1; CE2 = condutividade elétrica 2; EE = extravasamento de eletrólitos; DS = densidade estomática; DP/DE = relação diâmetro polar/diâmetro equatorial dos estômatos; LF = espessura do limbo foliar; DNA = quantidade de DNA; CV = coeficiente de variação da análise citométrica.

3.2.1 Análise fitotécnica

De acordo com a análise de variância para as características fitotécnicas, não houve efeito significativo na interação entre NaCl e Si, sendo observada significância apenas para o efeito isolado do NaCl (Tabela 1).

Pela Tabela 2, verifica-se que o aumento na concentração de NaCl ocasionou redução no comprimento da parte aérea, no comprimento da raiz e nos números de folhas e de gemas formadas. Assim como observado no experimento 1, o aumento da salinidade no meio ocasiona redução do crescimento vegetal, considerado um dos sintomas iniciais da exposição ao estresse. Segundo Wang e Han (2007) e Yue et al. (2012), esse fato está relacionado à ocorrência de déficit hídrico devido à redução do potencial osmótico o que dificulta a absorção de água pela planta e também ao desequilíbrio de nutrientes. Harter et al. (2014) e Sá et al. (2014) também relataram diminuição do comprimento de plantas de gliricídia e mogango, respectivamente, à medida que se aumentavam as concentrações de NaCl do meio.

O tratamento controle apresentou o maior comprimento da parte aérea. Entretanto quando se compara os tratamentos relacionados ao estresse salino é possível notar que a maior concentração de NaCl foi responsável pela menor altura da planta (Tabela 3).

Tabela 2 Efeito da salinidade nas características fitotécnicas de plantas de *physalis* cultivadas *in vitro*

NaCl	CPA	CR	NF	NG	MFp	MSp	MFr	MSr
%	----- cm -----				----- g -----			
0,5	7,13 a	8,14 a	4,97 a	4,47 a	0,594 a	0,040 a	0,128 a	0,013 a
1,0	0,91 b	4,74 b	2,43 b	1,90 b	0,380 b	0,033 a	0,024 b	0,004 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), número de folhas (NF), número de gemas (NG), massa fresca da parte aérea (MFP) e da raiz (MFr) e massa seca da parte aérea (MSp) e da raiz (MSr).

Tabela 3 Efeito da salinidade nas características fitotécnicas de plantas de *physalis* cultivadas *in vitro*, em relação ao controle

Comparações	CPA	CR	NF	NG	MFp	MSp	MFr	MSr
es	----- cm -----				----- g -----			
Controle	11,43	8,70	5,10	4,80	0,847	0,050	0,096	0,016
0,5	7,13 *	8,14 ^{ns}	4,97 ^{ns}	4,47 ^{ns}	0,594 ^{ns}	0,040 ^{ns}	0,128 ^{ns}	0,013 ^{ns}
1,0	0,91 *	4,74 *	2,43 *	1,90 *	0,380 *	0,033 ^{ns}	0,024 ^{ns}	0,004 ^{ns}

* e ^{ns}; contrastes significativos e não significativos, respectivamente, pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

Comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), número de folhas (NF), número de gemas (NG), massa fresca da parte aérea (MFP) e da raiz (MFr) e massa seca da parte aérea (MSp) e da raiz (MSr).

O comprimento da raiz apresentou redução em torno de 50% quando a salinidade foi elevada para 1%. Assim como para a parte aérea, a redução do sistema radicular está relacionada à menor absorção de água causada pela presença de sais tóxicos. Segundo a análise de variância, a adição de Si não influenciou na atenuação do estresse. Asmar et al. (2011) também não encontraram aumento do comprimento de raiz em plantas de banana-maçã cultivada *in vitro* em meio suplementado com Si.

As variáveis número de folhas e número de gemas apresentaram redução de 50% e 57,5%, respectivamente, com aumento da concentração de NaCl

(Tabela 2). É possível notar que o tratamento controle apresentou as maiores médias e que a concentração mais baixa de NaCl não diferiu significativamente em relação a ele. O contrário foi observado quando a concentração de NaCl é elevada para 1,0%, diferindo da testemunha (Tabela 3).

Todos os resultados encontrados para as variáveis mencionadas sempre foram inferiores a partir do momento que se aumentava a concentração de NaCl e a interação do sal com Si não foi significativa para nenhuma delas. Para essas variáveis, foi observada significância apenas para utilização do NaCl. Sintomas de toxidez também foram observados neste trabalho (Figura 4Ae 4B).

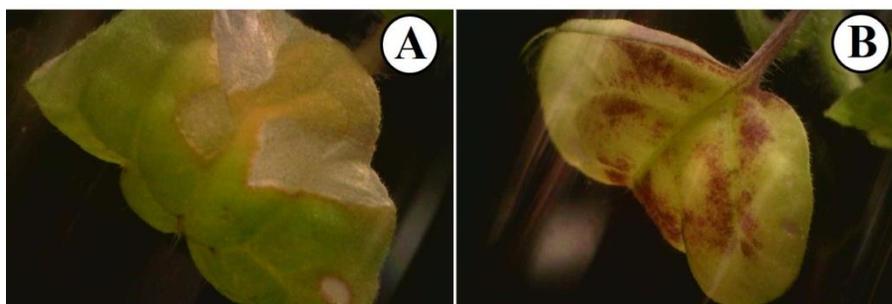


Figura 4 Sintomas de toxidez verificados nas folhas de physalis cultivada em meio salino em ambas as concentrações de NaCl (A e B)

O número de gemas foi a única variável fitotécnica que apresentou significância quanto ao efeito isolado do Si. Houve aumento de forma quadrática com maior número de gemas sendo verificado na concentração de 0,5% (Figura 5).

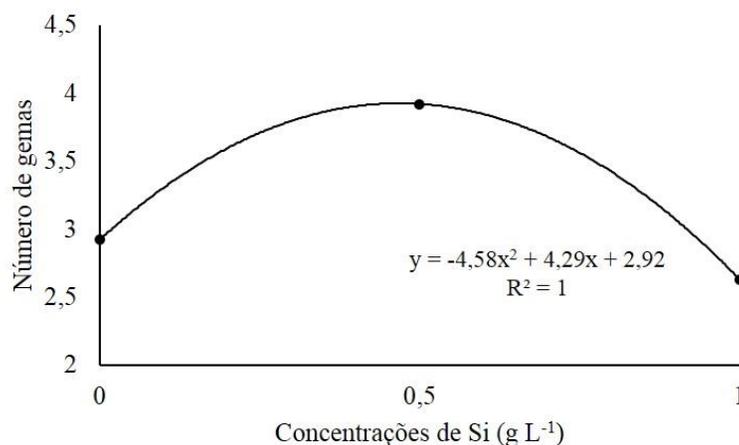


Figura 5 Número de gemas formadas em plantas de *physalis* cultivadas *in vitro* em relação às concentrações crescentes de Si

Para os resultados de massa fresca e massa seca tanto da parte aérea quanto da raiz, não foi observada interação entre a utilização de NaCl e Si, indicando que o elemento não foi capaz de contribuir para a atenuação do estresse através do incremento de biomassa (Tabela 1). O mesmo não foi observado no cultivo de sálvia sob estresse salino, em que a adição de Si ao meio de cultura foi eficiente na mitigação dos efeitos da salinidade, porém nunca sendo melhores que a testemunha (SOUNDARARAJAN et al., 2013).

Neste trabalho foi constatado apenas o efeito do NaCl, ou seja, o aumento na sua concentração propiciou redução na massa fresca e na massa seca da parte aérea e da raiz. Segundo Parida e Das (2005), a redução na massa fresca e seca de caules, folhas e raízes é um dos sintomas observados em plantas cultivadas sob estresse salino. O aumento na concentração de NaCl também ocasionou redução significativa no peso, altura, número de folhas e comprimento da raiz em tomateiro (MOHAMMAD et al., 1998). Rahimi et al. (2012) também verificaram redução na massa fresca e seca de plantas de funcho submetidas ao estresse salino.

Pela análise dos dados de fitomassa, observa-se que a massa fresca da parte aérea foi reduzida com elevação da salinidade, e esse comportamento não permaneceu para a massa seca (Tabela 2). Isso pode ser explicado pelo fato de que possivelmente não houve divisão das células durante o período avaliado, mas sim alongação das mesmas. Mesmo no controle, esse resultado foi observado, uma vez que a *physalis* quando cultivada *in vitro* mostra certa tendência em estiolar, que é uma característica inerente à espécie (Tabela 3). Além disso, a salinidade possivelmente também afetou o teor de água das plantas e por isso houve redução da massa fresca enquanto a massa seca não apresentou diferença.

De forma geral, foi observado que a adição de NaCl ao meio foi prejudicial ao crescimento *in vitro* de *physalis* e que a suplementação com Si nas referidas concentrações utilizadas no experimento não promoveu a mitigação dos danosos efeitos salinos. Segundo Braga et al. (2009), os comportamentos distintos verificados em diferentes espécies que recebem suplementação com Si podem ser explicados pelo fato de que o crescimento em condições *in vitro* de qualquer parte da planta depende do desenvolvimento de protocolos de meios de cultura que estejam otimizados para cada espécie e pela perfeita interação dos componentes essenciais.

A maior parte dos trabalhos envolvendo o efeito do Si no vegetal foi realizada com espécies acumuladoras, a exemplo das monocotiledôneas, devido às respostas importantes que essas plantas mostram na presença desse elemento, comportamento que muitas vezes não é observado para outras espécies, como aquelas do grupo das eudicotiledôneas (HODSON et al., 2005). Por fazer parte do grupo das solanáceas, é provável que a *physalis* possua comportamento de espécie não acumuladora de Si, assim como o tomateiro (EPSTEIN, 1994). Trabalhos com espécies não acumuladoras de Si vêm tornando-se mais frequentes devido à maior busca pelo entendimento sobre o comportamento

dessas plantas na presença desse elemento, quando se compara ao grande número de informações que já existem acerca do acúmulo de Si em poáceas (ZHU; GONG, 2014).

3.2.2 Pigmentos fotossintéticos

A adição de NaCl, independente de sua concentração, reduziu os conteúdos de pigmentos nas folhas de *physalis* (Tabela 4). O conteúdo de clorofila total, por exemplo, diminuiu em torno de 40%, assim como o de carotenoides. O mesmo foi observado em cultivares de *Stevia rebaudiana* regeneradas *in vitro* e em variedades de arroz cultivadas na presença de NaCl (JAMIL et al., 2012; RATHORE; SINGH; SINGH, 2014).

Quando se observa os resultados obtidos a partir da suplementação com Si, é possível notar que esse elemento foi capaz de elevar os conteúdos tanto de clorofilas a, b e total como de carotenoides apenas quando se utilizava a mais baixa concentração de NaCl (0,5%) (Tabela 4; Figura 6). Provavelmente essa melhoria esteja relacionada à ocorrência de possíveis modificações anatômicas, assim como foi relatado por Asmar et al. (2011). Essas modificações podem estar relacionadas ao maior espessamento de alguns tecidos que possuam pigmentos, como o parênquima paliádico por exemplo.

Porém, quando se observa os conteúdos de pigmentos na concentração de 1% de NaCl, nota-se que mesmo utilizando $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de Si não é possível elevar os teores de pigmentos, indicando que o estresse imposto às plantas foi suficientemente alto a ponto de causar danos severos.

Tabela 4 Conteúdos de pigmentos fotossintéticos de folhas de *physalis* cultivadas *in vitro* com diferentes combinações de NaCl e silício (Si). Desdobramento de NaCl dentro de cada nível de Si

Tratamentos	Si		
	0	0,5	1,0
NaCl		<i>Clorofila a</i>	
0,5	1,60 a	4,26 a	5,31 a
1,0	1,77 a	1,89 b	1,41 b
		<i>Clorofila b</i>	
0,5	0,72 b	1,68 a	2,15 a
1,0	1,15 a	1,04 b	1,14 b
		<i>Clorofila total</i>	
0,5	2,32 a	5,94 a	7,46 a
1,0	2,92 a	2,94 b	2,55 b
		<i>Carotenoides</i>	
0,5	0,82 a	2,02 a	2,55 a
1,0	0,89 a	0,98 b	0,76 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.

Esses resultados corroboram com os de Soundararajan et al. (2013) que observaram aumento nos teores de clorofila a, b e total em folhas de sálvia nas condições em que havia menor concentração de NaCl e presença de Si. Nas concentrações mais elevadas desse sal, os conteúdos dos pigmentos não foram aumentados, mesmo quando se utilizava altas doses de Si. O mesmo comportamento não foi observado em plantas de funcho (*Foeniculum vulgare*) submetidas ao estresse salino, as quais não tiveram seus conteúdos de clorofila aumentados quando se utilizava Si no meio (RAHIMI et al., 2012).

Na Tabela 5, é possível notar que mesmo na concentração de 1% de NaCl com adição de 1,0 g L⁻¹ de Si, os conteúdos de clorofila a, clorofila total e carotenoides são significativamente menores que os conteúdos encontrados no tratamento controle.

Tabela 5 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos em folhas de *physalis* cultivadas *in vitro* com diferentes combinações de NaCl e silício (Si), em relação ao tratamento controle

Comparações		Clo a	Clo b	Clo T	Carot
NaCl	Si				
Controle		2,83	1,22	4,19	1,38
0,5	0	1,60 *	0,72 *	2,32 *	0,82 *
1,0	0	1,77 ^{ns}	1,15 ^{ns}	2,92 ^{ns}	0,89 ^{ns}
0,5	0,5	4,26 *	1,68 *	5,94 *	2,02 *
1,0	0,5	1,89 ^{ns}	1,04 ^{ns}	2,94 ^{ns}	0,98 ^{ns}
0,5	1,0	5,31 *	2,15 *	7,46 *	2,55 *
1,0	1,0	1,41 *	1,14 ^{ns}	2,55 *	0,76 *

* e ^{ns}: contrastes significativos e não significativos, respectivamente, pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

Clo a = clorofila a; Clo b = clorofila b; Clo T = clorofila total; Carot = carotenoides.

No desdobramento de Si dentro de cada nível de NaCl, verifica-se que a adição desse elemento contribuiu para o aumento dos conteúdos de pigmentos em situações de menor salinidade (Figura 6).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) que se formam em condições de salinidade ocasionam a degradação da clorofila e a perda desse pigmento é considerada um dos indicadores de dano oxidativo (YASAR; ELLIALTIOGLU; YILDIZ, 2008). Pelos resultados do conteúdo da clorofila total obtidos no presente trabalho, já é possível notar que o aumento do estresse causou redução dessa variável e apenas no menor nível de salinidade verificou-se possível atuação do Si.

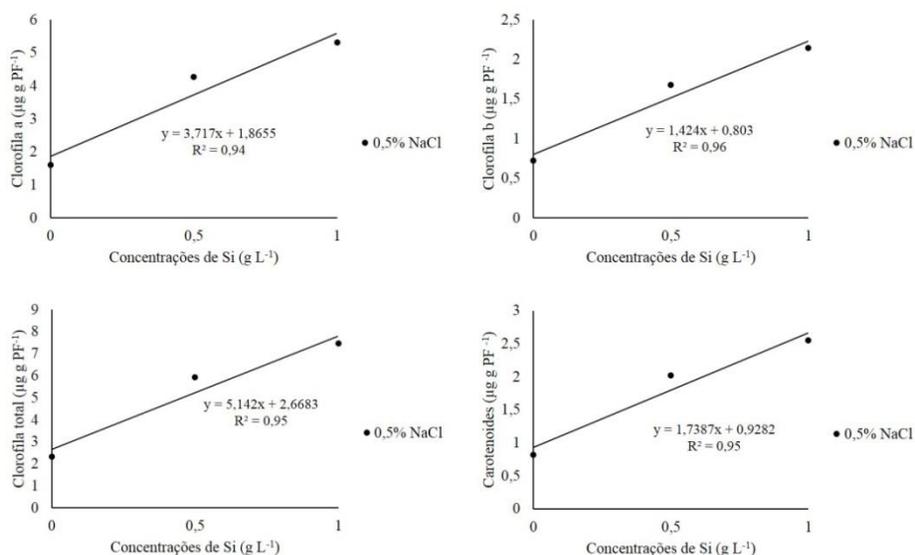


Figura 6 Conteúdos de clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenoides de folhas de *physalis* cultivada *in vitro* com diferentes combinações de NaCl (0,5% e 1,0%) e silício (0; 0,5 e 1,0 g L⁻¹)

Os carotenoides são considerados pigmentos acessórios, pois a luz absorvida por eles é transferida para a clorofila para o processo de fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2013). As maiores concentrações de NaCl levaram à ocorrência de menor teor para esse pigmento. Entretanto, na concentração de 0,5% de NaCl com suplementação de Si, houve aumento no conteúdo de carotenoides, o que pode ser vinculado à presença de Si no meio de cultura (Tabela 4; Figura 6).

Apesar de não existirem trabalhos com aplicação de Si em *P. peruviana*, é esperado que essa espécie, assim como o tomateiro, comporte-se como planta não acumuladora, pelo fato de pertencerem à mesma família. Porém, segundo Currie e Perry (2007), mesmo a planta não sendo capaz de acumular Si, devido a algum tipo de mecanismo que dificulte a absorção desse elemento, ela pode passar a absorver caso esteja exposta a algum estresse. Assim, a absorção de Si

pode ser desencadeada pelo estímulo à proteção contra doenças, pragas e outras condições de estresse.

3.2.3 Trocas gasosas

Para as variáveis relacionadas às trocas gasosas a interação não foi significativa (Tabela 1). A taxa fotossintética (A) apresentou significância apenas quando se observa os fatores de forma isolada, podendo ser inferido que o aumento na salinidade do meio acarreta na diminuição de A (Tabela 6). Essa redução já foi constatada em diversos estudos que mostram que o NaCl é capaz de interferir no processo fotossintético (PARIDA; DAS, 2005), considerado como o processo fisiológico dominante das plantas.

Tabela 6 Efeito da salinidade nas trocas gasosas de plantas de *physalis* cultivadas *in vitro* em meio salino

NaCl %	A	E	gs
0,5	4,65 a	4,94 a	0,28 a
1,0	2,93 b	3,35 a	0,19 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A = taxa fotossintética, em $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; gs = condutância estomática, em $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; E = taxa transpiratória, em $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Quando se compara os níveis de NaCl com o tratamento controle, percebe-se que as taxas fotossintéticas não diferiram entre si (Tabela 7). Segundo Esteves e Suzuki (2008), a taxa fotossintética normalmente é menor em plantas tratadas com excesso de sal, porém o estresse salino é mais evidente no conteúdo de clorofila e na área foliar.

Tabela 7 Efeito da salinidade nas trocas gasosas de plantas de *physalis* cultivadas *in vitro*, em relação ao controle

Comparações	A	E	gs
Controle	3,69	6,85	0,50
0,5	4,65 ^{ns}	4,94 ^{ns}	0,28 [*]
1,0	2,93 ^{ns}	3,35 ^{ns}	0,19 [*]

^{*} e ^{ns}; contrastes significativos e não significativos, respectivamente, pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

Taxa fotossintética (A), taxa transpiratória (E) e condutância estomática (gs).

O fator Si também influenciou significativamente na A das folhas de *physalis* favorecendo aumento de forma quadrática dessa variável, com maiores valores sendo encontrados na concentração de 0,5% (Figura 7).

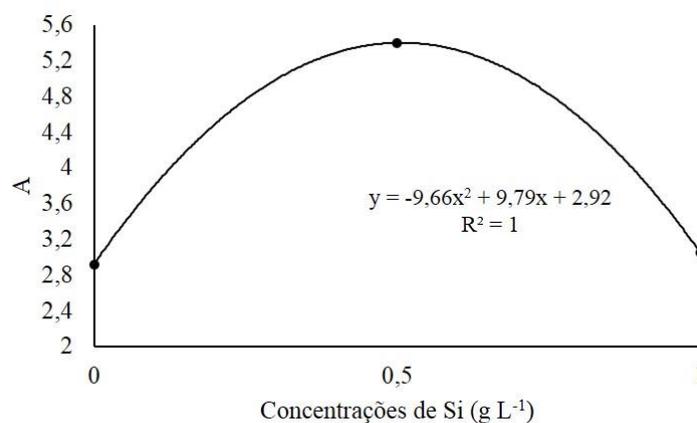


Figura 7 Taxa fotossintética (A) de plantas de *physalis* cultivadas *in vitro* em relação às concentrações crescentes de Si

A taxa transpiratória (E) se manteve igual em todos os níveis de NaCl e esse resultado pode ser explicado pela condição de alta umidade relativa existente nos tubos nos cultivos *in vitro* (Tabelas 6 e 7). A absorção de Si pode ser favorecida pela transpiração ou pelo estímulo à proteção contra estresses

(EPSTEIN, 1999; MOTOMURA; MITA; SUZUKI, 2002). Neste trabalho a transpiração não se modificou, logo provavelmente não contribuiu para a absorção de Si. Também se pode inferir que o estresse provocado não foi suficiente para incitar às alterações em E ou as plantas comportaram-se como heterotróficas e as trocas gasosas permaneceram em níveis baixos e constantes.

Já a condutância estomática (gs) não foi alterada por nenhum dos fatores. Porém, quando se compara com a testemunha, é possível verificar que a gs das plantas nos tratamentos com NaCl é menor (Tabela 7). Em *Bruguiera parviflora*, a gs permaneceu igual à testemunha quando as plantas estavam expostas à salinidade mais baixa (100 mM) e só diminuiu quando o teor estava muito elevado (PARIDA; DAS; MITTRA, 2004). Agastian, Kingsley e Vivekanandan (2000) e Gulzar, Khan e Ungar (2003) também obtiveram valores mais baixos de gs quando cultivaram *Urochondra setulosa* e amora, respectivamente, em ambiente salino.

3.2.4 Extravasamento de eletrólitos

Na Tabela 8, é possível observar que a condutividade elétrica (CE) tanto aos 25 °C (CE1) quanto aos 90 °C (CE2) aumentou à medida que se elevou a salinidade para 1%. A porcentagem da razão das CE's resultou em uma taxa de extravasamento de eletrólitos maior (em torno de 59%) a partir do aumento da salinidade.

Tabela 8 Efeito da salinidade na condutividade elétrica e extravasamento de eletrólitos de folhas de *physalis* cultivadas *in vitro*

NaCl (%)	CE1	CE2	EE
0,5	27,66 a	43,79 a	63,17 a
1,0	129,52 b	127,95 b	101,23 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A porcentagem de extravasamento de eletrólitos oferece indícios dos possíveis danos ocasionados nas células. Tecidos vegetais submetidos ao estresse salino são mais facilmente deteriorados, ocorrendo assim menor integridade das membranas. Como consequência, o conteúdo celular é extravasado para o meio e a quantidade de lixiviados pode ser determinada de forma que quanto maior o conteúdo extravasado da célula, teoricamente maior será o dano (ATAÍDE; FLORES; BORGES, 2012). Mudanças na atividade da enzima esterase também são indicativos de injúrias às membranas. Esses danos na membrana ocorrem em consequência da peroxidação lipídica provocada pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) em situações de estresse oxidativo (MELO et al., 2014). O excesso de Na^+ , além de afetar a integridade celular, também favorece o acúmulo desse cátion no interior da célula causando distúrbios na absorção de K^+ , aumento na relação Na^+/K^+ e redução do crescimento da planta (MENDES et al., 2011).

Resultados similares foram encontrados para abacaxi ornamental que apresentou 15% de dano na integridade da membrana sob ambiente salino (MENDES et al., 2011), cultivares de alfafa durante a seleção *in vitro* de genótipos tolerantes à salinidade (CAMPANELLI et al., 2013) e para videira que apresentou extravasamento de eletrólitos 42% maior sob estresse salino (LIU; NAKAJIMA; MORIGUCHI, 2011).

Em comparação com o tratamento controle, foram encontradas diferenças nas médias de condutividades apenas quando a concentração de NaCl

é aumentada para 1,0% (Tabela 9). Já o EE, em ambos os níveis de NaCl, permaneceu igual ao controle.

Tabela 9 Efeito da salinidade na condutividade elétrica e extravasamento de eletrólitos de folhas de *physalis* cultivadas *in vitro*, em relação ao controle

Comparações	CE1	CE2	EE
Controle	19,08	28,96	65,88
0,5	27,66 ^{ns}	43,79 ^{ns}	63,17 ^{ns}
1,0	129,52 [*]	127,95 [*]	101,23 ^{ns}

* e ^{ns}, contrastes significativos e não significativos, respectivamente, pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

Para essas variáveis, a interação NaCl x Si não foi significativa, realçando ausência de efeito do Si na atenuação do estresse nessas características. Porém, segundo Zhu et al. (2004), algumas evidências sugerem que o Si diminui a permeabilidade da membrana plasmática e mantém a integridade e as funções da membrana, atuando contra a toxicidade salina. Esses mesmos autores relatam que o Si foi capaz de diminuir o extravasamento de eletrólitos de pepino (*Cucumis sativus* L.) cultivado sob salinidade elevada.

3.2.5 Anatomia foliar

A anatomia foliar também foi modificada pela ação do NaCl e do Si. Houve diferença significativa na interação para todas as variáveis anatômicas, com exceção da relação DP/DE (Tabela 1).

A densidade estomática (número de estômatos mm⁻²) foi reduzida quando se elevou a salinidade para 1% (Tabela 10). Porém, verifica-se que na concentração de 0,5% de NaCl, a adição de Si foi eficaz para que houvesse aumento dessa variável.

Tabela 10 Densidade estomática da face abaxial e espessura do limbo foliar de plantas de *physalis* cultivadas *in vitro* com diferentes combinações de NaCl e silício (Si)

Tratamentos	Si		
	0	0,5	1,0
NaCl	<i>Densidade estomática</i>		
0,5	32 aC	47 aA	41 aB
1,0	24 bA	27 bA	25 bA
	<i>Limbo foliar</i>		
0,5	178,61 aB	340,62 aA	219,70 aB
1,0	344,14 bB	360,71 aB	441,83 bA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Alguns estudos já mostraram que o estresse salino provoca redução no número de estômatos, a exemplo do estudo realizado por Romero-Aranda, Soria e Cuartero (2001) que mostra a redução da densidade estomática de cultivares de tomateiro cultivadas sob elevada salinidade, e do trabalho publicado por Parida, Das e Mitra (2004) que apresenta a redução no número de estômatos em folhas de *Bruguiera parviflora* sob estresse salino. Entretanto, não se sabe ao certo quais são os mecanismos pelos quais a salinidade regula essa característica. Em quinoa (*Chenopodium quinoa*), Shabala et al. (2012) observaram associação entre aumento da salinidade e consequente diminuição da densidade estomática. Os autores relacionaram essa redução ao aumento da suculência foliar que consiste no espessamento dos tecidos foliares com resultante aumento do volume de seiva (SHABALA; MAKAY, 2011). O aumento da suculência é uma resposta adaptativa de plantas glicófitas e ocorre por meio do aumento das células do mesofilo e dos vacúolos e é proposto que ela seja uma resposta direta ao efeito da salinidade com o intuito de aumentar a área de estocagem de Na⁺ e Cl⁻ (HAJIBAGHERI; HALL; FLOWERS, 1984).

Quando se compara todos os tratamentos com o controle, é possível observar que nos tratamentos em que havia adição de 0,5 g L⁻¹ de Si o número de

estômatos mm^{-2} não diferiu do controle, indicando assim a atuação do Si na mitigação do efeito danoso do sal, o qual havia reduzido a densidade (Tabela 11). O Si pode atuar no aumento da densidade com a finalidade de aumentar a captação de CO_2 e de manter a taxa fotossintética. O incremento da densidade estomática em plantas cultivadas *in vitro* com adição de Si já foi relatado na literatura (ASMAR et al., 2011; DIAS et al., 2014). Na Figura 7, pode ser visualizado o padrão de distribuição dos estômatos de todos os tratamentos.

Tabela 11 Densidade estomática e espessura do limbo foliar em folhas de *physalis* cultivadas *in vitro* sob estresse salino e presença de silício, em relação ao controle.

Comparações		DS	LF
NaCl	Si		
	Controle	45	186,75
0,5	0	32 *	178,61 ^{ns}
1,0	0	24 *	344,14 *
0,5	0,5	47 ^{ns}	340,62 *
1,0	0,5	27 *	360,71 *
0,5	1,0	41 ^{ns}	219,70 ^{ns}
1,0	1,0	25 *	441,83 *

* e ^{ns}: contrastes significativos e não significativos, respectivamente, pelo teste de Dunnett, à 5% de probabilidade.

DS = densidade estomática, em número de estômatos mm^{-2} ; LF = limbo foliar, em μm .

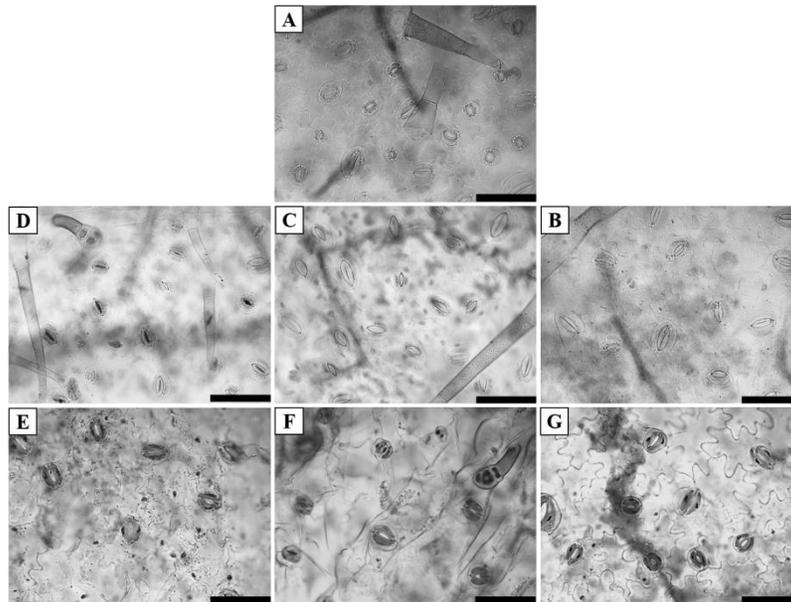


Figura 8 Densidade estomática da face abaxial de folhas de *physalis* cultivada *in vitro* com diferentes combinações de NaCl (0,5% e 1,0%) e silício (0; 0,5 e 1,0 g L⁻¹). **A**: controle; **B**: 0,5% NaCl + 0,0 g L⁻¹ Si; **C**: 0,5% NaCl + 0,5 g L⁻¹ Si; **D**: 0,5% NaCl + 1,0 g L⁻¹ Si; **E**: 1,0% NaCl + 0,0 g L⁻¹ Si; **F**: 1,0% NaCl + 0,5 g L⁻¹ Si; **G**: 1,0% NaCl + 1,0 g L⁻¹ Si. Barra = 25 μm

Quanto à relação diâmetro polar/diâmetro equatorial (DP/DE) não foi verificada significância entre os fatores, exceto quando são interpretados de forma isolada (Tabela 1). Analisando primeiramente o efeito do NaCl, é possível notar que o aumento em seus níveis foi acompanhado de aumento na relação DP/DE (Tabela 12). Apesar de a salinidade ter ocasionado redução do número de estômatos para evitar perda de água, a relação DP/DE foi aumentada para que a captação de CO₂ se mantivesse. Essa ação mostra como o vegetal possui certa plasticidade anatômica quando exposto em ambientes adversos.

Tabela 12 Relação diâmetro polar/diâmetro equatorial (DP/DE) dos estômatos da face abaxial de folhas de *physalis* cultivadas *in vitro* na presença de NaCl ou na de silício (Si)

NaCl (%)	DP/DE
0,5	2,15 b
1,0	2,31 a
Si (g L⁻¹)	
0,0	2,32 a
0,5	2,14 b
1,0	2,24 ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Já o aumento nas concentrações de Si não apresentou tendência claramente definida, podendo-se inferir apenas que a relação DP/DE diminui com adição de 0,5 g L⁻¹ de Si, e apresenta tendência de aumento quando a concentração sobe para 1,0 g L⁻¹ (Tabela 12).

Segundo Khan et al. (2002), a relação DP/DE é uma variável associada ao formato das células-guarda, sendo considerada indicadora da funcionalidade estomática, de forma que maiores valores para essa relação evidenciam maior funcionalidade dos estômatos, ou seja, o diâmetro polar possivelmente está maior fazendo com que o estômato tome o formato mais elíptico. Estômatos de formatos mais arredondados são considerados menos funcionais. Em antúrio cultivado *in vitro*, foi observado que a relação DP/DE aumentava à medida que se adicionava Si ao meio de cultivo até determinada concentração na qual, a partir dela, ocorria queda para essa variável (DIAS et al., 2014). Asmar et al. (2011) também encontraram aumento dessa relação em bananeira-maçã micropropagada na presença de Si, assim como também foi relatado em abacaxi “Gomo-de-mel” cultivado *in vitro* com adição desse elemento (BRAGA et al., 2009).

Na Tabela 13, verifica-se que, em comparação ao tratamento controle, a concentração de 1,0% de NaCl favoreceu o aumento da relação DP/DE, evidenciando o aumento da funcionalidade dos estômatos em situações de estresse salino. A adição de Si também foi significativa quando comparada ao tratamento controle.

Tabela 13 Relação diâmetro polar/diâmetro equatorial (DP/DE) dos estômatos da face abaxial de folhas de *physalis* cultivadas *in vitro* na presença de NaCl ou na de silício (Si), em relação ao controle

Comparações	DP/DE
Controle	2,02
NaCl (%)	
0,5	2,15 ^{ns}
1,0	2,31*
Si (g L ⁻¹)	
0,0	2,32*
0,5	2,14 ^{ns}
1,0	2,24*

* e ^{ns}, contrastes significativos e não significativos, respectivamente, pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

A exposição das plantas ao estresse salino bem como a adição de Si ao meio levaram a modificações significativas na espessura do limbo foliar (Tabela 10). O aumento dos níveis de salinidade ocasionou incremento significativo na espessura. Nos meios onde havia 0,5% de NaCl, a adição de 0,5 g L⁻¹ de Si favoreceu o aumento da espessura, enquanto no meio com salinidade mais elevada, a adição de 1,0 g L⁻¹ de Si acarretou em maior espessamento do limbo foliar.

É interessante observar que, em suma, o aumento nos níveis de estresse salino proporcionou aumento na espessura do limbo. Esse resultado vai ao

encontro com aqueles obtidos para a densidade estomática quando se leva em conta a suculência foliar. Já foi comentado que o aumento na espessura dos tecidos, ou seja, aumento na suculência foliar é uma resposta das plantas à exposição à salinidade. Para que o armazenamento de íons Na^+ e Cl^- e de água seja mais efetivo, a planta tende a aumentar a espessura do limbo visando ao aumento da área de estocagem. É importante salientar que o aumento dessa área contribui também para a manutenção dos teores de pigmentos como as clorofilas, uma vez que para que a área aumente é necessário que os tecidos do mesofilo, dentre eles os que possuem pigmentos, fiquem mais espessos. Nesse trabalho, esse comportamento pôde ser claramente observado.

3.2.6 Quantificação de DNA

A quantidade de DNA não foi afetada pelos dois níveis de salinidade impostos nem pelas concentrações de Si utilizadas (Tabela 1). A quantidade média de DNA encontrada foi de 10,68 pg, com base no padrão de referência *Solanum lycopersicum* (tomateiro). Quanto ao coeficiente de variação (CV), apenas o tratamento com 1,0% de NaCl apresentou diferença (Tabela 14). Ainda assim, esse valor mais alto de CV encontra-se dentro da faixa aceitável proposta por Marie e Brown (1993) que definem um espectro de valores de 1 a 2% para análises de alta qualidade. Dessa forma, embora o tratamento com maior concentração salina tenha apresentado CV maior, ainda encontrou-se na faixa permitida, fazendo com que a análise não ficasse comprometida.

Tabela 14 Conteúdo de DNA e coeficiente de variação de folhas de *physalis* cultivadas *in vitro* na presença de NaCl ou na de silício (Si)

NaCl (%)	DNA	CV
0,5	10,61 a	1,40 a
1,0	10,63 a	1,70 b
Si (g L⁻¹)		
0,0	10,68 a	1,38 a
0,5	10,52 a	1,57 a
1,0	10,66 a	1,71 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

DNA = conteúdo de DNA, em pg; CV = coeficiente de variação, em %.

Quando comparados ao controle, tanto o conteúdo de DNA como o CV não apresentaram diferenças significativas, o que indica mais uma vez que, no presente trabalho, as concentrações tanto de NaCl como de Si não interferiram nessas variáveis.

Tabela 15 Conteúdo de DNA e coeficiente de variação da análise citométrica de folhas de *physalis* cultivadas *in vitro* na presença de NaCl ou na de silício, em relação ao controle

Comparações	DNA	CV
Controle	11,01	1,25
NaCl (%)		
0,5	10,61 ^{ns}	1,43 ^{ns}
1,0	10,63 ^{ns}	1,70 ^{ns}
Si (g L ⁻¹)		
0,0	10,68 ^{ns}	1,38 ^{ns}
0,5	10,52 ^{ns}	1,57 ^{ns}
1,0	10,66 ^{ns}	1,71 ^{ns}

* e ^{ns}; contrastes significativos e não significativos, respectivamente, pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

DNA = conteúdo de DNA, em pg; CV = coeficiente de variação, em %.

O efeito inibitório do NaCl já foi relacionado à redução na divisão celular, caracterizado pela redução no índice mitótico, e ao aumento no número de aberrações nos cromossomos em várias fases da mitose que poderiam ocasionar diferenças na quantidade de DNA das plantas (TEERARAK et al., 2009). Além disso, o excesso de sal também poderia interferir em processos fisiológicos e bioquímicos como toxicidade de íons, desequilíbrio mineral e estresse oxidativo que proporcionariam interação com vários componentes celulares, dentre estes o DNA (ZHU et al., 2002). Porém neste trabalho, as concentrações de NaCl utilizadas não foram capazes de alterar a quantidade de DNA nuclear de *physalis*.

Pela Figura 8, é possível verificar que os picos sempre caem no mesmo canal, o que é um dos indicativos de que a quantidade de DNA se manteve igual.

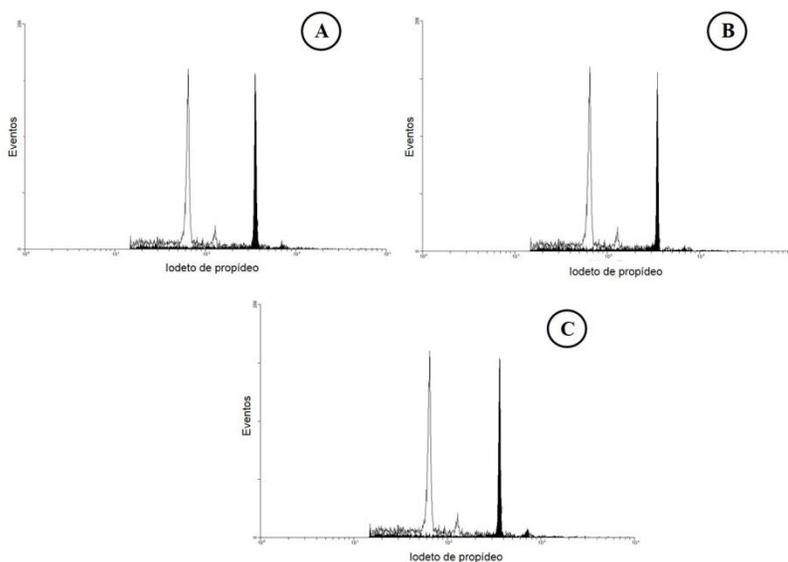


Figura 9 Histogramas gerados a partir da análise de folhas de plantas de *physalis* cultivadas em meio com diferentes combinações de NaCl e Si. (A) Controle; (B) Tratamento com 0,5% de NaCl; (C) Tratamento com 1,0% de NaCl. Picos nas cores branca e preta pertencem ao padrão de referência (tomateiro) e ao *physalis*, respectivamente

4 CONCLUSÕES

A utilização de concentrações crescentes de NaCl *in vitro* prejudica o crescimento, o conteúdo de pigmentos fotossintéticos, o extravasamento de eletrólitos e afeta a fotossíntese e a anatomia foliar de *Physalis peruviana*.

A suplementação com silício é capaz de minorar os efeitos salinos apenas quando a concentração de NaCl é de 0,5% e esse efeito só é observado para conteúdo de pigmentos e anatomia foliar.

A quantidade de DNA não foi afetada pelos tratamentos utilizados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AGASTIAN, P.; KINGSLEY, S. J.; VIVEKANANDAN, M. Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. **Photosynthetica**, Prague, v. 38, n. 2, p. 287-290, Nov. 2000.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.
- AMINI, F.; EHSANPOUR, A. A. Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na^+/K^+ changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) cultivars under *in vitro* salt stress. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, Lund, v. 1, n. 4, p. 212-216, 2005.
- ASMAR, S. A. et al. Fontes de silício no desenvolvimento de plântulas de bananeira 'Maçã' micropropagadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1127-1131, 2011.
- ATAÍDE, G. M.; FLORES, A. V.; BORGES, E. E. L. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Pterogyne nitens* Tull. durante o envelhecimento artificial. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, p. 71-76, 2012.
- BANDEOGLU, E. et al. Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 42, n. 1, p. 69-77, 2004.
- BASAVARAJAPPA, B. S.; SHETTY, H. S.; PRAKASH, H. S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n. 2, p. 279-286, Mar. 1991.
- BRAGA, F. T. et al. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 128-132, fev. 2009.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelfärbung astrablau-safranin. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.
- CAMPANELLI, A. et al. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) clones tolerant to salt stress: *in vitro* selection. **Central European Journal of Biology**, London, v. 8, n. 8, p. 765-776, 2013.

CASIERRA, F.; EBERT, G.; LÜDDERS, P. Efecto de la salinidade por cloruro de sodio sobre el balance de nutrientes em plantas de lulo (*Solanum quitoense*). **Agronomía Colombiana**, Bogota, v. 17, p. 85-90, 2000.

CLAYES, H. et al. What is stress?: dose-response effects in commonly used *in vitro* stress assays. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 165, n. 1, p. 519-517, 2014.

CRUZ, M. F. A. et al. Aspectos microscópicos da interação feijoeiro-*Colletotrichum lindemuthianum* mediados pelo silício. **Bragantia**, Campinas, v. 73, n. 3, p. 284-291, 2014.

CURRIE, H. A.; PERRY, C. C. Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, n. 7, p. 1383-1389, 2007.

DIAS, G. M. G. et al. Photosynthesis and leaf anatomy of *Anthurium* cv. Rubi plantlets cultured *in vitro* under different silicon (Si) concentrations. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 8, n. 8, p. 1160-1167, 2014.

DIAS, N. S.; BLANCO, F. F. Efeitos dos sais no solo e na planta. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. (Ed.). **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCTSal, 2010. p. 132-144.

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

DUFEY, I. et al. Silicon application in cultivated rices (*Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* Steud) alleviates iron toxicity symptoms through the reduction in iron concentration in the leaf tissue. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, v. 200, n. 2, p. 132-142, 2014.

EPSTEIN, E. The anomaly of silicon plant biology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, n. 1, p. 11-17, Jan. 1994.

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

ESTEVEES, B. S.; SUZUKI, M. S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 4, p. 662-679, 2008.

GRATTAN, S.; GRIEVE, C. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 78, n. 1/4, p. 127-157, Nov. 1999.

GULZAR, S.; KHAN, M. A.; UNGAR, I. A. Salt tolerance of a coastal salt marsh grass. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 34, n. 17/18, p. 2595-2605, Feb. 2003.

HAJIBAGHERI, M. A.; HALL, J. L.; FLOWERS, T. J. Stereological analysis of leaf cells of the halophyte *Suaeda maritima* (L.) Dum. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 35, n. 10, p. 1547-1557, 1984.

HARTER, L. S. H. et al. Salinidade e desempenho fisiológico de sementes e plântulas de mogango. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 80-85, jan./mar. 2014.

HASHEM, S. A.; MOHAMED, F. H.; ABO EL-FETOH, A. A. *In vitro* response of some potato cultivars to salt stress. **Assiut University Journal of Botany**, Warsaw, v. 40, n. 2, p. 111-126, 2005.

HODSON, M. J. et al. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, n. 1, p. 1027-1046, 2005.

IKBAL, F. E. et al. Enhanced salt-induced antioxidative responses involve a contribution of polyamine biosynthesis in grapevine plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 171, n. 10, p. 779-788, 2014.

JAMIL, M. et al. Effect of salinity on physiological and biochemical characteristics of different varieties of rice. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 44, n. 2, p. 7-13, Mar. 2012.

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

KAUSHAL, M. et al. Effect of salinity on survival and growth performance of *in vitro* grown rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) seeds. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v. 12, n. 1, p. 284-286, 2013.

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

KURABACHEW, H.; WYDRA, K. Induction of systemic resistance and defense-related enzymes after elicitation of resistance by rhizobacteria and silicon application against *Ralstonia solanacearum* in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Crop Protection**, Guildford, v. 57, n. 1, p. 1-7, 2014.

LAWLOR, D. W. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 83-108, Jan. 2013.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigment photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 148, p. 362-385, 1987.

LIU, J. H.; NAKAJIMA, I.; MORIGUCHI, T. Effects of salt and osmotic stresses on free polyamine content and expression of polyamine biosynthetic genes in *Vitis vinifera*. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 55, n. 2, p. 340-344, 2011.

MARIE, D.; BROWN, S. C. Acytopometric exercise in plant DNA histograms, with 2c values for seventy species. **Biology of the Cell**, London, v. 78, n. 1, p. 41-51, 1993.

MELO, G. M. et al. Pré-condicionamento *in vitro* de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) para tolerância ao estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, p. 27-33, 2014. Suplemento.

MENDES, B. S. S. et al. Mecanismos fisiológicos e bioquímicos do abacaxi ornamental sob estresse salino. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 3, p. 71-77, 2011.

METWALI, E. M. R. et al. Influence of different concentrations of salt stress on *in vitro* multiplication of some fig (*Ficus carica* L.) cultivars. **Life Science Journal**, New York, v. 11, n. 10, p. 386-397, 2014.

MIRANDA, D. et al. Salinity effects on proline accumulation and total antioxidant activity in leaves of the cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Gottingen, v. 87, n. 1, p. 67-73, Jan. 2014.

MOHAMMAD, M. et al. Tomato root and shoot responses to salt stress under different levels of phosphorus nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 21, n. 8, p. 1667-1680, 1998.

MOTOMURA, H.; MITA, N.; SUZUKI, M. Silica accumulation in long-lived leaves of *Sasa veitchii* (Carrière) Rehder (Poaceae-Bambusoideae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 90, n. 1, p. 149-152, Apr. 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 60, n. 3, p. 324-349, Mar. 2005.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B.; MITTRA, B. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. **Trees**, Berlin, v. 18, n. 2, p. 167-174, Mar. 2004.

PILON-SMITS, E. A. H. et al. Physiological functions of beneficial elements. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 267-274, 2009.

PUENTE, L. A. et al. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: a review. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 1733-1740, Aug. 2011.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 15 set. 2014.

RAHIMI, R. et al. Effects of salt stress and silicon nutrition on chlorophyll content, yield and yield components in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, London, v. 4, n. 21, p. 1591-1595, 2012.

RAI, M. K. et al. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection: an overview of the recent progress. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 71, n. 1, p. 89-98, 2011.

- RASOOL, S. et al. Salt stress: causes, types and responses of plants. In: AHMAD, P.; AZOOZ, M. M.; PRASAD, M. N. V. (Ed.). **Ecophysiology and responses of plants under salt stress**. New York: Springer, 2013. p. 1-4.
- RATHORE, S.; SINGH, N.; SINGH, S. K. Influence of NaCl on biochemical parameters of two cultivars of *Stevia rebaudiana* regenerated *in vitro*. **Journal of Stress Physiology and Biochemistry**, Taipei, v. 10, n. 2, p. 287-296, 2014.
- ROMERO-ARANDA, M. R.; SORIA, T.; CUARTERO, J. Tomato plant: water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. **Plant Science**, Shannon, v. 160, n. 2, p. 265-272, Jan. 2001.
- SÁ, F. P. et al. Desenvolvimento inicial *in vitro* de gliricídia em diferentes níveis de salinidade. **Scientia Plena**, Aracajú, v. 10, n. 4, p. 1-7, 2014.
- SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 104-114, jun. 2005.
- SHABALA, L. et al. Oxidative stress protection and stomatal patterning as components of salinity tolerance mechanism in quinoa (*Chenopodium quinoa*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 146, n. 1, p. 26-38, 2012.
- SHABALA, S.; MACKAY, A. Ion transport in halophytes. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 57, p. 151-187, Mar. 2011.
- SHI, Q. et al. Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis sativa* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 48, n. 2, p. 127-135, Feb. 2006.
- SILVA, E. A. A. et al. Alterações de isoenzimas em sementes de milho infectadas por fungos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1725-1732, set. 2000.
- SIVANESAN, I.; JEONG, B. R. Silicon promotes adventitious shoot regeneration and enhances salinity tolerance of *Ajuga multiflora* Bunge by altering activity of antioxidant enzyme. **The Scientific World Journal**, Cairo, v. 2014, p. 1-11, 2014.

SOUNDARARAJAN, P. et al. Silicon promotes shoot proliferation and shoot growth of *Salvia splendens* under salt stress *in vitro*. **Horticulture, Environment and Biotechnology**, New York, v. 54, n. 4, p. 311-318, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TEERARAK, M. et al. The impact of sodium chloride on root growth, cell division, and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in root tip cells of *Allium cepa* L. **Scientia Horticulturae**, Hague, v. 121, n. 2, p. 228-232, 2009.

ULISSES, C. et al. Seleção *in vitro* de gemas de bananeira ‘Nanicão’ tolerantes à salinidade. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 667-670, 2000.

WANG, X. S.; HAN, J. G. Effects of NaCl and silicon on ion distribution in the roots, shoots and leaves of two alfalfa cultivars with different salt tolerance. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 53, n. 3, p. 278-285, June 2007.

YASAR, F.; ELLIALTIOGLU, S.; YILDIZ, K. Effect of salt stress on antioxidante defense systems, lipid peroxidation, and chlorophyll content in green bean. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 55, n. 6, p. 782-786, 2008.

YIN, L. et al. Silicon-mediated changes in polyamine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid are involved in silicon-induced drought resistance in *Sorghum bicolor* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 80, n. 1, p. 268-277, 2014.

YUE, Y. et al. SOS1 gene overexpression increased salt tolerance in transgenic tobacco by maintaining a higher K⁺/Na⁺ ratio. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 169, n. 1, p. 255-261, 2012.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 247-273, 2002.

ZHU, Y.; GONG, H. Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 34, n. 2, p. 455-472, 2014.

ZHU, Z. J. et al. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, Shannon, v. 167, n. 3, p. 527-533, Setp. 2004.

CAPÍTULO 3 Expressão enzimática, teores de prolina e de CO₂ e atividade biológica de *Physalis* cultivada *in vitro* sob estresse salino e suplementação com silício

RESUMO

Physalis peruviana L. é uma espécie que não tolera elevadas concentrações de sais no ambiente de cultivo. A salinidade é um dos estresses abióticos mais prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento vegetal e há indícios de que o silício (Si), considerado um elemento benéfico para as plantas, possa atuar como elemento mitigador de estresses ambientais. Dessa forma, objetivou-se com a realização deste estudo avaliar o efeito do estresse salino *in vitro* induzido por NaCl em plantas de *Physalis* e o possível efeito atenuante do Si em condições salinas. Segmentos nodais foram inoculados em meio MS salino (0,5 e 1,0% de NaCl) com diferentes concentrações de Si (0; 0,5 e 1,0 g L⁻¹). A testemunha consistiu do meio sem adição de NaCl e Si. Expressão enzimática, teor de prolina e de CO₂ e atividade biológica foram avaliados após 30 dias. A análise eletroforética de isoenzimas mostrou que todas as enzimas tenderam a aumentar sua atividade com o aumento da concentração de sal. Nos padrões eletroforéticos das enzimas superóxido dismutase, esterase e malato desidrogenase, foi observado possível diminuição na expressão das enzimas nos tratamentos que continham Si. O teor de prolina aumentou com elevação da salinidade sendo observado efeito do Si no aumento dos níveis desse aminoácido. Foi observada alta taxa respiratória sob estresse salino e houve efeito do Si na redução dessa variável. A atividade biológica das folhas foi maior com elevação da concentração de sal e não verificou-se efeito do Si.

Palavras-chave: *Physalis peruviana* L. Estresse abiótico. Salinidade. Elemento benéfico. Isoenzimas. Osmólitos solúveis. Respiração. Biospeckle *laser*.

ABSTRACT

Physalis peruviana L. is a species that cannot tolerate high salt concentrations in the growth environment. Salinity is one of the most damaging abiotic stresses that affect plant growth and development, and there is evidence that silicon (Si), considered a beneficial element for plants, can act as a mitigating element of environmental stresses. This study aimed at evaluating the effect of *in vitro* salt stress NaCl-induced in physalis plants and the possible mitigating effect of Si in saline conditions. Nodal segments were inoculated in MS medium under saline conditions (0.5 and 1.0% NaCl) with different silicon concentrations (0.0, 0.5 and 1.0 g L⁻¹). The control treatment consisted of medium without addition of NaCl and Si. Isoenzyme expression, proline content, CO₂ content and biological activity were assessed after 30 days. Electrophoretic analysis showed that all the enzymes tended to increase their expression with increasing salt concentration. In the electrophoretic pattern of superoxide dismutase, esterase and malate dehydrogenase enzymes was observed possible decrease in their expression in the treatments containing Si. The proline content increased with increased salinity and Si effect was observed in order to increase the levels of this amino acid. High respiratory rate was verified under salt stress and Si showed performance in the reduction of this variable. The biological activity of the leaves was higher with increased salt concentration and there was no effect of Si.

Keywords: *Physalis peruviana* L. Abiotic stress. Salinity. Beneficial element. Isoenzymes. Soluble osmolytes. Respiration. Biospeckle laser.

1 INTRODUÇÃO

Physalis peruviana L., popularmente conhecida como physalis, joá ou cape gooseberry é uma espécie conhecida por suas propriedades nutricionais e exuberância de seus frutos (PUENTE et al., 2011). É rica em vitaminas A e C e minerais, além de possuir compostos considerados bioativos, a exemplo das fisalinas (WU et al., 2004). No Brasil a physalis ainda é pouco explorada comercialmente devido ao efeito da sazonalidade de produção, ao pouco hábito do brasileiro em consumir pequenos frutos e aos escassos resultados de pesquisa colocados à disposição do agricultor (MUNIZ et al., 2012). Porém, em outros países sua exploração já se encontra estabelecida, como é o caso da Colômbia onde a physalis foi cultivada em uma área de mais de 700 ha em 2011 (MIRANDA et al., 2014) em regiões entre 1.800 a 2.800 m acima do nível do mar, tornando-se a segunda fruta mais exportada pelo país que possui área de 600 mil ha afetada pela salinidade (CASIERRA; EBERT; LÜDDERS, 2000; MIRANDA et al., 2014).

A physalis, como a maioria das plantas hortícolas, é considerada uma espécie glicófita, ou seja, não possui tolerância à salinidade (GRATTAN; GRIEVE, 1999). O estresse salino é considerado como uma das principais ameaças ambientais à agricultura por afetar diversos aspectos da fisiologia do vegetal (HASHEMI; ABDOLZADEH; SADEGHIPOUR, 2010). A maioria das plantas, especialmente as glicófitas, é muito sensível às elevadas concentrações de Na⁺ que podem levar à morte celular devido às alterações na homeostase intracelular ocasionando disfunções na membrana, redução da atividade metabólica e efeitos secundários que causam inibição do crescimento (MIRANDA et al., 2014). As respostas morfofisiológicas das plantas à salinidade variam em função do genótipo, do estágio de desenvolvimento e da intensidade e duração do estresse. Produção de solutos compatíveis tais como a

prolina, modificações na taxa respiratória e alterações no metabolismo e na anatomia foliar são alguns dos mecanismos encontrados pelas plantas para tentar se manter em ambientes adversos (PARIDA; DAS, 2005).

O silício (Si) é um dos elementos considerados benéficos aos vegetais, uma vez que sua presença pode acarretar em melhoria de algumas características, enquanto sua ausência não possui efeitos significativos no ciclo de vida da maioria das plantas (VASANTHI; SALEENA; RAJ, 2014). Além de estimular e favorecer o crescimento vegetal, o Si também mostra atividade contra estresses abióticos (SHAKOOR, 2014). Estudos já mostraram que o Si pode aumentar a tolerância à salinidade em algumas culturas importantes tais como arroz (GONG; RANDALL; FLOWERS, 2006), cevada (LIANG et al., 2005), trigo (TUNA et al., 2008), cana-de-açúcar (ASHRAF et al., 2010), soja (LEE et al., 2010) e tomate (ROMERO-ARANDA; JURADO; CUARTERO, 2006), através da redução da toxicidade de íons e do dano oxidativo e da regulação da biossíntese de compostos solúveis (ZHU; GONG, 2014).

Com base em todas as informações apresentadas e levando-se em conta que, segundo Claeys et al. (2014), ensaios em condições *in vitro* que visem o entendimento do comportamento das plantas ao estresse salino são considerados totalmente viáveis, justificando-se a realização do presente trabalho.

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar as possíveis modificações na expressão isoenzimática, no teor de prolina e de CO₂ e na atividade biológica mensurada pelo speckle *laser* dinâmico de plantas de *physalis* cultivada sob estresse salino e suplementação com silício.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos nodais oriundos de plantas de *physalis* previamente cultivadas *in vitro* foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificados com 1,8 g L⁻¹ de phytagel e com pH ajustado para 5,8. O meio de cultivo foi adicionado de diferentes combinações de NaCl (0,5% e 1,0%) e de ácido silícico (0; 0,5 e 1,0 g L⁻¹).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 (duas concentrações de NaCl e três concentrações de ácido silícico) + um tratamento adicional representado pelo controle (sem adição de nenhum dos fatores). Cada tratamento foi composto de 40 tubos de ensaio com uma planta em cada.

O silício foi adicionado ao meio na forma de ácido silícico puríssimo (SiO₂.x H₂O). Após aplicação dos tratamentos, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas.

Após 30 dias, foram realizadas as seguintes avaliações:

Análise eletroforética de isoenzimas: Seis plantas por tratamento foram coletadas e armazenadas à temperatura de -86 °C. O material foi macerado em almofariz pré-resfriado com nitrogênio líquido e adicionado antioxidante polivinilpirrolidona (PVP). Foram feitas subamostras de 100 mg do material macerado nas quais foram adicionados 300 µL do tampão Tris HCl 0,2M pH 8,0 e β-mercaptoetanol 0,1%. O material foi homogeneizado em vortex e mantido por 12 horas em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4 °C. A eletroforese foi realizada em sistema de géis de poliacrilamida em sistema descontínuo (7,5% gel separador e 4,5% gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-Glicina pH 8,9. Foram aplicados 60 µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética efetuada a 120 V por 5 horas. Após o término da corrida, os géis

foram revelados para as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), esterase (EST) e malato desidrogenase (MDH), conforme Alfenas et al. (2006). A interpretação dos resultados foi baseada na análise visual dos géis de eletroforese, levando-se em consideração a presença e a ausência e a intensidade de expressão de cada uma das bandas.

Teor de prolina: Plantas inteiras foram coletadas e maceradas em uma mistura de metanol, clorofórmio e água (MCA) na proporção de 12:5:1 (v/v/v). A amostra foi centrifugada por 3 minutos a 4.000 rpm, sendo coletado o sobrenadante. No resíduo, foram adicionados 2 mL de MCA e novamente centrifugado e os sobrenadantes obtidos foram combinados. As etapas de lavagem, centrifugação e coleta foram novamente repetidas. O sobrenadante foi colocado em funil de separação, onde se adicionou 2,3 mL de água destilada e 1,5 mL de clorofórmio, agitando-se o funil levemente. A fase inferior foi descartada e a superior, utilizada para a quantificação de prolina. A prolina foi determinada pelo método de Messer (1961), e a leitura em espectrofotômetro a 509 nm, utilizou-se como padrão uma solução de prolina 10^{-4} M diluída com água na proporção de 1:1.

Análise da atividade respiratória: Cinco tubos de ensaio por tratamento foram avaliados quanto à atividade respiratória por meio da introdução de uma agulha que perfurava o plástico que vedava a abertura do tubo. Esse plástico impedia as trocas gasosas com o ambiente, mas permitia a entrada da agulha para retirada do ar. Essa agulha é acoplada ao aparelho PBI – Dansensor Checkpoint O_2/CO_2 que funciona com um leitor eletroquímico que absorve aproximadamente 15 mL da atmosfera da amostra e instantaneamente faz a leitura da quantidade de O_2 e CO_2 em porcentagem. Esses valores foram posteriormente divididos pelo peso das plantas presentes nos tubos e pelo tempo de 8 horas referente ao tempo de leitura final (padrão).

Atividade biológica com Biospeckle Laser (ou Speckle Laser Dinâmico): Os tubos de ensaio foram iluminados por uma luz coerente e os padrões de interferência, formados pela interação da luz com o material estudado, foram capturados por um microscópio digital. O microscópio foi disposto na posição anterior do tubo de ensaio, formando a configuração *forward-scattering*. A luz coerente utilizada foi proveniente de um laser diodo de cor verde, com comprimento de onda de 532 nm e corrente em torno de 66 mA, ampliadas por um conjunto de lentes suficientes para cobrir toda a amostra. A distância entre a lente e a amostra foi de 0,75 m (RIBEIRO et al., 2014). Os padrões de interferência formados pela interação da luz com o material estudado foram coletados por um microscópio portátil digital da marca Dinolite, modelo AM 413zt. A distância entre o microscópio e a amostra foi de 0,073 m. Em cada sessão de iluminação foi armazenado um conjunto de 128 imagens em níveis de cinza, com resolução de 1.280 x 1.024 pixels e intervalo de 0,08 s entre frames. A análise e interpretação dos dados foram realizadas no *software* MatLab.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008). Os dados foram submetidos à análise de variância e, em caso de ocorrência de diferenças significativas dos fatores ou entre a interação entre eles, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ou desdobradas por meio do teste Tukey e regressão, respectivamente. As comparações com o tratamento adicional (controle) foram analisadas pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O padrão eletroforético da SOD revelou que o aumento na concentração de NaCl acarretou em aumento na sua expressão (Figura 1A). Porém, no tratamento com 0,5% de NaCl combinado com a maior concentração de Si houve menor expressão dessa enzima, o que indica possível ação do Si como elemento atenuante do estresse salino. Em contrapartida, quando se observam as bandas formadas a partir do tratamento com 1,0% de NaCl, a expressão da SOD volta a ser maior, independente da adição ou não de Si no meio. Nesse caso, o Si provavelmente não foi capaz de mitigar os efeitos da salinidade em maior nível, devido aos maiores danos celulares que o NaCl deve ter acarretado.

Condições de estresses abióticos que são impostas às plantas levam à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO's) que podem causar lesões nas estruturas celulares, afetando-as muitas vezes de forma irreversível (BARBOSA et al., 2014). Porém, as plantas apresentam um eficiente sistema antioxidante que está envolvido com a atividade de muitas enzimas, dentre as quais podem ser citadas a SOD e a catalase (CAT) (ESTEVEES; SUZUKI, 2008). SOD e CAT são consideradas enzimas antioxidantes, capazes de eliminar as ERO's da célula (ZHU; GONG, 2014). A SOD é a enzima com maior poder de remoção de O_2^- . Ela catalisa a reação de dismutação de ânions superóxido em O_2 e H_2O_2 (SCANDALIOS, 1993). A remoção desse H_2O_2 (altamente tóxico) produzido é uma ação essencial para que a célula evite a inibição de outras enzimas, tais como aquelas controladoras do ciclo de Calvin, e essa remoção pode ser realizada pela CAT (PAN; WU; YU, 2006). Assim, fica claro a importância que essas duas enzimas possuem no controle das adversidades que ocorrem na célula.

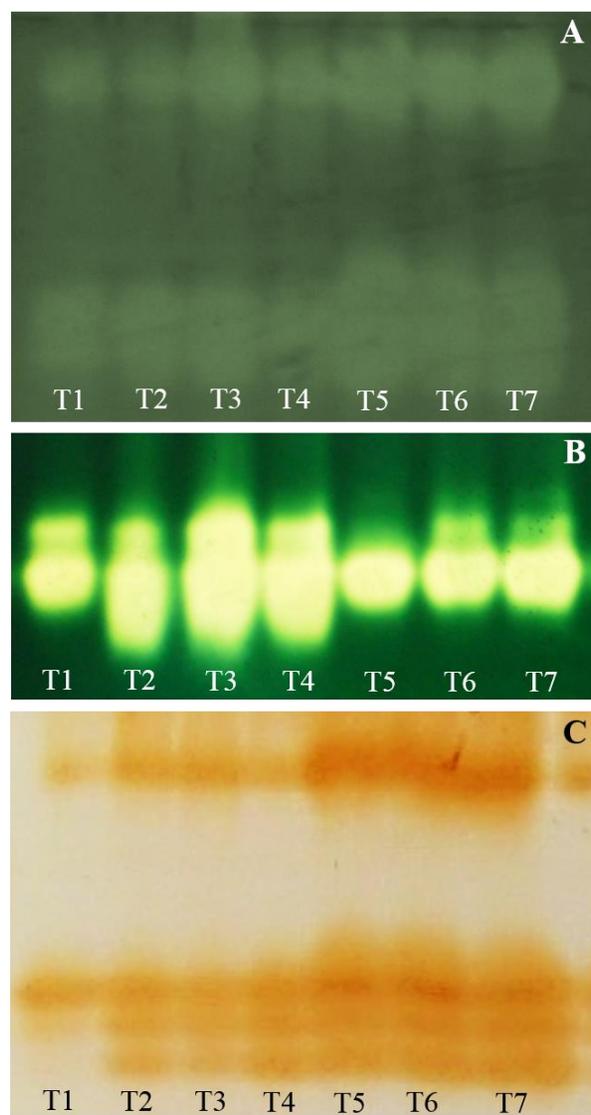


Figura 1 Padrões isoenzimáticos de plantas de *physalis* cultivadas *in vitro* em condições de salinidade e suplementação com Si, revelados para as isoenzimas superóxido dismutase – SOD (A), catalase – CAT (B) e peroxidase – POD (C)

O padrão eletroforético da CAT, apresentado na Figura 1B, mostra que a partir do momento que as plantas foram submetidas ao estresse salino (0,5% de NaCl) houve aumento expressivo na expressão dessa enzima. Maior expressão da CAT está relacionada à maior defesa contra a formação de H₂O₂ celular (BARBOSA et al., 2014). No entanto, quando a concentração salina foi aumentada, foi possível observar decréscimo na expressão da enzima, independente das concentrações de Si. Isso pode ser explicado pelo fato de que em condições mais severas de estresse, a célula diminui a produção da enzima CAT, que fica com atividade reduzida, a fim de diminuir o gasto energético celular. Em *Glycyrrhiza uralensis* cultivada sob estresse salino, a atividade da CAT também foi reduzida e os autores atribuíram essa redução na atividade da CAT à expressão de outras enzimas antioxidantes com maior capacidade de decomposição do H₂O₂ gerado, a exemplo das peroxidases (PAN; WU; YU, 2006).

A avaliação da peroxidase (POD) no presente trabalho confirmou a hipótese de que a redução da CAT poderia ser devido ao aumento da atividade de outras enzimas antioxidantes. De fato, quando se constatou que a CAT teve sua expressão reduzida, também foi verificado claro aumento na expressão da POD (Figura 1C). As peroxidases (PODs) de forma geral são enzimas altamente específicas na quebra do H₂O₂. Nas plantas, as PODs existem em muitas isoformas e estão envolvidas em uma série de processos celulares, sendo encontradas na parede celular e nos vacúolos. Algumas delas são expressas naturalmente, enquanto outras são induzidas por estresses ambientais, como constatado em estudos que mostram que baixas atividades indicam sintomas de estresse menos graves e altas indicam sintomas mais graves (BARBOSA et al., 2014). A atividade da POD pode servir como marcador bioquímico de estresses bióticos e abióticos e na identificação precoce de processos morfogênicos durante a diferenciação celular, crescimento e multiplicação de plantas

(BARBOSA et al., 2014; KIM; KWAN, 2010). Como já comentado anteriormente, Pan, Wu e Yu (2006) observaram que o estresse induzido em *G. uralensis* aumentou a atividade da POD, enquanto que a atividade da CAT reduziu significativamente, indicando que a POD teve maior competência para quebrar o H₂O₂ gerado pela SOD. Comportamento similar foi observado em raízes de arroz expostas à salinidade (KHAN; SINGHA; PANDA, 2002).

De forma geral, observou-se que a adição de Si não diferiu dos demais tratamentos que só apresentavam NaCl. Esses resultados vão ao encontro aos de Zhu et al. (2004) que também não encontraram diferenças na atividade da CAT em plantas de pepino cultivadas sob estresse salino com e sem Si. É interessante observar que quando a concentração de sal aumenta para 1%, a atividade da CAT diminui drasticamente, enquanto a atividade da SOD se eleva (Figura A, B). Isso mostra que ambas as enzimas possuem atuação conjunta. Resposta similar foi encontrada por Pan, Wu e Yu (2006), que em estudo com alcaçuz (*Glycyrrhiza uralensis*), observaram que o estresse salino imposto nas plantas acarretou em aumento na expressão da SOD em detrimento da expressão da CAT.

A esterase (EST) é uma enzima associada às reações de hidrólise de ésteres e está diretamente ligada ao metabolismo de lipídios e aos processos degenerativos das membranas celulares (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2004). Maior expressão da EST foi verificada na maior concentração de NaCl na ausência de Si (Figura 2A).

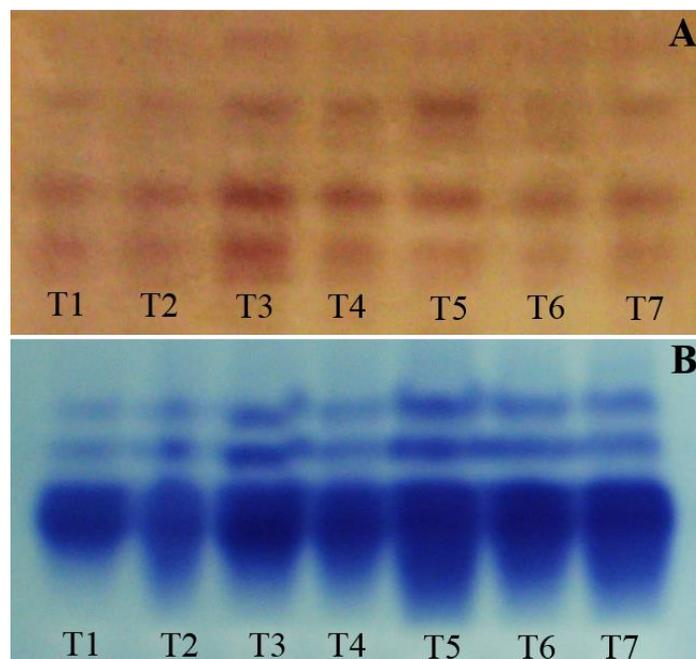


Figura 2 Padrões isoenzimáticos de plantas de physalis cultivadas *in vitro* em condições de salinidade e suplementação com Si, revelados para as isoenzimas esterase – EST (A) e malato desidrogenase – MDH (B)

A partir do momento que o Si é adicionado ao meio, pode ser observado que a atividade da EST diminui em algumas bandas. Esse fato pode ser atribuído à possível ação do Si na tolerância à salinidade. Sabe-se que em plantas acumuladoras o Si pode diminuir os níveis de Na^+ no citoplasma celular e aumentar o K^+ , através do estímulo da enzima H^+ -ATPase na membrana plasmática (MALY; AERY, 2008). Entretanto, ainda é desconhecido se realmente o Si regula de forma direta a atividade de transporte ou a expressão da proteína antiporte Na^+/H^+ sob estresse salino (ZHU; GONG, 2014). Essa proteína desempenha papel importante na manutenção da baixa concentração de Na^+ pela sua remoção do citosol (YUE et al., 2012). Porém, é bom salientar que a physalis não é uma espécie que acumula Si, e assim esses efeitos observados

para muitas espécies, podem não ser encontradas neste caso. Em tomateiro, cultura pertencente à mesma família do *physalis* e também considerada uma espécie não acumuladora de Si, a adição desse elemento não teve efeito nas concentrações de Na^+ e Cl^- das folhas, indicando que o Si não tem efeito relevante devido ao tomateiro ser uma planta considerada não acumuladora. Porém, o armazenamento de água no tomateiro melhorou com a adição de Si, e esse maior conteúdo de água contribuiu para a diluição dos sais reduzindo sua toxidez (ROMERO-ARANDA; JURADO; CUARTERO, 2006).

Com relação à MDH, sua expressão foi mais pronunciada nos tratamentos com maior concentração de NaCl. Entretanto, observa-se que quando houve adição de Si, a expressão dessa enzima tornou-se pouco menor (Figura 2B). A MDH está associada à biossíntese de oxalacetato (OAA), pela interconversão de malato para oxalacetato durante o ciclo de Krebs, possuindo importante função na respiração celular (WEEDEN; WENDEL, 1990) e assumindo grande importância em ampla variedade de reações biossintéticas como a síntese de aminoácidos, gliconeogênese, manutenção dos potenciais redox (LIN et al., 2003).

O aumento da expressão da MDH pode ser devido ao aumento da atividade da enzima em diferentes compartimentos celulares ou à indução da sua atividade expressa pela maior intensidade de bandas (SATTERS et al., 1994). Essa maior intensidade pode ter ocorrido devido ao aumento da respiração nas plântulas que estavam na presença de NaCl (principalmente na maior concentração), uma vez que nesses tratamentos os processos degenerativos possivelmente já estavam desencadeados e, conseqüentemente, as enzimas envolvidas na respiração foram ativadas.

Para teor de prolina, foi observada significância da interação NaCl x Si. De acordo com o desdobramento dentro de concentrações de NaCl é possível observar que o teor desse aminoácido aumentou à medida que se elevou o nível

de salinidade para 1% (Tabela 1). Também se verificou que ao nível de 1% de NaCl, o teor de prolina manteve-se elevado mesmo na presença de Si.

Tabela 1 Conteúdos de prolina ($\mu\text{mol g de peso fresco}^{-1}$) e de CO_2 ($\% \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em *physalis* cultivada *in vitro* em meio salino (0,5 e 1,0% de NaCl) adicionado de silício (Si) (0; 0,5 e 1,0 g L^{-1}), dentro de cada nível de Si, e significância do teste F

Tratamentos	Si		
	0	0,5	1,0
NaCl	<i>Prolina</i>		
0,5	0,107 b	0,113 b	0,117 b
1,0	0,133 a	0,142 a	0,168 a
Teste F	NaCl		*
	Si		*
	NaCl x Si		*
	Ft vs C		*
	<i>CO₂</i>		
0,5	0,052 a	0,467 a	0,490 a
1,0	1,404 b	0,230 a	0,242 a
Teste F	NaCl		*
	Si		*
	NaCl x Si		*
	Ft vs C		*

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Ft vs C = fatorial *versus* controle.

Pela Figura 3, nota-se que no maior nível de salinidade, a presença de Si no meio favoreceu aumento linear no teor de prolina.

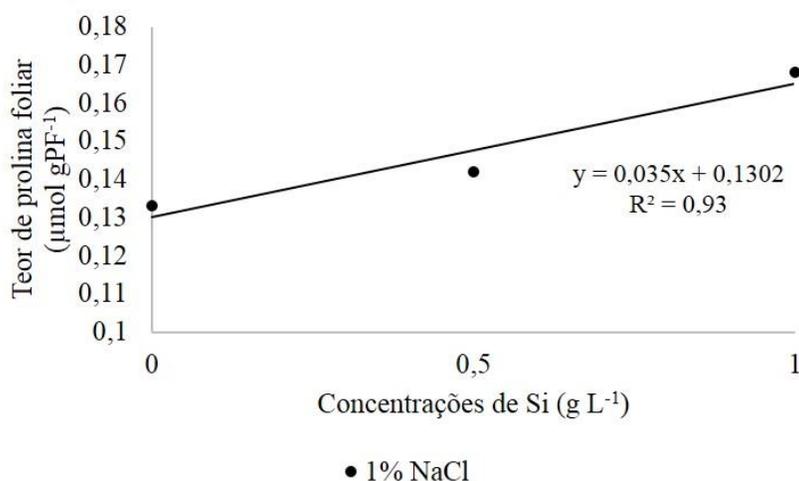


Figura 3 Teor de prolina de folhas de *physalis* cultivada *in vitro* com diferentes combinações de NaCl (0,5% e 1,0%) e silício (0; 0,5 e 1,0 g L⁻¹)

A prolina é considerada um dos solutos compatíveis mais importantes que são produzidos pelas células, juntamente com glicina betaína, açúcares e poliois (PARIDA; DAS, 2005). São assim denominados porque não interferem nas rotas bioquímicas normais e são considerados importantes osmólitos que regulam o balanço de água celular. A prolina é um aminoácido que está amplamente presente nas plantas superiores e normalmente se acumula em grandes quantidades em resposta aos estresses ambientais (LARCHER, 2003). Além de contribuir para o ajuste osmótico, a prolina também atua estabilizando membranas e proteínas, eliminando radicais livres e tamponando o potencial redox celular sob condições de estresse (ASHRAF; FOOLAD, 2007). A indução de expressão de genes de resposta ao estresse salino também é desempenhada pela prolina (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005). A síntese de prolina acontece no citosol ou nos cloroplastos e sua catálise ocorre nas mitocôndrias. O fato da prolina se acumular em altos níveis sob estresse salino levou muitos pesquisadores a suspeitar que ela também serve como fonte de energia

alternativa em condições de estresses abióticos e que a parte aérea das plantas parecem acumular mais prolina enquanto as raízes em desenvolvimento catabolizam-na em altas taxas, sugerindo que este aminoácido é uma importante fonte de energia para alguns tecidos (VERSLUES; SHARP, 1999).

O elevado teor de prolina observado neste trabalho pode ter sido causado por vários fatores, como: expressão de genes codificadores de enzimas-chave da síntese desse aminoácido, redução da taxa de conversão da oxidação de prolina à glutamato, redução da utilização de prolina na síntese de proteínas e melhoria no *turnover* proteico que nada mais é que a taxa com que proteínas velhas são degradadas e as novas são sintetizadas (SOBBAGH et al., 2014).

A maior concentração de NaCl, quando comparada ao tratamento controle, favoreceu aumento no teor de prolina, inclusive quando havia presença de Si (Tabela 2).

Tabela 2 Conteúdos de prolina ($\mu\text{mol g de peso fresco}^{-1}$) e de CO_2 ($\% \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em *physalis* cultivada *in vitro* sob estresse salino e presença de silício (Si), em relação ao tratamento controle

Comparações		Prolina	CO_2
NaCl	Si		
Controle		0,104	0,050
0,5	0	0,107 ^{ns}	0,052 ^{ns}
1,0	0	0,133 [*]	1,404 [*]
0,5	0,5	0,113 ^{ns}	0,467 ^{ns}
1,0	0,5	0,142 [*]	0,230 ^{ns}
0,5	1,0	0,117 [*]	0,490 ^{ns}
1,0	1,0	0,168 [*]	0,242 ^{ns}

* e ^{ns}; contrastes significativos e não significativos, respectivamente, pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

Segundo Amini e Ehsanpour (2005), o acúmulo de prolina é considerado uma característica de sensibilidade do tomateiro à salinidade que pode ser utilizada na seleção de plantas tolerantes. Esses mesmos autores observaram que cultivares de tomate cultivadas *in vitro* em meio salino apresentaram elevação do teor de prolina foliar, com picos máximos observados ao nível de 160 mM de NaCl. Aumento no teor desse aminoácido também foi encontrado para cultivos *in vitro* sob estresse salino de *Populus euphratica* (WATANABE et al., 2000), tomate e couve-flor (WAHID; HADI; JAN, 2014) e *Bacopa monnieri* (AHIRE et al., 2013). Miranda et al. (2014) observaram que folhas de *P. peruviana* apresentaram maiores teores de prolina com o aumento do tempo de exposição das plantas ao NaCl.

Neste trabalho, a concentração de O₂ liberada pelas plantas foi quantificada, porém não houve nenhuma diferença estatística entre os tratamentos, sendo verificada uma concentração média de 5,84% g⁻¹ h⁻¹ (dados não apresentados).

Por outro lado, a concentração de CO₂ aumentou com a elevação da salinidade (Tabela 1). A maior liberação de CO₂ para o meio é um indicativo de que a planta está respirando mais. Um dos estresses secundários decorrentes da salinidade é o estresse oxidativo, que ocorre especialmente nas folhas, decorrente do descontrole metabólico que envolve processos-chave como fotossíntese, respiração, fotorrespiração e o metabolismo celular em geral (SILVEIRA et al., 2010).

As reações-chave do consumo de O₂ ou produção de CO₂ pelas plantas podem ser medidas por meio das trocas gasosas de tecidos, plantas inteiras ou mesmo ecossistemas (LEAKEY et al., 2009). Entretanto, o comportamento da taxa respiratória em resposta à salinidade é complexo, pois muitos trabalhos mostram que essa variável aumenta, outros mostram redução e ainda há aqueles em que não há modificações (JACOBY; TAYLOR; MILLAR, 2011).

A vantagem de a planta apresentar taxa respiratória elevada é que mais ATP é produzido, fornecendo assim energia vital para o crescimento de novos tecidos e para mecanismos de defesa, como ajustamento osmótico e exclusão de sódio (JACOBY; TAYLOR; MILLAR, 2011). No entanto, o custo de altas taxas respiratórias é que o carbono é gasto na respiração ao invés de ser alocado para síntese de novos tecidos, limitando assim o crescimento (POORTER; REMKES; LAMBERS, 1990). Há indícios de que na parte aérea a homeostase respiratória, que é a capacidade da planta em manter a taxa respiratória constante em diversas condições ambientais, está relacionada à tolerância à salinidade, embora seja necessária a confirmação desse fato para número maior de espécies (JACOBY; TAYLOR; MILLAR, 2011).

Na Figura 4, é mostrado o papel do Si na atenuação do efeito do estresse salino a 1% de NaCl. Ademais, na comparação com a testemunha, a presença do Si no meio também mostra redução no teor de CO₂ (Tabela 2).

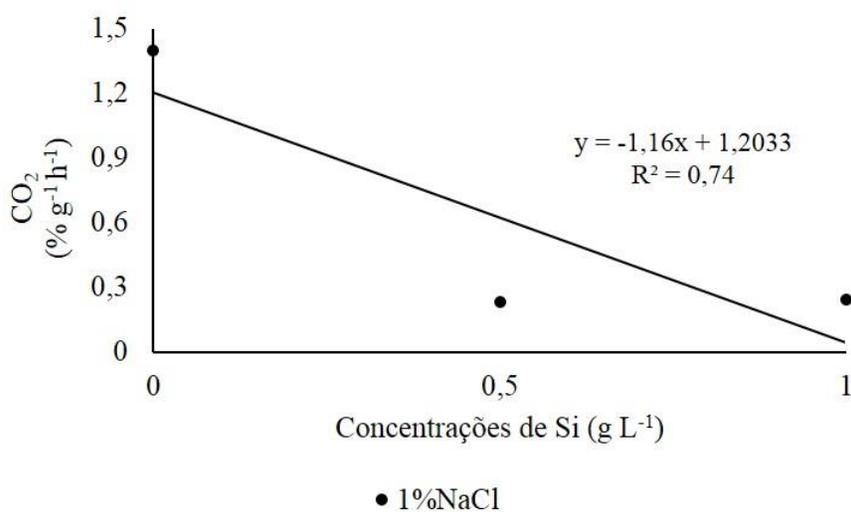


Figura 4 Teor de CO₂ em folhas de physalis cultivada *in vitro* com diferentes combinações de NaCl (0,5% e 1,0%) e silício (0; 0,5 e 1,0 g L⁻¹)

Detmann et al. (2013) já observaram alta correlação entre a concentração de Si e os níveis de compostos intimamente associados à respiração (isocitrato e 2-oxiglutarato) e a alguns aminoácidos. Os autores afirmam que quando estudados juntamente, fica claro que o Si desempenha um papel importante na regulação da taxa de fluxo de 2-oxiglutarato para o metabolismo de aminoácidos, confirmando o ponto de vista de que esse metabolismo é uma rede intrincadamente controlada.

A atividade biológica medida por meio da iluminação das folhas com o biospeckle *laser* foi significativa apenas para os fatores isolados. Foi constatado aumento da atividade à medida que se elevou o nível de salinidade do meio (Tabela 3).

Tabela 3 Atividade biológica (AB) em folhas de *physalis* cultivadas *in vitro* em meio salino (0,5 e 1,0% de NaCl), e significância do teste F

NaCl (%)	AB
0,5	18,40 b
1,0	23,38 a
Teste F	NaCl *
	Si *
	NaCl x Si ^{ns}
	Ft vs C *

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.

Essa maior atividade biológica nas folhas dos tratamentos que possuíam NaCl no meio de cultura pode ser explicada pela maior expressão de enzimas, por exemplo. Em situações de estresse, a planta em um primeiro momento, tenta se adaptar ao meio adverso, rearranjando seu aparato enzimático. Além disso, maior atividade respiratória e produção de osmólitos, que também foram

observados neste trabalho, são exemplos de como a atividade metabólica da planta torna-se alterada, refletindo na análise da atividade biológica.

As plantas quando são submetidas a algum tipo de estresse ambiental, seja ele de ordem biótica ou abiótica, respondem de forma a intensificar sua atividade biológica, uma vez que os sistemas de defesa do vegetal são desencadeados (PARIDA; DAS, 2005). Essa resposta pode perdurar ou pode diminuir com o passar do tempo devido ao aumento da duração do estresse, chegando a um ponto tal que, dependendo do nível de dano, suas respostas sejam praticamente nulas, podendo culminar na morte do vegetal.

Em comparação com o tratamento controle, nota-se que ambos os níveis de salinidade contribuíram para elevação do aumento da atividade, chegando a ser superior em até 75% na maior concentração (Tabela 4).

Tabela 4 Atividade biológica (AB) em folhas de *physalis* cultivadas *in vitro* em meio salino (0,5 e 1,0% de NaCl) em relação ao tratamento controle

NaCl (%)	AB
Controle	13,36
0,5	18,40 *
1,0	23,38 *

* e ^{ns}; contrastes significativos e não significativos, respectivamente, pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

Analisando o fator Si, verifica-se que sua adição ao meio de cultura contribuiu para a redução da atividade biológica das folhas de *physalis* (Figura 5).

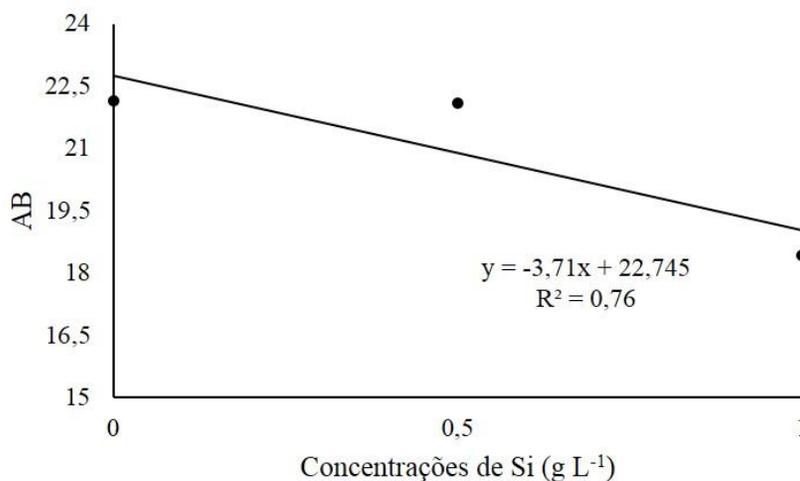


Figura 5 Atividade biológica em folhas de *physalis* cultivada *in vitro* com diferentes concentrações de silício

O *biospeckle* é uma técnica óptica que foi desenvolvida para que fosse possível analisar materiais biológicos de forma não destrutiva (ZHAO et al., 1997). Já vem sendo aplicada para muitos estudos tanto na área animal como vegetal (POMARICO et al., 2004; SENDRA et al., 2005). Na agricultura, a utilização de um *laser* de baixa potência e o fenômeno produzido por ele foram a base para muitas aplicações, considerando-se que a luz coerente, luz característica do *laser*, não exerce influência sobre a atividade do tecido analisado (BOTEGA et al., 2009).

Vários foram os trabalhos realizados com o *biospeckle laser* com a finalidade de estudar a atividade biológica de tecidos vegetais em diferentes situações. Alguns estudos podem ser citados, como, por exemplo, o trabalho feito com sementes de feijão que mostraram aumento da atividade biológica quando inoculadas com determinado fungo, retratando assim aumento do sistema de defesa contra estresse biótico (RABELO et al., 2011). Maçãs que sofreram injúria mecânica mostraram queda na atividade no local onde ocorreu o

dano físico (PAJUELO et al., 2003). Segundo Romero et al. (2009), a atividade biológica de frutos de tomateiro aumentava à medida que os mesmos amadureciam. O decréscimo nos conteúdos de clorofila era acompanhado de aumento da atividade biológica de frutos de macieira (ZDUNEK; HERPPICH, 2012).

Neste trabalho, a atuação do Si não apresentou efeito significativo na interação com o NaCl. Quando se observa seu efeito isolado, é possível verificar sua possível ação na redução desta variável. Na Figura 6, pode ser visualizado o perfil da atividade das folhas em todos os tratamentos.

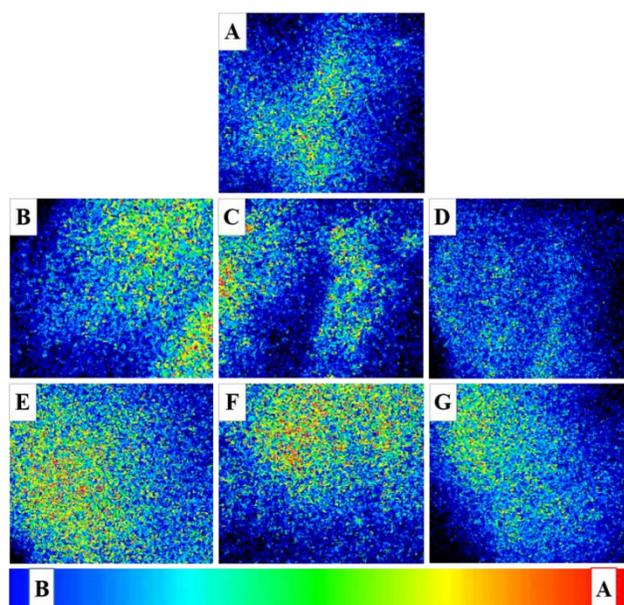


Figura 6 Imagens geradas a partir da iluminação com o biospeckle *laser* de folhas de plantas de *physalis* cultivadas *in vitro* em meio salino com adição de silício. **A**: controle; **B**: 0,5% NaCl + 0,0 g L⁻¹ Si; **C**: 0,5% NaCl + 0,5 g L⁻¹ Si; **D**: 0,5% NaCl + 1,0 g L⁻¹ Si; **E**: 1,0% NaCl + 0,0 g L⁻¹ Si; **F**: 1,0% NaCl + 0,5 g L⁻¹ Si; **G**: 1,0% NaCl + 1,0 g L⁻¹ Si. A barra colorida representa a escala da atividade biológica, em que as cores que tendem para o azul indicam baixa atividade (B), enquanto as que tendem para o vermelho indicam alta atividade (A)

4 CONCLUSÕES

Todas as enzimas apresentam tendência em aumentar sua expressão com o aumento da salinidade. O estresse salino também eleva o teor de prolina, o conteúdo de CO₂ e a atividade biológica nas folhas de *physalis*.

O Si mostra atuação como elemento mitigador de estresse nos padrões de expressão das enzimas superóxido dismutase, esterase e malato desidrogenase, no conteúdo de prolina e na taxa respiratória.

REFERÊNCIAS

AHIRE, M. L. et al. Effect of sodium chloride-induced stress on growth, proline, glycine betaine accumulation, antioxidative defence and bacoside A content in *in vitro* regenerated shoots of *Bacopa monnieri* (L.) Pennell. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 35, n. 6, p. 1943-1953, 2013.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.

AMINI, F.; EHSANPOUR, A. A. Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na^+/K^+ changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) cultivars under *in vitro* salt stress. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, Lund, v. 1, n. 4, p. 212-216, 2005.

ASHRAF, M. et al. Alleviation of detrimental effects of NaCl by silicon nutrition in salt-sensitive and salt-tolerant genotypes of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 326, n. 1/2, p. 381-391, Jan. 2010.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 59, n. 2, p. 206-216, Mar. 2007.

BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BOTEGA, J. V. L. et al. Avaliação da interferência do *laser* no material biológico vivo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, n. 4, p. 483-486, 2009.

CASIERRA, F.; EBERT, G.; LÜDDERS, P. Efecto de la salinidad por cloruro de sodio sobre el balance de nutrientes em plantas de lulo (*Solanum quitoense*). **Agromía Colombiana**, Bogota, v. 17, n. 1/3, p. 85-90, Mar. 2000.

CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J. K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 2, p. 437-448, Mar. 2005.

CLAYES, H. et al. What is stress?: dose-response effects in commonly used *in vitro* stress assays. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 165, n. 1, p. 519-517, 2014.

DETMANN, K. et al. Metabolic alterations triggered by silicon nutrition: is there a signaling role for silicon? **Plant Signaling and Behavior**, Bonn, v. 8, n. 1, p. 71-74, 2013.

ESTEVEES, B. S.; SUZUKI, M. S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 4, p. 662-679, 2008.

GONG, H. J.; RANDALL, D. P.; FLOWERS, T. J. Silicon deposition in root reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by reducing by-pass flow. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1970-1979, Oct. 2006.

GRATTAN, S.; GRIEVE, C. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 78, n. 1/4, p. 127-157, Nov. 1999.

HASHEMI, A.; ABDOLZADEH, A.; SADEGHIPOUR, H. R. Beneficial effects of silicon nutrition in alleviating stress in hydroponically grown canola, *Brassica napus* L. plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 56, n. 2, p. 244-253, Apr. 2010.

JACOBY, R. P.; TAYLOR, N. L.; MILLAR, H. The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, n. 11, p. 614-623, 2011.

KHAN, M. H.; SINGHA, K. L. B.; PANDA, S. K. Changes in antioxidant levels in *Oryza sativa* L. roots subjected to NaCl-salinity stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 24, n. 2, p. 145-148, 2002.

KIM, Y. H.; KWAK, S. S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S. D. (Ed.). **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science, 2010. p. 129-150.

LARCHER, W. **Physiological plant ecology**. 4th ed. Berlin: Springer-Verlag, 2003. 513 p.

LEAKEY, A. D. B. et al. Genomic basis for stimulated respiration by plants growing under elevated carbon dioxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 9, p. 3597-3602, 2009.

LEE, S. K. et al. Effect of silicon on growth and salinity stress of soybean plant grown under hydroponic system. **Agroforestry Systems**, Heidelberg, v. 80, n. 3, p. 333-340, Nov. 2010.

LIANG, Y. C. et al. Effects of silicon on H⁺-ATPase and H⁺-PPase activity, fatty acid and composition and fluidity of tonoplast vesicles from roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 53, n. 1, p. 29-37, Feb. 2005.

LIN, C. F. et al. Cloning and prokaryotic expression of a cDNA encoding a putative mitochondrial malate dehydrogenase in *Oryza sativa*. **DNA Sequence**, Cambridge, v. 14, n. 1, p. 75-77, 2003.

MALI, M.; AERY, N. C. Influence of silicon on growth, relative water contents and uptake of silicon, calcium and potassium in wheat grown in nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 31, n. 11, p. 1867-1876, Oct. 2008.

MESSER, M. Interference by amino acids and peptides with the photometric estimation of proline. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 2, n. 4, p. 353-359, Aug. 1961.

MIRANDA, D. et al. Salinity effects on proline accumulation and total antioxidant activity in leaves of the cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Gottingen, v. 87, n. 1, p. 67-73, Jan. 2014.

MUNIZ, J. et al. Principais pesquisas realizadas com o cultivo de *Physalis* no Sul do Brasil. In: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DA PHYSALIS, 3., 2012, Lages. **Anais...** Lages: UDESC, 2012. p. 56-79.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

PAJUELO, M. et al. Bio-speckle assessment of bruising in fruits. **Optics and Lasers in Engineering**, London, v. 40, n. 1/2, p. 13-24, July/Aug. 2003.

PAN, Y.; WU, L. J.; YU, Z. L. Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis*

Fisch). **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 49, n. 2/3, p. 157-165, July 2006.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 60, n. 3, p. 324-349, Mar. 2005.

POMARICO, J. A. et al. Speckle interferometry applied to pharmacodynamic studies: evaluation of parasite motility. **European Biophysics Journal**, New York, v. 33, n. 8, p. 694-699, Dec. 2004.

POORTER, H.; REMKES, C.; LAMBERS, H. Carbon and nitrogen economy of 24 wildspecies differing in relative growth rate. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 94, n. 2, p. 621-627, 1990.

PUENTE, L. A. et al. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: a review. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 1733-1740, Aug. 2011.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 15 set. 2014.

RABELO, G. F. et al. Frequency response of biospeckle laser images of bean seeds contaminated by fungi. **Biosystems Engineering**, London, v. 110, n. 3, p. 297-301, Nov. 2011.

RIBEIRO, K. M. et al. Continuous, high-resolution biospeckle imaging reveals a discrete zone of activity at the root apex that responds to contact with obstacles. **Annals of Botany**, Oxford, v. 113, n. 3, p. 555-563, 2014.

ROMERO, G. G. et al. Bio-speckle activity applied to the assessment of tomato fruit ripening. **Biosystems Engineering**, London, v. 103, n. 1, p. 116-119, May 2009.

ROMERO-ARANDA, M. R.; JURADO, O.; CUARTERO, J. Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, n. 1, p. 847-855, 2006.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004.

SATTERS, J. R. et al. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science**, Londrina, v. 4, n. 1, p. 33-41, Mar. 1994.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 1, p. 7-12, Jan. 1993.

SENDRA, G. H. et al. Decomposition of biospeckle images in temporary spectral bands. **Optics Letters**, Washington, v. 30, n. 13, p. 1641-1643, 2009.

SHAKOOR, S. A. Silicon to silica bodies and their potential roles: an overview. **International Journal of Agricultural Sciences**, Cambridge, v. 4, n. 2, p. 111-120, 2014.

SILVEIRA, J. A. G. et al. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. (Ed.). **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCTSal, 2010. p. 166-185.

SOBBAGH, E. et al. The effect of salt stress on respiration, PSII function, chlorophyll, carbohydrate and nitrogen content in crop plants. **International Journal of Farming and Allied Sciences**, Peshawar, v. 3, n. 9, p. 988-993, 2014.

TUNA, A. L. et al. Silicon improves salinity tolerance in wheat plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 62, n. 1, p. 10-16, Jan. 2008.

VASANTHI, N.; SALEENA, L. M.; RAJ, S. A. Silicon in crop production and crop protection: a review. **Agricultural Reviews**, New Delhi, v. 35, n. 1, p. 14-23, 2014.

VERSLUES, P. E.; SHARP, R. E. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials: II., metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 119, n. 4, p. 1349-1360, Apr. 1999.

WAHID, A.; HADI, F.; JAN, A. U. *In vitro* assessment of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and cauliflower (*Brassica oleracea*) seedlings growth and proline production under salt stress. **International Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 4, n. 9, p. 109-115, 2014.

WATANABE, S. et al. Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica in vitro*. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n. 3, p. 199-206, 2000.

WEEDEN, N. F.; WENDEL, J. F. Genetics of plant isozymes. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. (Ed.). **Isozymes in plant biology**. London: Chapman and Hall, 1990. p. 46-72.

WU, S. J. et al. *Physalis peruviana* extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 215, n. 2, p. 199-208, 2004.

YUE, Y. et al. SOS1 gene overexpression increased salt tolerance in transgenic tobacco by maintaining a higher K⁺/Na⁺ ratio. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 169, n. 1, p. 255-261, 2012.

ZDUNEK, A.; HERPPICH, W. B. Relation of biospeckle activity with chlorophyll content in apples. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 58-63, Feb. 2012.

ZHAO, Y. et al. Point-wise and whole-field laser speckle intensity fluctuation applied to botanical specimen. **Optics and Lasers in Engineering**, Lausanne, v. 28, n. 6, p. 443-456, Dec. 1997.

ZHU, Y.; GONG, H. Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 34, n. 2, p. 455-472, 2014.

ZHU, Z. J. et al. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, Shannon, v. 167, n. 3, p. 527-533, Sept. 2004.

CAPÍTULO 4 Efeito da utilização de silício nas características fisiológicas de *physalis* cultivada em casa de vegetação

RESUMO

O silício (Si) é um elemento não essencial às plantas, porém é considerado benéfico devido à existência de indícios de melhoria em algumas características vegetais. Com a realização deste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito da aplicação de Si nas características fisiológicas de *physalis* cultivada em casa de vegetação. O Si foi aplicado na forma de solução de ácido silícico nas doses de 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g kg substrato⁻¹, via *drench*. Após 60 dias, avaliaram-se a quantidade de Si foliar, estimativa do teor de clorofila via índice SPAD, trocas gasosas, teor de lignina e expressão da enzima polifenoloxidase. Os resultados mostraram que a aplicação de diferentes doses de Si não influenciou no teor de Si foliar, porém verificou-se maior teor do elemento nas folhas velhas. Como consequência, as características fisiológicas avaliadas não sofreram nenhum efeito. De acordo com as condições deste experimento, conclui-se que a *physalis* apresenta comportamento de planta não acumuladora de Si.

Palavras-chave: Elemento benéfico. Clorofila. Trocas gasosas. Lignina. Enzima.

ABSTRACT

Silicon (Si) is a non-essential element for plants, but it is considered beneficial because there is evidence that it provides some improvement in plant characteristics. This study aimed at evaluating the effect of Si on physiological characteristics of physalis grown in greenhouse. Si application was carried out using silicic acid solution in doses of 0.0; 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0 g kg⁻¹ substrate, via drench. After 60 days the following leaf characteristics were evaluated: amount of Si, estimation of chlorophyll content via SPAD index, gas exchange, lignin content and expression of polyphenoloxidase. The results showed that the application of different Si concentrations did not affect the leaf Si content, but there was a higher content of this element in the old leaves. Consequently, the measured physiological characteristics suffered no effect. Under the conditions of this experiment, it is concluded that physalis presents a Si non-accumulator species behavior.

Keywords: Beneficial element. Chlorophyll. Gas exchange. Lignin. Enzyme.

1 INTRODUÇÃO

A physalis (*Physalis peruviana* L.) é uma espécie solanácea de ampla distribuição na América do Sul. No Brasil, sua exploração comercial ainda encontra-se pequena quando comparada à produção de outros países como Colômbia e Equador, considerados grandes exportadores dessa fruta (FISCHER; ALMANZA-MERCHÁN; MIRANDA, 2014). A produção brasileira é de aproximadamente 2 a 3 t de fruto por ano e a comercialização é feita em grandes supermercados a preços elevados, o que torna a physalis uma alternativa interessante para pequenos produtores (RUFATO et al., 2008).

O interesse pela physalis é crescente, uma vez que a espécie possui rica composição nutricional e presença de compostos bioativos, características que atraem tanto o consumidor como empresas farmacêuticas e alimentícias (PUENTE et al., 2011).

O silício (Si), por ser um elemento abundante no ambiente, não é considerado essencial às plantas. Porém, é tido como elemento benéfico devido às melhorias que pode proporcionar em alguns caracteres agrônômicos de interesse (MA; MIYAKE; TAKAHASHI, 2001). Melhoria da arquitetura foliar, incremento nos teores de clorofila e na taxa fotossintética, indução de resistência contra doenças e pragas e aumento na produtividade são alguns exemplos de como esse elemento pode favorecer o ciclo de vida da planta (EPSTEIN, 2001). A melhoria dessas características já foi observada para diversas espécies, notadamente nas monocotiledôneas devido à facilidade com que esse grupo de plantas acumula esse elemento (CRUSCIOL et al., 2013).

Além dos elementos essenciais, o Si também é pouco estudado para a cultura da physalis. Segundo Lana et al. (2003), a disponibilidade, absorção e acúmulo de Si pelas plantas, à exceção das gramíneas, não tem sido estudada com tanta intensidade quando comparada aos macro e micronutrientes.

Assim, com a realização do presente trabalho, objetivou-se avaliar o efeito da aplicação de Si nas características fisiológicas de physalis cultivada em casa de vegetação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação localizada em Lavras - MG no período de julho a dezembro de 2014. O município está situado a 21°14'06" S e 45°00'00" W, a uma altitude média de 918 m.

Sementes de *P. peruviana* foram semeadas em bandejas de polipropileno preenchidas com substrato comercial Tropstrato®. Após 40 dias, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade para 3 kg com o mesmo substrato utilizado na sementeira. Segundo o fabricante, Tropstrato® é um substrato a base de casca de pinus, turfa e vermiculita expandida, além de ser enriquecido com macro e micronutrientes. Possui umidade de 60% (p/p), capacidade de retenção de água de 130% (p/p), densidade de 200 kg m⁻³ (base seca) e pH em torno de 5,8 ± 0,3 (VIDA VERDE, 2014).

O substrato foi adubado com 4 g vaso⁻¹ de fertilizante constituído do formulado 8-11-38 e demais macro e micronutrientes. Adubações de manutenção foram realizadas semanalmente com solução nutritiva (20,6 mmol L⁻¹ NH₄NO₃, 18,7 mmol L⁻¹ KNO₃, 1,25 mmol L⁻¹ KH₂PO₄, 2,99 mmol L⁻¹ CaCl₂, 1,5 mmol L⁻¹ MgSO₄, 0,1 mmol L⁻¹ Na₂EDTA, 0,1 mmol L⁻¹ FeSO₄, 0,1 mmol L⁻¹ H₃BO₃, 0,07 mmol L⁻¹ MnSO₄, 0,03 mmol L⁻¹ ZnSO₄, 0,001 mmol L⁻¹ Na₂MoO₄, 0,0001 mmol L⁻¹ CuSO₄, 0,0001 mmol L⁻¹ CoCl₂, 0,005 mmol L⁻¹ KI).

Decorridos 20 dias, foi realizada a aplicação de silício na forma de solução de ácido silícico puríssimo (SiO₂.xH₂O), nas seguintes concentrações: T1 = 0,0 g kg substrato⁻¹ (controle); T2 = 1,0 g kg substrato⁻¹; T3 = 2,0 g kg substrato⁻¹; T4 = 3,0 g kg substrato⁻¹ e T5 = 4,0 g kg substrato⁻¹. A aplicação foi via *drench*, no solo ao redor do caule das plantas. Os vasos foram dispostos de forma aleatória em espaçamento 0,5 x 1,0 m. Cada tratamento foi constituído por 10 repetições, sendo cada uma representada por um vaso (Figura 1).



Figura 1 Início do experimento com realização da sementeira em tubetes (a), crescimento das mudas (b) e instalação do experimento em casa de vegetação (c-d). Aspecto das plantas no momento da aplicação de Si (e) e 60 dias após (f). Lavras, 2014

As avaliações foram realizadas após 60 dias da aplicação do Si. Como não existe na literatura informações sobre qual é a folha-diagnóstico da *physalis*,

optou-se por coletar folhas em três posições diferentes da planta, sendo elas: apical, mediana e basal. A posição basal foi referente à porção basal do caule até a primeira bifurcação da planta, enquanto que para a porção apical foram consideradas as folhas mais jovens (segunda folha expandida). Já a porção mediana foi intermediária entre as outras duas estando, porém acima da primeira bifurcação da planta (Figura 2).

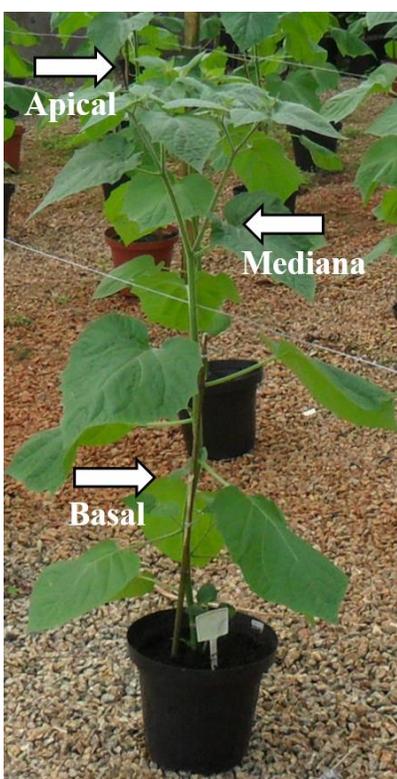


Figura 2 As três regiões de coleta (apical, mediana e basal) das folhas de *physalis* para quantificação de Si e análises fisiológicas em função de doses crescentes de ácido silícico. Lavras, 2014

Foram realizadas as seguintes avaliações:

Quantificação do teor de Si foliar: As folhas coletadas foram secas até massa constante em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C, moídas, pesadas e analisadas em relação ao teor de Si segundo metodologia proposta por Korndörfer, Pereira e Nolla (2004).

Índice SPAD (Estimativa do conteúdo de clorofila): Com o medidor SPAD-502 (Minolta Camera Co. Ltd.) foram realizadas as medições nas três posições da planta. Foram avaliadas três folhas em cada posição.

Trocas gasosas: As trocas gasosas foram mensuradas com analisador de trocas gasosas por infravermelho IRGA (Infra-Red Gas Analyzer) modelo LiCor-6400xt. Foram utilizadas cinco plantas por tratamento e a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos foi fixada na câmara do equipamento com utilização de fonte artificial fixada em 1.000 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Determinou-se assim a taxa fotossintética (A) em $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, taxa transpiratória (E) em $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e condutância estomática (gs) em $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Teor de lignina: O material macerado para análise isoenzimática foi o mesmo para determinação do teor de lignina, seguindo posteriormente metodologia de Capeleti et al. (2005).

Expressão da isoenzima polifenoloxidase: Quatro folhas de cada posição por tratamento foram coletadas e armazenadas à temperatura de -86 °C. O material foi macerado em almofariz pré-resfriado com nitrogênio líquido e adicionado antioxidante polivinilpirrolidona (PVP). Foram feitas subamostras de 100 mg do material macerado nas quais foram adicionados 300 μL do tampão Tris HCl 0,2M pH 8,0 e β -mercaptoetanol 0,1%. O material foi homogeneizado em vortex e mantido por 12 horas em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4 °C. A eletroforese foi realizada em sistema de géis de poli(acrilamida) em sistema descontínuo (7,5% gel separador e 4,5% gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-Glicina pH

8,9. Foram aplicados 60 μ L do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética efetuada a 120 V por 5 horas. Após o término da corrida, os géis foram revelados para a enzima polifenoloxidase (PPO) conforme Alfenas et al. (2006). A interpretação dos resultados foi baseada na análise visual dos géis de eletroforese, levando-se em consideração a presença e a ausência e a intensidade de expressão de cada uma das bandas.

Durante a condução do experimento foram efetuadas desbrotas e controle químico de pragas com base em observações periódicas das plantas. Utilizou-se irrigação por sistema de gotejamento com turno de rega médio de 12 em 12 horas e lâmina d'água média de 450 mL dia⁻¹.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e dez repetições. Para quantificação de Si, foi considerado esquema fatorial (doses x posições na planta) e, para as demais avaliações, utilizou-se esquema simples. Os dados foram submetidos à análise de variância, e na ocorrência de significância, realizou-se a análise de regressão com auxílio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na análise de variância, observou-se que independentemente das doses de Si aplicadas, não houve incremento no teor de Si foliar de *physalis*. Entretanto, quando se observa as três regiões na planta, é possível verificar que o teor de Si foi maior nas folhas da região basal quando comparadas com as folhas da posição apical, ou seja, as folhas mais velhas da planta tendem a acumular maior teor de Si que as folhas mais jovens (Tabela 1).

Tabela 1 Teores de silício em folhas coletadas de três posições diferentes na planta de *physalis* em função de doses crescentes de ácido silícico. Lavras, 2014

Doses de AS (g kg substrato ⁻¹)	Folhas da região apical	Folhas da região mediana	Folhas da região basal
	----- % -----		
0,0	0,345	0,355	0,365
1,0	0,355	0,355	0,365
2,0	0,360	0,355	0,365
3	0,360	0,370	0,365
4	0,360	0,360	0,370
Média	0,356 b	0,359 ab	0,366 a

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

Comportamento similar foi observado por Lana et al. (2003) para a cultura do tomateiro. De acordo com os autores, o tomateiro não respondeu à aplicação de Si, de modo que os teores foliares desse elemento permaneceram equivalentes em todas as doses utilizadas. Porém, foi verificado que apesar do

acúmulo ter sido o mesmo, o teor de Si foi maior nas folhas mais velhas do que nas folhas jovens de tomateiro.

Segundo Miyake e Takahashi (1985) e Takahashi, Ma e Miyake (1990), as plantas podem ser divididas em grupos em função de sua capacidade de acumular Si. Plantas acumuladoras são aquelas que possuem processo ativo de absorção de Si ligado à respiração aeróbica e apresentam teor foliar acima de 10 g kg⁻¹ de Si na matéria seca, sendo representadas principalmente pelas gramíneas (Poaceae). Por outro lado, as plantas não acumuladoras são consideradas aquelas que possuem teor foliar de Si muito baixo, mesmo com altas concentrações do elemento no meio de cultivo. Essas plantas não alcançam um teor de 5 g kg⁻¹ de Si na matéria seca, apontando a existência de algum processo de exclusão. Algumas leguminosas e o tomateiro são exemplos de plantas não acumuladoras. No caso do tomateiro, o Si é acumulado em sua maior parte nas raízes.

Mais tarde, Ma e Takahashi (2002) apresentaram uma árvore filogenética das espécies acumuladoras de Si. Os mesmos autores também propuseram um critério que diferencia as plantas em acumuladoras e não acumuladoras, sendo que as acumuladoras possuem teor de Si > 1% e relação [Si]/[Ca] > 1, enquanto as não acumuladoras (também denominadas de “exclusoras”) apresentam teor de Si < 0,5% e relação [Si]/[Ca] < 0,5. Plantas que não obedecem nenhum dos critérios foram as chamadas plantas intermediárias. No presente trabalho, o teor de Si foi menor que 0,5% e, de acordo com os autores, a *physalis* pode ser considerada não acumuladora. Diferenças na absorção de Si podem ser encontradas até mesmo em genótipos de uma mesma espécie e mesmo que o acúmulo seja uma característica filogenética, a disponibilidade de Si também irá influenciar na quantidade de Si absorvido pelas plantas (GUNTZER; KELLER; MEUNIER, 2012).

Além disso, no período de condução do experimento, as plantas de *physalis* não sofreram nenhum estresse e a irrigação ocorreu de forma uniforme.

Esse fato também pode explicar a ausência dos efeitos das doses de Si. É sabido que as respostas à aplicação de Si são potencializadas quando as culturas são submetidas a algum tipo de estresse (CURRIE; PERRY, 2007). Nesse contexto, mesmo plantas consideradas não acumuladoras podem apresentar absorção desencadeada sob condições adversas (OLIVEIRA, 2009).

Com base nos resultados da análise foliar, esperava-se que as características fisiológicas avaliadas não apresentassem significância, uma vez que o aumento das doses de Si não contribuiu para o aumento do teor foliar. Com a avaliação e análise dos dados das variáveis respostas, essa hipótese pôde ser afirmada.

As médias do índice SPAD em todas as doses foram equivalentes entre si, mostrando não haver resposta em relação à estimativa do teor de clorofila das folhas (Figura 3).

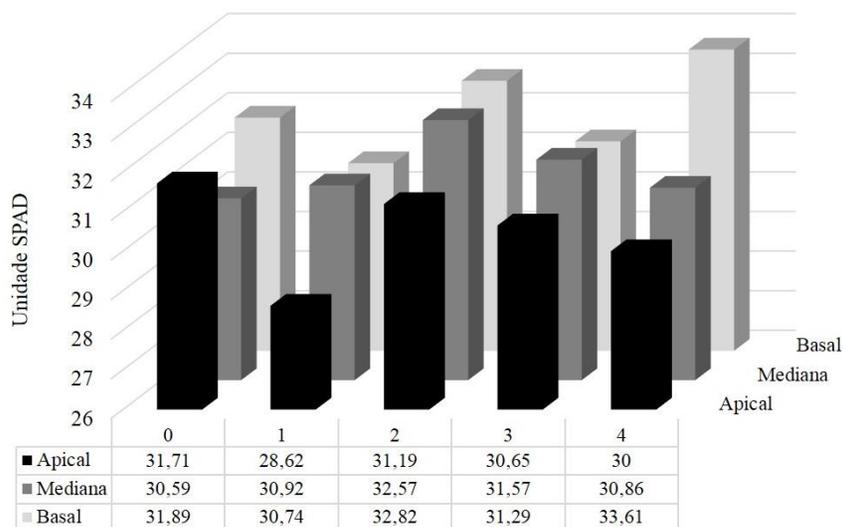


Figura 3 Estimativa do teor de clorofila pelo índice SPAD em folhas de *physalis* coletadas em três posições na planta (apical, mediana e basal), aos 60 dias, em função das doses de ácido silícico (0 - 4). Lavras, 2014

Resultado similar foi observado por Freitas et al. (2011) que não observaram diferença do índice de clorofila foliar de milho em função da aplicação de diferentes doses de Si nem de diferentes épocas de aplicação.

Estudos mostram que o Si proporciona diversos benefícios para as plantas, como maior taxa fotossintética e menor transpiração (EPSTEIN, 1999; ZUCCARINI, 2008). Porém, neste experimento, as trocas gasosas também foram consideradas estatisticamente iguais. Na Figura 4, pode ser observado que as médias de fotossíntese (A), transpiração (E), condutância estomática (gs) e conteúdo de carbono interno (C_i) permaneceram iguais mesmo com adição de Si.

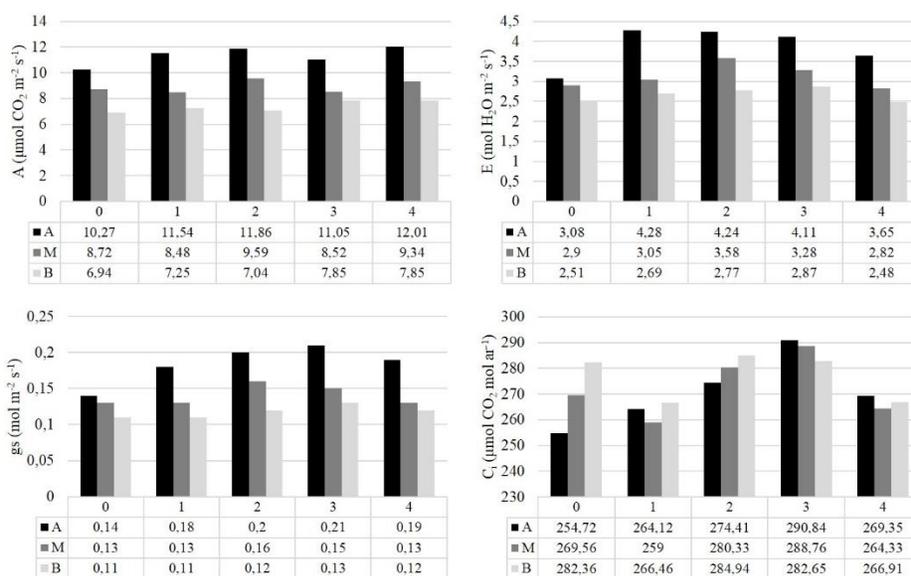


Figura 4 Fotossíntese (A), transpiração (E), condutância estomática (gs) e conteúdo de carbono interno (C_i) em folhas de physalis coletadas em três posições na planta (A – apical, M – mediana e B – basal), aos 60 dias, em função das doses de ácido silícico (0 -4). Lavras, 2014

O conteúdo de lignina bem como a análise da expressão da enzima polifenoloxidase (PPO) foram outras características avaliadas e que não apresentaram resposta significativa.

Na Figura 5, verifica-se que não houve aumento no teor de lignina com aplicação de Si.

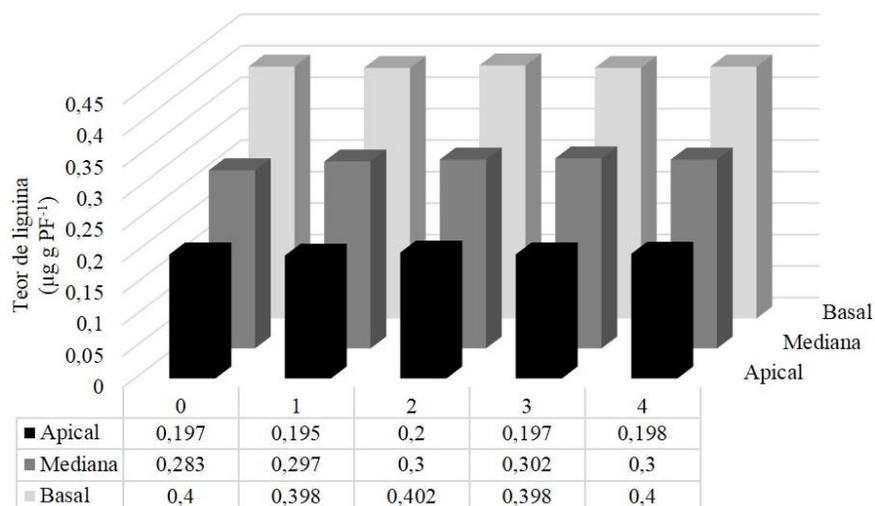


Figura 5 Teor de lignina em folhas de physalis coletadas em três posições na planta (apical, mediana e basal), aos 60 dias, em função das doses de ácido silícico (0 - 4). Lavras, 2014

A lignina é uma substância amorfa de natureza aromática e complexa e faz parte da constituição da parede celular e da lamela média dos vegetais (SALIBA et al., 2011). Em muitos casos, o aumento do teor de lignina nas plantas é importante, pois favorece maior proteção contra fitopatógenos por meio de barreira física (HATFIELD; VERMERRIS, 2001). Sabe-se que o conteúdo de Si do tecido pode estar ligado aos teores de celulose e lignina, moléculas que proporcionam rigidez estrutural às plantas (SCHOELYNCK et al., 2013). Porém, existem muitas controvérsias sobre a relação entre adição de

Si e lignificação. Richmond e Sussman (2003) relataram que, em algumas espécies, o processo de silificação parece estar ligado aos locos envolvidos na lignificação. A alta afinidade do ácido silícico por difenóis, como o ácido cafeico e ésteres, resulta em complexos silicatados altamente estáveis e pouco solúveis, os quais teriam função estrutural na forma de depósitos nas paredes de células lignificadas, balanceando a biossíntese de lignina (RAVEN, 1983). Isso seria vantajoso para a planta, uma vez que a biossíntese de complexos de Si demanda menos energia do que a síntese de lignina (JUNG et al., 1999).

Segundo Fawe et al. (2001), o Si pode conferir resistência à planta por fortificar estruturas da parede celular, conferindo aumento da lignificação. Muitos trabalhos realizados com arroz, por exemplo, mostraram que a adição de Si conferiu aumento do teor de lignina na bainha foliar principalmente quando o tecido era inoculado com algum patógeno (DOMICIANO et al., 2010; SCHURT et al., 2013), enquanto em outros estudos não foram encontrados incrementos no teor de lignina (CAI et al., 2008; SILVA et al., 2010).

Schaller, Brackhage e Dudel (2012) estudaram o efeito da adição de Si em diferentes tecidos de *Phragmites australis* e relataram que a relação Si-lignificação é dependente do tipo de tecido analisado. No caso, os autores não encontraram aumento da lignificação das folhas com aplicação de Si. Asmar et al. (2013) também não encontraram diferença significativa no teor de lignina em mudas de bananeira pré-tratadas com Si, assim como a adição de Si não contribuiu no incremento do teor de lignina da palha de arroz (SILVA; SILVA; BOHNEN, 2005).

Como confirmação dos resultados encontrados para o teor de lignina, verificou-se que, em relação à enzima PPO, não houve diferença na sua expressão em função da adição de Si (Figura 6). A enzima PPO é encontrada em todas as plantas, notadamente nos plastídeos, e está envolvida na síntese de lignina (RESENDE et al., 2000). Neste trabalho, assim como para teor de

lignina, não foi observada diferença na sua expressão, com exceção apenas quando se considera a idade da folha. Normalmente, a expressão/atividade da PPO é aumentada em condições de estresse visando à proteção da planta (SIEGEL, 1993).

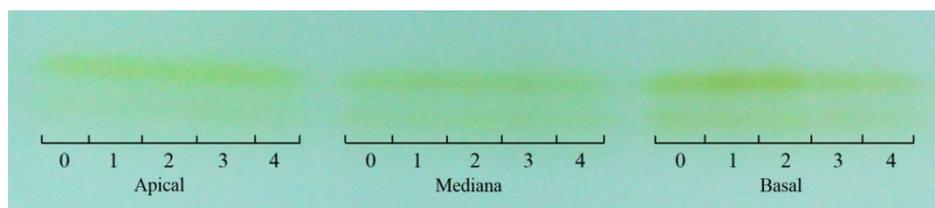


Figura 6 Padrões de expressão da enzima polifenoloxidase (PPO) de folhas de *physalis* coletadas em três posições na planta (apical, mediana e basal), aos 60 dias, em função das doses de ácido silícico (0 - 4). Lavras, 2014

Nas condições deste experimento, a aplicação de Si não surtiu efeitos nas características fisiológicas de *physalis* nem no incremento do teor foliar com elevação das doses, sendo observada diferença no teor apenas em função da idade da folha. Não existe na literatura o valor específico de acúmulo de Si pelo *physalis*, como já existe para outras culturas. Mesmo na testemunha, verificou-se presença de Si e isso também pode indicar que essa espécie já possua teor adequado desse elemento, contribuindo assim para a ausência de efeito.

Em estudo com adição de Si em pepineiro, Silva (2012) relata que o substrato Tropstrato[®] possui concentração de Si (extração em CaCl₂ 0,01M) de, aproximadamente, 20,40 mg dm³. Essa também pode ser uma das causas da ausência de efeito do Si aplicado, uma vez que o substrato já apresentava certa quantidade do elemento que poderia até mesmo ser suficiente para suprir a necessidade da planta. Esse fato também explica a presença de Si na testemunha.

Considerando todas essas informações, conclui-se que é necessário que sejam realizados novos trabalhos que testem outras fontes de Si e formas de

aplicação bem como outros tipos de substrato (solos, solução hidropônica, etc.) e a correlação da ação/efeito do Si na presença de algum fator de estresse, uma vez que esses fatores podem influenciar na absorção.

4 CONCLUSÕES

Não é observada resposta às doses crescentes de ácido silícico sobre as características fisiológicas de *physalis*.

O acúmulo de Si acontece em maior quantidade nas folhas mais velhas em relação às mais jovens.

A *physalis* apresenta comportamento de planta não acumuladora de silício nas folhas.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.
- ASMAR, S. A. et al. Características morfofisiológicas de bananeiras ‘Grande Naine’ aclimatizadas em resposta à utilização de silício *in vitro*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 73-82, 2013.
- CAI, K. et al. Physiological and cytological mechanisms of silicon-induced resistance in rice against blast disease. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 134, n. 2, p. 324-333, Oct. 2008.
- CAPELETI, I. et al. A new procedure for quantification of lignin in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seed coat and their relationship with the resistance to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 33, n. 2, p. 511-515, Feb. 2005.
- CRUSCIOL, C. A. C. et al. Leaf application of silicic acid to upland rice and corn. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2803-2808, 2013.
- CURRIE, H. A.; PERRY, C. C. Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, n. 7, p. 1383-1389, 2007.
- DOMICIANO, G. P. et al. Wheat resistance to spot blotch potentiated by silicon. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 5, p. 334-343, May 2010.
- EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 641-664, 1999.
- EPSTEIN, E. Silicon in plants. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDORFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture: studies in plant science**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001. p. 1-15.
- FAWE, A. et al. Silicon and disease resistance in dicotyledons. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. (Ed.). **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier, 2001. p. 159-170.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FISCHER, G.; ALMANZA-MERCHÁN, P. J.; MIRANDA, D. Importancia y cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 1-15, 2014.

FREITAS, L. B. et al. Adubação foliar com silício na cultura do milho. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 58, n. 2, p. 262-267, 2011.

GUNTZER, F.; KELLER, C.; MEUNIER, J. D. Benefits of plant silicon for crops: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 32, n. 1, p. 201-213, Jan. 2012.

HATFIELD, R.; VERMERRIS, W. Lignin formation in plants: the dilemma of linkage specificity. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 126, n. 4, p. 1351-1357, Aug. 2001.

JUNG, H. J. G. et al. Accuracy of Klason lignina and acid detergent lignina methods as assessed by bomb calorimetry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 5, p. 2005-2008, May 1999.

KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H. S.; NOLLA, A. **Análise de silício: solo, planta e fertilizante**. Uberlândia: GPSi-ICIAG-UFU, 2004. 39 p. (Boletim Técnico, 2).

LANA, R. M. Q. et al. Efeito do silicato de cálcio sobre a produtividade e acumulação de silício no tomateiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 2, p. 15-20, 2003.

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

MA, J. F.; TAKAHASHI, E. **Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan**. New York: Elsevier Science, 2002. 281 p.

MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Effect of silicon on the growth of soybean plants in a solution culture. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 31, n. 4, p. 625-636, 1985.

OLIVEIRA, L. A. **Silício em plantas de feijão e arroz: absorção, transporte, redistribuição e tolerância ao cádmio**. 2009. 157 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2009.

PUENTE, L. A. et al. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: a review. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 1733-1740, Aug. 2011.

RAVEN, J. A. The transport and function of silicon in plants. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 58, n. 2, p. 179-207, 1983.

RESENDE, M. L. V. et al. Perspectivas da indução de resistência em cacauero contra *Crinipellis pernicioso* através do benzotiadiazole (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 149-156, June 2000.

RICHMOND, K. E.; SUSSMAN, M. Got silicon?: the non-essential beneficial plant nutriente. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 268-272, June 2003.

RUFATO, L. et al. **Aspectos técnicos da cultura da physalis**. Lages: UFPel, 2008. 100 p.

SALIBA, E. O. S. et al. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 917-928, 2011.

SCHALLER, J.; BRACKHAGE, C.; DUDEL, E. G. Silicon availability changes structural carbon ratio and phenol content of grasses. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 77, n. 2, p. 283-287, Apr. 2012.

SCHOELYNCK, J. et al. Silicon-vegetation interaction in multiple ecosystems: a review. **Journal of Vegetation Science**, Knivsta, v. 25, n. 1, p. 1-13, 2013.

SCHURT, D. A. et al. Efeito do silício nas concentrações de lignina e de açúcares em bainhas de folhas de arroz infectadas por *Rhizoctonia solani*. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 4, p. 360-366, 2013.

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases: an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 12, n. 3, p. 303-312, Feb. 1993.

SILVA, I. T. et al. Wheat resistance to bacterial leaf streak mediated by silicon. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 4, p. 253-262, Apr. 2010.

SILVA, L. P.; SILVA, L. S.; BOHNEN, H. Componentes da parede celular e digestibilidade *in vitro* de palha de arroz (*Oryza sativa*) com diferentes teores de silício. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1205-1208, 2005.

SILVA, P. R. A. **Interação *Clonostachys rosea*, silício e *Botrytis cinerea* em pepineiro**. 2012. 52 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

TAKAHASHI, E.; MA, J. F.; MIYAKE, Y. The possibility of silicon as an essential element for higher plants. **Comments on Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 2, n. 2, p. 99-122, Mar. 1990.

VIDA VERDE. **Troptrato HT Hortaliças**. Disponível em: <http://www.vidaverde.agr.br/produtos_ht.htm>. Acesso em: 10 nov. 2014.

ZUCCARINI, P. Effects of silicon on photosynthesis, water relations and nutrient uptake of *Phaseolus vulgaris* under NaCl stress. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 52, n. 1, p. 157-160, 2008.