

# ANÁLISES ESTOMÁTICA E MORFOMÉTRICA DE FOLHAS DE PLANTAS DIPLÓIDES E TETRAPLÓIDES DE *DENDROBIUM NOBILE* LINDL

Mívia Rosa de Medeiros Vichiato<sup>1</sup>  
Marcelo Vichiato<sup>1</sup>  
Daniel Melo de Castro<sup>2</sup>  
Leonardo Ferreira Dutra<sup>3</sup>  
Moacir Pasqual<sup>1</sup>  
Walter Marchiori Júnior<sup>2</sup>  
Carolina Delfim Fernandes Lima<sup>2</sup>  
Caio Césio Salgado<sup>2</sup>

## RESUMO

Este trabalho objetivou comparar plantas diplóides ( $2n=2x=38$ ) e tetraplóides induzidos ( $2n=4x=76$ ) de *Dendrobium nobile* Lindl., mediante análises estomática e morfométrica das folhas. Para a análise estomática, foram coletadas folhas completamente expandidas do terceiro nó, que foram submetidas aos procedimentos usuais em microtécnica vegetal para microscopia de luz e eletrônica de varredura. Foram avaliados a frequência estomática, a frequência das outras células epidérmicas, o índice estomático, os diâmetros polar e equatorial dos estômatos e a relação entre o diâmetro polar e o diâmetro equatorial. Para a análise morfométrica das folhas utilizadas nas análises estomáticas, foram avaliados a altura e o diâmetro do pseudobulbo e a largura e o comprimento das folhas. *D. nobile* apresentou estômatos elípticos, com laterais gradualmente inclinadas, sendo o tamanho dos estômatos inversamente proporcional ao nível de ploidia. As plantas poliplóides apresentaram menor crescimento quando comparadas com as diplóides. Portanto, foi possível distinguir plantas de *D. nobile* diplóides das plantas tetraplóides utilizando as análises estomática e morfométrica.

**Palavras-chave:** Orchidaceae, poliploidia, índice estomático, frequência estomática.

## ABSTRACT

### STOMATAL AND MORPHOMETRIC ANALYSIS IN DIPLOIDS AND TETRAPLOIDS PLANTS OF *DENDROBIUM NOBILE* LINDL

This work aimed at to compare diploid ( $2n=2x=38$ ) and induced tetraploids ( $2n=4x=76$ ) plants of *Dendrobium nobile* Lindl. through stomatal and morphometric leaf analysis. For the stomatal analysis, completely expanded leaves of the 3<sup>o</sup> knot were collected and submitted to the usual procedures in vegetable microtechnique in light microscopy and scanning electron. They were evaluated the stomatal frequency, the number of the epidermal cells other ones, the stomatal index, the polar and equatorial diameters of the stomata and the polar and the equatorial diameter relationship. For the morphometric analysis in the plants used in the stomatal analysis, they were evaluated the height and the diameter of the pseudobulb and the width and length of the leaves. The *D. nobile* plants presented elliptic stomata with lateral gradually tilted, being the stomatal size inversely proportional at the ploidy level. The polyploidys plants presented smaller growth when compared with the diploid ones. Therefore, it was possible to distinguish diploid of polyploidys *D. nobile* plants using the stomatal and morphometric analysis.

**Key words:** Orchidaceae, polyploidy, stomatal index, stomatal frequency.

<sup>1</sup> Departamento de Fitotecnia, UFLA: mivia@ig.com.br; vichiato@hotmail.com; mpasqual@ufla.br.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia, UFLA: danielmec@hotmail.com; marchiori@hotmail.com; carolima-2000@yahoo.com; caio.nep@bol.com.br.

<sup>3</sup> EMBRAPA CNPF- Colombo – PR: leodutra@cnpf.embrapa.br

## INTRODUÇÃO

A determinação do nível de ploidia em plantas submetidas à duplicação cromossômica pode ser realizada diretamente por meio da contagem do número de cromossomos em células mitóticas ou meióticas, ou através da citometria de fluxo.

A análise citogenética exige muita experiência do pesquisador, sendo um procedimento laborioso e demorado, desvantajoso quando se trata de análises de grande número de plantas. A citometria de fluxo, apesar de ser relativamente mais fácil que a análise citogenética, exige equipamentos mais sofisticados.

Outro método usado para a identificação do nível de ploidia, também conhecido como método indireto, é a caracterização citoanatômica e morfológica, ou seja, a avaliação de determinadas características da planta, como aspectos morfológicos, diâmetro do grão de pólen, número de cloroplastos por par de células-guarda, e tamanho e densidade dos estômatos foliares. Esse método pode ser útil para inferir o nível de ploidia de plantas submetidas à indução de poliploidia, sendo a análise estomática a mais citada na literatura (Vandenhout *et al.*, 1995; Magallanes *et al.*, 1996; Souza & Queiroz, 2004).

A análise estomática é uma metodologia fácil e simples, que possibilita a identificação de supostos poliplóides e testemunhas diplóides de um ensaio, através da contagem e medição comparativa de estômatos, uma vez que o seu comprimento dos mesmos normalmente aumenta com o número de cromossomos.

No entanto, alguns autores enfatizam que a análise estomática nem sempre é eficiente e segura, devido aos efeitos genéticos e da análise individual de algumas variáveis, que podem ocasionar a classificação equivocada de determinados genótipos em relação ao nível de ploidia (Vandenhout *et al.*, 1995; Magallanes *et al.*, 1996; Souza & Queiroz, 2004).

Como o crescimento e o desenvolvimento de uma folha são comandados por vários meristemas, funcionando simultânea ou sequencialmente, em trabalhos de poliploidização é evidente a dificuldade em se fazer com que a colchicina, um duplicador do número de cromossomos, afete todos esses meristemas, localizados em diferentes pontos topográficos da gema

e funcionando em momentos diferentes, mesmo considerando apenas uma gema isolada (Roth, 1984). Além disso, a folha é a estrutura de maior plasticidade do vegetal e a que mais se modifica em resposta às alterações ambientais (Leras, 1977).

Heichel (1971), realizou cruzamentos entre duas linhagens de milho com frequências estomáticas diferentes e concluiu que, pelos padrões de segregação, as frequências estomáticas e das células epidérmicas estão sob o controle de um mesmo sistema genético. Segundo esse autor, o controle genético da variação na frequência estomática possibilita a modificação da condutância da folha para controlar a perda de água, a absorção de gás carbônico e de poluentes gasosos nas folhas.

Motonobu *et al.* (1997) e Kim & Kim (2003) observaram que o número de estômatos em crisântemo e *Cymbidium*, respectivamente, foi diretamente proporcional ao nível de ploidia, e o tamanho dos estômatos não variou entre as plantas de diferentes níveis de ploidia.

A análise estomática em *D. nobile* também não é segura na identificação de diferentes níveis de ploidia, uma vez que a endopoliploidia é frequente no gênero, explicando o porquê da alta percentagem de variação somaclonal em plantas micropropagadas por folhas (Jones & Kuehnle, 1998).

A endopoliploidia é o modo mais comum de poliploidização em plantas, podendo ser encontrada em muitos tipos de células, especialmente naquelas que estão sofrendo diferenciação e expansão (Larkins *et al.*, 2001). Dessa forma, é possível que a endopoliploidia mantenha uma estreita relação entre tamanho da célula e tamanho do seu núcleo.

Jones & Kuehnle (1998), mediante citometria de fluxo em folhas de *D. nobile*, observaram que o conteúdo de DNA variou nas folhas maduras (2C, 4C, 8C e 16C) e jovens (2C, 4C e 8C), predominando 8C nas maduras e 2C nas folhas jovens. A endopoliploidia também foi observada em espécies do gênero *Vanda* (Lim & Loh, 2003), *Spathoglottis* (Raghaven & Goh, 1994) e *Cymbidium* (Nagl, 1972).

A frequência da endopoliploidia pode variar de acordo com os níveis de auxina, citocinina, ácido abscísico e giberélico. Há evidência de que estes

reguladores de crescimento afetam diretamente a expressão de genes fundamentais que regulam o ciclo celular (Meyers *et al.*, 1990; Artlip *et al.*, 1995; Valente *et al.*, 1998).

Auras (1997) observou que o tamanho, o índice estomático e a densidade estomática variaram em função dos efeitos do ácido giberélico e do retardante paclobutrazol (PBZ) em girassol. Os resultados foram relacionados com variações ontogenéticas, sugerindo que a giberelina tem alguma participação ativa no controle da morfogênese das folhas. No girassol sob efeitos de PBZ, as folhas não se expandiram até o tamanho original e a área foliar foi reduzida, apresentando maiores índices estomáticos adaxiais e abaxiais, devido ao aumento no número de estômatos por unidade de área. Também relata que a giberelina desempenha algum papel no crescimento das células-guarda, uma vez que o comprimento dessas nas superfícies abaxial e adaxial foi reduzido com a aplicação do retardante.

Segundo Raven *et al.* (2001), o ácido giberélico causa alongamento das células da folha pelo aumento da plasticidade da parede celular, levando a um aumento na captação de água e na pressão de turgescência.

Fosket (1994) afirma que a formação de células-guarda ocorre somente no final do desenvolvimento foliar e que está relacionada com o número de divisões celulares que ocorreram na protoderme, tecido meristemático primário que origina a epiderme. Segundo Tichá (1982), há um mecanismo regulador da produção de estômatos que parece ter como referência o tamanho foliar final e/ou o tempo necessário para atingi-lo. Portanto, o mecanismo regulador da diferenciação nas folhas pode ser bioquímica e fisiologicamente reprogramado, e a produção de estômatos pode ser prolongada durante o reajuste, ocasionando índices estomáticos mais altos (Auras, 1997).

Os estômatos de *D. nobile* estão localizados somente na superfície abaxial da folha (Vichiato *et al.*, 2004). Há várias modificações no formato dos estômatos em orquídeas, incluindo elíptico, circular, transversalmente elíptico e angular. Em *Dendrobium* não foi encontrado somente o formato angular dos estômatos (Yukawa *et al.*, 1992).

O gênero *Dendrobium* é um dos maiores da família

Orchidaceae, sendo também um dos mais problemáticos a respeito da sua classificação intragenérica e suas relações com outros membros dessa família. Dentro desse gênero há dois tipos de estômatos, que podem contribuir para a sua análise sistemática. O estômato classificado como tipo I apresenta abertura em forma elíptica e com laterais gradualmente inclinadas; o tipo II apresenta abertura estomática circular a fusiforme, com laterais íngremes (Yukawa *et al.* (1992).

Os estômatos de *Dendrobium* têm várias vantagens como marcadores taxonômicos: o tamanho e a forma são estáveis, tanto dentro do mesmo indivíduo como entre indivíduos da mesma espécie, quando comparados com o tamanho e formato de outras células epidérmicas. Embora a preparação das lâminas afete freqüentemente as formas características da superfície estomática, nesse gênero observou-se somente a contração dos estômatos (Yukawa *et al.*, 1992).

Este trabalho objetivou comparar plantas diplóides ( $2n=2x=38$ ) e tetraplóides induzidos ( $2n=4x=76$ ) de *Dendrobium nobile* Lindl., mediante análises estomática e morfométrica das folhas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microscopia de luz

As plantas de *D. nobile* diplóides ( $2n=2x=38$ ) e tetraplóides ( $2n=4x=76$ ), já identificadas quanto ao nível de ploidia, via análise citogenética, foram obtidas no Departamento de Agricultura da UFLA, sete meses após o início do tratamento com colchicina.

Foram utilizadas folhas de plantas diplóides com comprimento médio de 9,3 cm e 2,4 cm de largura, e folhas tetraplóides com 5,37 cm de comprimento e 1,6 cm de largura.

O delineamento empregado foi o inteiramente casualizado com dois tratamentos e 16 repetições, com uma planta por parcela, perfazendo um total de 32 parcelas.

Para o estudo de cada nível de ploidia, foi selecionada 1 folha completamente expandida por planta, retirada do terceiro nó. As folhas foram fixadas em FAA<sub>50</sub>, por 72 horas, e conservadas em etanol 70%.

Foram realizados cortes paradérmicos na face abaxial, à mão livre, na região mediana central das folhas, e submetidos a técnicas usuais em anatomia vegetal.

Posteriormente, foram corados com safranina 1%. As lâminas semipermanentes foram montadas em água:glicerina (1:1).

Para cada lâmina foram avaliados, aleatoriamente, 10 campos e 10 medidas de estômatos por planta, conforme sugerido por Speckmann *et al.* (1965). Foram avaliados a frequência de estômatos, a frequência das células epidérmicas normais, os diâmetros polar e equatorial dos estômatos, o índice estomático e a relação entre o diâmetro polar e o diâmetro equatorial dos estômatos.

As contagens de estômatos e das demais células epidérmicas foram realizadas em campo equivalente a 0,0676 mm<sup>2</sup>. Posteriormente, as frequências estomáticas e das outras células epidérmicas foram determinados por mm<sup>2</sup>.

O índice estomático foi calculado pela seguinte expressão proposta por Salisbury (1927), citado por Lea *et al.* (1977):  $I = S / (E + S) \times 100$ , em que I representa o valor do índice estomático, S o número de estômatos por unidade de área da folha e E o número de células epidérmicas na mesma área.

Todos os dados anatômicos foram obtidos com auxílio de microscópio de luz Olympus. As medições foram feitas com auxílio de lâmina micrometrada e câmara clara.

Os resultados obtidos nessas avaliações foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas através do teste Scott Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

As imagens foram registradas através de fotomicrografias, obtidas em fotomicroscópio Olympus, modelo BX60.

### Microscopia eletrônica de varredura

As folhas de *D. nobile*, nas mesmas condições descritas para a microscopia de luz, foram cortadas em segmentos de 2 cm de largura e comprimento máximo de 2cm.

Os espécimes foram fixados em solução aquosa de Karnovsk, pH 7,2 por 24 horas. Logo depois, lavou-se o material por três vezes em solução tampão cacodilato 0,1 M, por um período de 10 minutos.

Em capela, a temperatura ambiente, o material foi pós-fixado com solução aquosa de tetróxido de ósmio 1%, em tampão cacodilato 0,1 M, por 1 hora. Após esse período, lavou-se o material, por três vezes, em água destilada por 10 minutos, e realizou-se a desidratação com série de acetona crescente (acetona 25, 50, 75, 90 e 100%), três vezes, e por 10 minutos em cada solução. Em seguida, o material foi levado ao equipamento de ponto crítico para a secagem com CO<sub>2</sub>.

Os cortes foram aderidos a blocos especiais para microscopia eletrônica de varredura (“stubs”) e recobertos com uma camada de ouro metálico de, aproximadamente, 10 nm de espessura.

As imagens foram registradas através de eletromicrografias, utilizando-se microscópio eletrônico de varredura JEOL T200. Foi avaliado o tipo estomático de *D. nobile*, conforme Yukawa *et al.* (1992).

### Morfometria de folhas de *D. nobile*

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 16 repetições, com uma planta por parcela, perfazendo um total de 32 parcelas.

Nas plantas diplóides e tetraplóides de *D. nobile*, utilizadas nas análises estomáticas, foram avaliadas as seguintes características: altura do pseudobulbo (medida com régua e expressa em cm), diâmetro do pseudobulbo (medido com paquímetro digital e expresso em mm), largura e comprimento das folhas (medido com paquímetro digital e expresso em cm). As medições foram realizadas no final do experimento, 7 meses após a indução de poliploidia. Para cada planta, foram selecionadas 3 folhas completamente expandidas, localizadas entre o segundo e o quarto nó.

Os resultados obtidos nessas avaliações foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas através do teste Skott Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo comparativo das características estomáticas das plantas diplóides e tetraplóides induzidas de *D. nobile* mostrou diferenças significativas ( $P < 0,01$ ), conforme Tabela 1.

**TABELA 1** – Frequência de estômatos (FE), frequência de células epidérmicas (FCE), diâmetro polar dos estômatos (DP), diâmetro equatorial dos estômatos (DE), relação entre diâmetro polar e o diâmetro equatorial (DP/DE) e índice estomático (IE) nas folhas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl.

Nível de ploidia	FE (mm <sup>2</sup> )	FCE (mm <sup>2</sup> )	DP ( m)	DE ( m)	DP/DE	IE (%)
Diplóide	831,51 b	5890,08 b	44,08 a	36,08 a	1,228 a	12,33 a
Tetraplóide	992,01 a	7212,99 a	39,05 b	33,08 b	1,188 a	11,75 a
C.V. (%)	14,25	15,28	5,59	7,30	4,70	7,28

\* Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo Teste Skott Knott, a 5% de probabilidade.

### Frequência e diâmetro dos estômatos

Como pode ser observado na Tabela 1, houve diferença significativa na frequência estomática de folhas de *D. nobile* diplóides e tetraplóides.

Nas folhas de plantas tetraplóides, ocorreu aumento na frequência dos estômatos (19,30%) e na frequência das outras células epidérmicas (22,46%) por unidade de área (Tabela 1). Esses resultados estão relacionados ao menor tamanho das células epidérmicas nas plantas tetraplóides, quando comparadas com as diplóides, concordando com Heichel (1971), que observou que as frequências estomáticas e das outras células epidérmicas estão sob controle de um mesmo sistema genético.

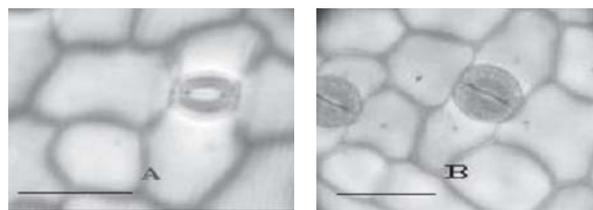
O diâmetro dos estômatos apresentou diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre os dois níveis de ploidia testados. Em folhas de plantas tetraplóides, ocorreu diminuição no diâmetro polar (11,6%) e no equatorial (8,8%) dos estômatos em relação às plantas diplóides (Tabela 1). Conforme diversos autores, o aumento no nível de ploidia é diretamente proporcional ao tamanho dos estômatos, mas, de acordo com Magallanes *et al.* (1996), Motonobu *et al.* (1997), Kim & Kim (2003) e Souza & Queiróz (2004) a avaliação indireta do nível de ploidia, como a análise estomática, pode não corresponder a essa hipótese, uma vez que os fatores ambientais também estão envolvidos.

Assim sendo, as folhas de plantas tetraplóides de *D. nobile* apresentam maior frequência estomática porque suas células epidérmicas são menores em relação às plantas diplóides, o que pode ser observado na Figura 1.

Esses resultados concordam parcialmente com os de Motonobu *et al.* (1997), que também observaram que o número de estômatos em folhas de crisântemo foi diretamente proporcional ao aumento dos cromossomos,

mas o tamanho dos estômatos não variou entre as plantas de diferentes níveis de ploidia.

Kim & Kim (2003), que utilizaram colchicina para duplicação cromossômica *in vitro* em *Cymbidium* sp. (Orchidaceae), chegaram às mesmas conclusões que Motonobu *et al.* (1997), isso é, o número de estômatos aumentou com os crescentes níveis de ploidia, porém não houve variação no seu tamanho. No entanto, nenhuma hipótese relacionada ao tamanho e à frequência dos estômatos nos diferentes níveis de ploidia foi sugerida pelos autores.



**FIGURA 1** – Fotomicrografia de epiderme da face abaxial de folha diplóide (A) e tetraplóide (B) de *Dendrobium nobile* Lindl. Barra = 30  $\mu$ m.

Nas folhas de plantas diplóides de *D. nobile*, observou-se que a frequência estomática e a frequência das outras células epidérmicas foram, respectivamente, 19,33 e 22,46% menores do que nas tetraplóides. Esses resultados concordam com o trabalho de Lea *et al.* (1977), que concluíram que o tamanho da célula epidérmica era o principal fator determinante da frequência estomática.

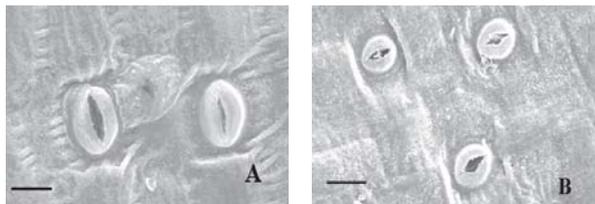
### Relação DP/DE e características dos estômatos

Conforme a Tabela 1, não houve diferença significativa entre a relação DP/DE entre os estômatos de folhas de *D. nobile* diplóides (1,228) e tetraplóides (1,188).

Esses resultados concordam com os de Yukawa *et al.* (1992), que observaram que os estômatos do gênero *Dendrobium* apresentam tamanho

e forma estáveis tanto dentro do mesmo indivíduo como entre indivíduos da mesma espécie, quando comparados com os de outras células epidérmicas.

Por essas características, os estômatos de *D. nobile* podem ser vantajosos como marcadores taxonômicos. Segundo a classificação estomática de Yukawa *et al.* (1992), o estômato de *D. nobile*, que não foi estudado por estes autores, foi classificado como do tipo I, por apresentar abertura em forma elíptica e com laterais gradualmente inclinadas (Figura 2).



**FIGURA 2** – Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura da superfície abaxial de folha diplóide (A) e tetraplóide (B) de *Dendrobium nobile* Lindl. Barra = 20  $\mu$ m.

### Índice estomático

Como pode ser observado na Tabela 1, não houve diferença significativa entre o índice estomático de folhas de *D. nobile* diplóides (12,33%) e tetraplóides (11,75%).

Lea *et al.* (1977) também observaram que o índice estomático não variou em três níveis de ploidia da forrageira *Bromus inermis*, concluindo que o tamanho da célula epidérmica era o principal fator determinante da frequência estomática. Assim, a baixa frequência de estômatos nas folhas diplóides de *D. nobile* pode estar relacionada com o maior tamanho dos estômatos (Tabela 1) e, aparentemente, também com o maior tamanho das outras células epidérmicas (Figura 1).

Considerando que as folhas das plantas diplóides e tetraplóides estavam completamente expandidas, esses resultados concordam com os de Tichá (1982), que observou que, dentro de uma espécie, quando as células completam a sua diferenciação, o índice estomático torna-se independente do tamanho da folha. Assim sendo, a seleção de folhas completamente expandidas para análise estomática é importante porque a diferenciação dos meristemóides precursores das células-guarda e das demais células epidérmicas prossegue até que a folha alcance de 10 a 50% de seu tamanho final, quando a maior parte das células epidérmicas já completou sua atividade mitótica (Tichá, 1982; Yang & Sack, 1995).

### Morfometria das folhas de plantas de *D. nobile*

As folhas das plantas diplóides de *D. nobile* foram 73,18% mais compridas e 50% mais largas, quando comparadas com as folhas tetraplóides (Tabela 2).

**TABELA 2** – Comprimento (CF) e largura da folha (LF), altura da planta (AP) e diâmetro do pseudobulbo (DP) em plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl. UFLA, Lavras-MG, 2005.

Nível de ploidia	CF (cm)	LF (cm)	AP (cm)	DP (mm)
Diplóide	9,30 a	2,4 a	11,2 a	6,07 a
Tetraplóide	5,37 b	1,6 b	4,96 b	3,09 b
C.V. (%)	8,2	6,4	22,72	3,09

\*Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo Teste Skott Knott, a 5% de probabilidade.

Segundo Auras (1997), a giberelina tem alguma participação ativa no controle da morfogênese das folhas. Como somente as plantas poliplóides sofreram efeitos da colchicina (as diplóides eram plantas testemunhas), sugere-se que esse alcalóide tenha afetado negativamente a biossíntese das giberelinas, originando plantas com folhas pequenas (Tabela 2), células-guarda e demais células epidérmicas de menor tamanho (Figura 1, Tabela 1).

Os pseudobulbos das plantas diplóides de *D. nobile* eram mais altos (125,80%) e com maior diâmetro (96,44%) quando comparados com os das plantas tetraplóides (Tabela 2). Além da redução no comprimento, na largura das folhas e na altura e diâmetro dos pseudobulbos, as plantas tetraplóides de *D. nobile* também expressaram desenvolvimento lento e pouco vigoroso, e apresentaram raízes reduzidas, porém a coloração das plantas era normal quando comparadas com as plantas diplóides. Estas características são, provavelmente, conseqüentes da dosagem gênica dobrada, exigindo maior gasto energético durante a divisão celular, causando retardamento no ciclo mitótico, que se expressa em menor produção de biomassa por unidade de tempo (Takamura & Miyjima, 1996).

Apesar de a colchicina ser mutagênica e muito eficiente para produzir modificações fenotípicas (Conagin, 1972), a hipótese de que esse alcalóide induziu mutação nas plantas poliplóides foi totalmente descartada, uma vez que 100% das plantas apresentaram as mesmas características.

### Relação entre folhas poliplóides de *D. nobile* e ecofisiologia

As características observadas nas folhas tetraplóides de *D. nobile*, como células menores (Figura 1, Tabela 1), menor tamanho da folha (Tabela 2) e maior número de estômatos por unidade de área (Tabela 1), são comumente relacionadas com xerofilia (Bonates, 1993).

Uma vez que as trocas gasosas, nas folhas, ocorrem principalmente através dos estômatos, o aumento na frequência estomática, associado à redução no tamanho das folhas das plantas tetraplóides, pode ser um mecanismo importante de adaptação a condições mais áridas, já que a frequência de estômatos está associada à condutância estomática e com menor área foliar. Dessa maneira, a folha tetraplóide de *D. nobile* teria menor exposição ao sol, diminuindo sua temperatura interna. Segundo Heichel (1971), o controle genético na variação da frequência estomática possibilita a modificação da condutância da folha para controlar a perda de água, a absorção de gás carbônico e de poluentes gasosos nas folhas.

Considerando que *D. nobile* é uma epífita que ocupa nichos úmidos e poucos ensolarados e que suas folhas não apresentam características acentuadamente xeromorfas (Vichiato *et al.*, 2004), as características

observadas nas folhas tetraplóides teriam importante papel na adaptação da planta em ambiente com menor disponibilidade de água.

Essa hipótese concorda com a de Lleras (1977), que afirma que, quanto mais xerofíticas as condições, menor o tamanho e maior a frequência estomática por unidade de área. Dessa maneira, é permitida uma troca de gases mais eficiente nos períodos em que a umidade relativa é alta, quando o risco de desidratação excessiva é mínimo. Assim sendo, a poliploidia em orquídeas pode ser vantajosa por aumentar a possibilidade de adaptação de suas plantas, caso surjam variações bruscas no ambiente.

### CONCLUSÕES

A frequência dos estômatos e das outras células epidérmicas, o tamanho dos estômatos, o diâmetro e o tamanho dos pseudobulbos, o comprimento e a largura das folhas são eficientes na distinção entre plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl.

O tamanho dos estômatos de *D. nobile* é inversamente proporcional ao nível de ploidia.

As plantas tetraplóides de *D. nobile*, com 7 meses após a indução de poliploidia, têm menor crescimento que as diplóides.

## REFERÊNCIAS

- Artlip TS, Madison JT & Setter TL (1995) Water deficit in developing endosperm of maize: cell division and nuclear DNA endoreduplication. *Plant, Cell and Environment* 18: 1034-1040.
- Auras NE (1997) Efeitos do paclobutrazol sobre morfologia e anatomia foliar, crescimento de parte aérea, distribuição de biomassa e trocas gasosas em girassol. Tese de doutorado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa -UFV. 88p.
- Bonates LCM (1993) Estudos ecofisiológicos de Orchidaceae da Amazônia. II-Anatomia ecológica foliar de espécies com metabolismo CAM de uma capina da Amazônia Central. *Acta Amazonica* 23:315-348.
- Conagin CHTM (1972) Efeitos da colchicina em *Arachis hypogaea* L. *Bragantia* 31:187-198.
- Ferreira DF (2000) Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. Anais, São Carlos: UFSCar. p.255-258.
- Fosket DE (1994) *Plant growth and development: a molecular approach*. San Diego: Academic Press. 580p.
- Heichel GH (1971) Genetic control of epidermal cell and stomatal frequency in maize. *Crop Science* 11:830-832.
- Jones WE & Kuehnle AD (1998) Ploidy identification using flow cytometry in tissues of *Dendrobium* species and cultivars. *Lindleyana* 13:11-18.
- Kim MS & Kim JY (2003) Chromosome doubling of a *Cymbidium* hybrid with colchicine treatment in meristem culture. *Proceedings of NIOC, Nagoya*, p.37-40. Disponível em: <[http://www.biolo.aichi-edu.ac.jp/NIOC\\_2003poster](http://www.biolo.aichi-edu.ac.jp/NIOC_2003poster)>. Acesso em: 23 de maio de 2004.
- Larkins BA, Dilkes BP, Dante RA, Coelho MC, Woo YM & Liu Y (2001) Investigating the how and whys of DNA endoreduplication. *Journal of Experimental Botany* 52:183-192.
- Lea HZ, Dunn GM & Koch DW (1977) Stomatal indexes in three ploidy levels of *Bromus inermis* Leyss. *Crop Science* 17:669-670.
- Lim WL & Loh CS (2003) Endopolyploidy in *Vanda* Miss Joaquim (Orchidaceae). *New Phytologist* 159:279-287.
- Lleras E (1977) Differences in stomatal number per unit area within the same species under different micro-environmental conditions: a working hypothesis. *Acta Amazonica* 7:473-476.
- Magallanes MGR, Pinto CABP & Davide LC (1996) Determinação cito-morfológica do nível de ploidia de clones de batata (*Solanum tuberosum* L.) obtidos por cruzamentos interespecíficos. *Ciência e Agrotecnologia* 20:480-484.
- Meyers PN, Setter TL, Madison JT & Thompson JF (1990) Abscisic acid inhibition of endosperm cell division in cultured maize kernels. *Plant Physiology* 94:1330-1336.
- Motonobu E, Kim JS & Inada I (1997) Production and characteristics of chromosome doubled plants of small flowered garden Chrysanthemum, *Dendranthema × grandiflorum* Ramat. Kitam. cv. YS by colchicine treatment of cultured shoot tips. *Journal Japan Society Horticulturae Science* 65:528-833.
- Nagl W (1972) Evidence of DNA amplification in orchid *Cymbidium in vitro*. *Cytobios* 5:145-154.
- Raghaven V & Goh CJ (1994) DNA synthesis accumulation during germination of embryos of the orchid *Spathoglottis plicata*. *Protoplasma* 183:137-147.
- Raven PH, Evert RF & Eichhorn SE (2001) *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 906p.
- Roth OS (1984) Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. Tese de Mestrado. Piracicaba, Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz". 78p.
- Souza FF & Queiróz MA (2004) Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliplóides de melancia. *Horticultura Brasileira* 22:516-520.
- Speckmann GJ, Post Jr J & Dijkstra H (1965) The length of stomata as an indicator for polyploidy in rye grasses. *Euphytica* 14:35-42.
- Takamura T & Miyajima I (1996) Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics. *Scientia Horticulturae* 65:305-312.
- Tichá I (1982) Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves - Stomata density and sizes. *Photosynthetica*, 16:375-471.
- Valente P, Tao W & Verbelen JP (1998) Auxins and cytokinins control DNA endoreduplication and reduplication in single cells of tobacco. *Plant Science* 134:207-215.
- Vandenhout H, Ortiz R, Vuylsteke D, Swennen R & Bai KV (1995) Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. *Euphytica* 83:117-122.
- Vichiato MRM, Castro DM, Vichiato M, Gonçalves SVB & Lima MP (2004) Anatomia foliar de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). In: Congresso Nacional de Botânica. Anais, Viçosa: UFRV. p. 28.
- Yang M & Sack FD (1995) The too many mouths and four lips mutations affect stomatal production in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 7:2227-2239.
- Yukawa T, Ando T, Karasawa K & Hashimoto K (1992) Existence of two stomatal shapes in the genus *Dendrobium* (Orchidaceae) and its systematic significance. *American Journal of Botany* 79: 946-952.