

FABIO JOSÉ GONÇALVES

**ASPECTOS FENOLÓGICOS, ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA E
GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Cyrtopodium vernum* Rchb.f. & Warm
(ORCHIDACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:

Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a Marta Cristina Filippi

Goiânia, GO - Brasil

2009

Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás – UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor(a):	Fábio José Gonçalves		
CPF:	633.164.391.53	E-mail:	fabiogoncalvesufg@gmail.com
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo Empregatício do(a) Autor(a):			
Agência de fomento:		Sigla:	
País:	Brasil	UF:	GO
CNPJ:			
Título:	Aspectos fenológicos, associação micorrízica e germinação <i>in vitro</i> de <i>Cyrtopodium vernum</i> Rchb.f. & Warm (Orchidaceae)		
Palavras-chave:	Orquídeas, Cerrado, propagação		
Título em outra língua:	Phenological aspects, mycorrhizal association and <i>in vitro</i> germination of <i>Cyrtopodium vernum</i> Rchb.f. & Warm (Orchidaceae)		
Palavras-chave em outra língua:	Orchids, Cerrado, propagation		
Área de concentração:	Genética e Melhoramento de Plantas		
Data de defesa:	19/02/2009		
Programa de Pós-Graduação:	Agronomia		
Orientador(a):	Sergio Tadeu Sibov		
CPF:	100.744.648-09	E-mail:	stsibov@gmail.com
Co-orientador(a):	Marta Cristina Filippi		
CPF:	051.829.608-32	E-mail:	macrisfilippi@gmail.com
Co-orientador(a):			
CPF:		E-mail:	

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

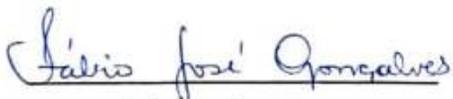
Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: _____

Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF não-criptográfico da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.



Assinatura do autor

Goiânia, 25/10/2012.

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) GPT/BC/UFG mr

Gonçalves, Fabio José.

**G635a Aspectos fenológicos, associação micorrízica e germinação *in vitro* de *Cyrtopodium vernum* Rchb.f. & Warm (Orchidaceae) / Fábio José Gonçalves. - 2009.
xvi, 76 f. : il., figs, tabs.**

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov; Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Cristina Filippi. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2009.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

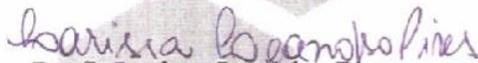
1. Orquídeas (*Cyrtopodium vernum*) - Cerrado. 2. Fenologia. 2. Propagação. I. Título.

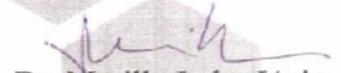
CDU: 582.594(213.54)

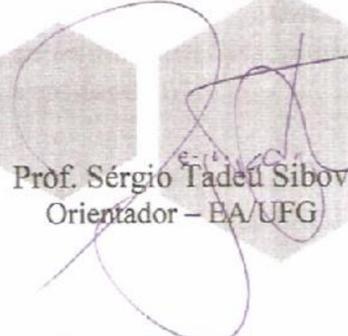
FÁBIO JOSÉ GONÇALVES

TÍTULO: “Aspectos fenológicos, associação micorrízica e germinação *in vitro* de *Cyrtopodium venum* Rchb.f. & Warm (Orchidaceae)”.

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 19 de fevereiro de 2009,
pela Banca Examinadora Constituída pelos membros:


Prof.^a. Larissa Leandro Pires
EA/UFG


Dr. Murillo Lobo Júnior
Embrapa Arroz e Feijão


Prof. Sérgio Tadeu Sibov
Orientador – EA/UFG

UFG

Goiânia - Goiás
Brasil

Aos meus pais Gaspar e Maria Elizabete.

Aos meus filhos Eduardo e Bianca.

Aos meus irmãos William e Denise.

À minha avó Marinha Domingas.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado saúde, serenidade e força para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade de realizar este curso de Mestrado.

Ao professor Dr. Sérgio Tadeu Sibov, pela orientação, paciência, apoio e amizade.

À professora Dra. Marta Cristina Filippi, pelas idéias, orientação, compreensão e amizade.

Aos meus pais, minha avó e meus irmãos pelo incentivo, carinho, apoio e companheirismo durante toda a minha vida acadêmica.

Aos meus filhos, pela paciência e compreensão durante o tempo que estive ausente para a realização deste trabalho.

À MSc Maria Tereza e a professora Letícia pelo auxílio na realização dos cortes histológicos das raízes das orquídeas.

À Professora Maria Helena, por ceder gentilmente o Laboratório de anatomia vegetal onde foram realizados os cortes histológicos das raízes das orquídeas.

À Embrapa arroz e feijão, onde foram realizados os isolamentos de micorrizas.

Ao Professor Dr José Ângelo Rizzo, por todas as orientações e autorizações para realização dos estudos na Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo.

Aos guardas da Reserva Biológica, José Modesto e Neilor, pelo auxílio na localização de espécies de orquídeas na reserva.

À Professora Maurízia de Fátima Carneiro, pelas dicas no trabalho de germinação assimbiótica de sementes de orquídeas.

Ao Sistema de Meteorologia e Recursos Hídricos do Estado de Goiás (SIMEGO), vinculado à Secretaria Estadual de Ciência e Tecnologia (SECTEC), que disponibilizou os dados meteorológicos da região onde o estudo foi desenvolvido.

Aos estagiários do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Goiás, Adriana, Renata, Richard, Rodrigo, Lucas e Gabriel, pelo auxílio no desenvolvimento dos trabalhos de germinação.

À minha família, colegas de curso e amigos, pelo incentivo, carinho e apoio.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste curso.
AGRADEÇO.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS	9
RESUMO	12
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE	19
2.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS ORQUÍDEAS	19
2.2.1 Raiz	21
2.2.2 Caule	21
2.2.3 Folha	22
2.2.4 Inflorescência e flores	23
2.2.5 Fruto e semente	24
2.3 ORQUÍDEAS DO CERRADO	25
2.3.1 Importância do fogo na reprodução de orquídeas do Cerrado	26
2.4 O GÊNERO <i>Cyrtopodium</i>	28
2.4.1 A espécie <i>Cyrtopodium vernum</i>	28
2.5 PROPAGAÇÃO DE ORQUÍDEAS	29
2.5.1 Propagação vegetativa	29
2.5.2 Propagação por sementes	30
2.5.3 Cultura de tecidos	30
2.7 REFERÊNCIAS	33
3 ASPECTOS FENOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DE <i>Cyrtopodium vernum</i> Rchb. f. & Warm	37
3.1 INTRODUÇÃO	39
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.2.1 Fenologia	41
3.2.2 Morfologia floral	42
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.3.1 Aspectos morfológicos	42
3.3.2 Aspectos ambientais	44
3.3.3 Aspectos fenológicos	46
3.4 CONCLUSÕES	48
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM <i>Cyrtopodium vernum</i> Rchb. f. & Warm. e <i>Cyrtopodium eugenii</i> Rchb. f.	50

4.1 INTRODUÇÃO	52
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.2.1 Isolamento de fungos	53
4.2.2 Caracterização morfológica do isolado micorrízico	54
4.2.3 Cortes histológicos	54
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.4 CONCLUSÕES	60
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
5 GERMINAÇÃO IN VITRO DE SEMENTES DE <i>Cyrtopodium vernum</i> Rchb. f. & Warm. (ORCHIDACEAE)	63
5.1 INTRODUÇÃO	65
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	66
5.2.1 Cultivo assimbiótico	66
5.2.2 Cultivo simbiótico	67
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.3.1 Cultivo assimbiótico	68
5.3.2 Cultivo simbiótico	72
5.4 CONCLUSÕES	74
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1. Notas atribuídas aos estágios de desenvolvimento de sementes de <i>C. vernum</i> cultivadas simbioticamente <i>in vitro</i>	68
Tabela 5.2. Porcentagem de germinação em diferentes estágios de desenvolvimento dos protocormos de <i>C. vernum</i> , 60 dias após inoculação das sementes em três meios de cultura diferentes	69
Tabela 5.3. Porcentagem de germinação em seus diferentes estágios de desenvolvimento e porcentagem total de germinação de sementes de <i>C. vernum</i> cultivadas simbioticamente <i>in vitro</i>	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Hábito de crescimento de orquídeas, os círculos mostram as plantas em seus habitats naturais. (A) orquídea terrestre (A1) detalhe da flor de <i>Epistephium lucidum</i> Cogn., (B) orquídea rupícola (<i>Bulbophilum</i> sp.), (C) orquídea saxícola (<i>Cyrtopodium</i> sp.), (D) orquídea epífita (<i>Cyrtopodium santlegerianum</i>)	20
Figura 2.2. Tipos de crescimento de orquídeas. (A) crescimento simpodial (<i>Cattleya</i> sp.), (B) crescimento monopodial (<i>Wanda</i> sp)	20
Figura 2.3. Raízes de orquídea. As setas indicam (A) velame, (B) ponta clorofilada.	21
Figura 2.4. (A) Pseudobulbos de <i>Cyrtopodium eugenii</i> , (B) brotação na região de nó de <i>Cyrtopodium santlegerianum</i>	22
Figura 2.5. Flor de <i>Cyrtopodium gonzalezii</i> indicando suas peças florais	24
Figura 2.6. Fruto de <i>Cattleya nobilior</i> seccionado longitudinalmente mostrando seu interior com sementes	25
Figura 2.7. Área queimada pelo fogo (A), Planta em rebrota após passagem do fogo (B), <i>Cyrtopodium vernum</i> , florescendo após a passagem do fogo (C e D) em Cerrado Rupestre da Reserva Biológica José Ângelo Rizzo em Mossâmedes	27
Figura 2.8. Flor de <i>Cyrtopodium vernum</i> (A), pseudobulbos (setas) e cápsula (círculo) de <i>C. vernum</i> em ambiente natural (B)	29
Figura 3.1. Vista de parte da Serra Dourada indicando no detalhe o caminho até a Reserva Biológica (A). Área da Reserva Biológica, onde foram encontradas plantas de <i>C. vernum</i> (B).....	41
Figura 3.2. <i>Cyrtopodium vernum</i> : Hábito. Haste floral aumentada mostrando detalhes da inflorescência (A), Flor, vista frontal (B), Labelo (C), Detalhe do calo aumentado (D), Flor, vista lateral (E), Antera, vista dorsal (F), Antera, vista ventral (G), Polínias (H), Coluna, vista ventral (I), Coluna, vista lateral (J), Análise floral (K)	43
Figura 3.3. Aspectos climáticos e comportamento de <i>C. vernum</i> em quatro populações naturais ao longo de um ano de avaliação. a) médias térmicas mensais; b) estimativas de precipitações pluviais; c) média de número de pseudobulbos; d) médias de número de folhas; e) média de altura de pseudobulbos, f) média de número de brotos, g) média de altura de brotos	45

Figura 3.4 – Vista da reserva ecológica após a passagem do fogo (A). <i>C. vernum</i> em habitat natural com flores após a passagem do fogo (B)	46
Figura 3.5. <i>Cyrtopodium gonzalezii</i> em habitat natural (A), flor de <i>C. gonzalezii</i> (B)	48
Figura 4.1. Colônia da micorrízica (400x) isolada da raiz de <i>C. vernum</i> ; as setas indicam células monilióides no micélio	56
Figura 4.2. Micélio de micorriza isolado de raiz de <i>Cyrtopodium vernum</i> (A), e isolado da raiz de <i>C. eugenii</i> (B) cultivadas em meio de cultura BDA ..	56
Figura 4.3. (a) <i>Pelotons</i> (setas) no interior das células corticais de raiz de <i>C. vernum</i> em corte transversal e (b) e <i>C. eugenii</i> em corte longitudinal (400x)	57
Figura 4.4. (a) Corte longitudinal de raiz de <i>C. vernum</i> (400x), (b) corte transversal de raiz de <i>C. vernum</i> (100x), as setas indicam, respectivamente, a presença de ráfides e células lignificadas no parênquima cortical das raízes	57
Figura 4.5. Corte radicular transversal, o círculo indica ponto de colonização de <i>pelotons</i> , do lado esquerdo superior (50x)	58
Figura 4.6. Corte longitudinal de raiz de <i>C. vernum</i> . As setas indicam <i>pelotons</i> degradados no interior das células corticais de raízes	58
Figura 4.7. <i>Pelotons</i> , em degradação conectados entre si. As setas mostram as hifas conectivas entre um <i>peloton</i> e outro	59
Figura 5.1. Cultivo simbiótico in vitro de sementes de <i>C. vernum</i> . As setas indicam, (A) disco com isolado fúngico, (B) Meio de cultura em placa de Petri, (C) papel Watman nº 3, (D) sementes de <i>Cyrtopodium</i>	68
Figura 5.2. Protocormos de <i>C. vernum</i> desenvolvidos em meio de cultura 1-2 MS (com metade da concentração de macronutrientes) asséptico, após 35 dias de cultivo	69
Figura 5.3. Médias de germinação de sementes de <i>C. vernum</i> em diferentes meios de cultura, 60 dias após semeadura. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey (5%)	70

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

% - Porcentagem

± - Variando entre

μL – Microlitro

μEistein m⁻² s⁻² – MicroEistein por metro quadrado por segundo

°C – Graus Celsius

½ MS – Meio Murashige & Skoog (1962) com redução à metade da concentração dos macronutrientes

AA – Ágar-Aveia

ABA – Ácido abcísico

Alt. – Altura

BAP – 6-Benzilaminopurina

BDA – Batata- Dextrose- Ágar

cm – Centímetros

cm² – Centímetros quadrados

cm / dia – Centímetros por dia

CV – Coeficiente de variação

FA – Fubá-Ágar

FAA₅₀ – Formaldeído, ácido acético glacial e etanol à 50 %

FeEDTA - ferro-ácido etileno-diamino tetraacético

FV – Fonte de variação

g - Grama

GA₃ – Ácido giberélico

GL – Graus de liberdade

min. – Minutos

mL – Mililitros

mm – Milímetros

MS – Meio Murashige & Skoog (1962)

NaOCl – Hipoclorito de sódio

p – p valor

pH – Potencial hidrogeniônico

PVC – Policloreto de Vinila

v/v – volume por volume

RESUMO

GONÇALVES, F. J. **Aspectos fenológicos, associação micorrízica e germinação *in vitro* de *Cyrtopodium venum* Rchb.f. & Warm (orchidaceae)**. 2009.76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.¹

A espécie *Cyrtopodium venum* Rchb. f. Warm (Orchidaceae) é uma espécie de orquídea cujos relatos de ocorrência indicam ser uma espécie endêmica do Bioma Cerrado principalmente em fitofisionomias de Cerrado Rupestre. *C. venum* é uma espécie terrestre, crescendo em solos arenosos, ambientes secos e a pleno sol. Devido à beleza de suas flores e de sua inflorescência, *C. venum* apresenta elevado potencial ornamental e comercial. Entretanto, poucas informações estão disponíveis sobre aspectos de desenvolvimento, floração ou germinação desta espécie que possam ser utilizadas para a produção de mudas em maior escala para a utilização em floricultura ou paisagismo. Assim, o presente trabalho objetivou caracterizar a fenologia, a morfologia e os aspectos reprodutivos desta espécie de orquídea e estabelecer protocolos para germinação simbiótica e assimbiótica *in vitro*. O trabalho foi desenvolvido na Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo, um remanescente florestal de 500 ha do bioma Cerrado, cuja vegetação predominante é do tipo Cerrado Rupestre, localizada na Serra Dourada, município de Mossâmedes – GO. No período de setembro de 2007 a agosto de 2008 foram realizadas visitas mensais para acompanhamento e coleta de dados fenológicos e de biologia floral de 63 indivíduos, distribuídos em quatro sub-populações. Para o estabelecimento dos protocolos de germinação *in vitro* de *C. venum* estabeleceu-se o cultivo simbiótico, pareando o isolado fúngico contendo o micélio micorrízico de *Epulorhiza* sp., obtido a partir de raízes de *C. venum*, com as sementes de *C. venum* em meio FA. Também foram realizados cortes histológicos destas raízes para verificação do padrão de colonização dos fungos micorrízicos. Para o cultivo assimbiótico as sementes foram cultivadas em três tipos diferentes de meios: meio MS completo, meio MS com redução à metade da concentração de macronutrientes (½ MS) e o meio Knudson (KC). A análise do comportamento de *C. venum* permitiu verificar que esta espécie apresenta o início da floração com o início do período chuvoso e que o florescimento está estreitamente relacionado com a ação do fogo. Logo após o florescimento, ainda no período chuvoso, plantas de *C. venum* passam a investir sua energia na produção de partes

¹ Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov. EA-UFG.

vegetativas, como novos pseudobulbos e folhas. O estabelecimento da germinação simbiótica *in vitro* não revelou resultados satisfatórios uma vez que a formação de protocormos não foi obtida. Com relação ao cultivo assimbiótico, ocorreu a formação de protocormos nos três meios testados, sendo o meio ½ MS superior ao KC e ao MS completo para o tempo, taxa de germinação de sementes e formação de protocormos. Porém, o desenvolvimento de novas plântulas não ocorreu em nenhum dos três meios, indicando a necessidade de indução de organogênese via ação de fitohormônios.

Palavras-chave: orquídeas, Cerrado, propagação.

ABSTRACT

GONÇALVES, F. J. **Phenological aspects, mycorrhizal association and in vitro germination of *Cyrtopodium vernum* Rchb.f. & Warm (Orchidaceae)**. 2009. 76 f. Dissertation (Master in Agronomy: Genetic and Plant Breeding)-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.¹

Cyrtopodium vernum Rchb. f. Warm (Orchidaceae) is a species widely distributed in Brazilian savannah, mainly in Cerrado Rupestre. *C. vernum* is a terrestrial plant, growing in sand soil, dry environment and it grows in full sun. Due to beauty of its flowers and its inflorescence, *C. vernum* presents high ornamental and commercial potential. However, few information are available on aspects of development, budding or germination of this species that can be used for the production of plants in scale for use in commercial production. Thus, the present study objectified to characterize the phenology, the morphology and the reproductive aspects of this species and to establish protocols for symbiotic and asymbiotic germination *in vitro*. The plants studied grows at the Biological Reserve Prof. Jose Ângelo Rizzo, a forest remainder of 500 ha of Cerrado biome, whose predominant vegetation is the type Cerrado Rupestre, located in the Serra Dourada, city of Mossamedes-GO. From the months of July of 2007 through August of 2008 monthly visits had been carried out for accompaniment and collects data of 63 plants, distributed in four subpopulations. For the establishment of the germination protocols *in vitro* of *C. vernum* established the symbiotic culture, pairs the isolated fungic contends the mycorrhizae *Epulorhiza* sp., obtained from roots of *C. vernum*, with the seeds of *C. vernum* in medium FA, and the asymbiotic culture, where the seeds had been cultivated in culture mediums that are regularly used for seed orchids germination, being the complete MS medium, the MS medium with reduction to the half of the concentration of macronutrients (½ MS) and the Knudson medium (KC). Also histological slides of these roots were made for verification the mycorrhizae symbiotic interactions in the roots. The analysis of the behavior of *C. vernum* allowed to verify that this species presents the beginning of the budding with the beginning of rainy season and that the bloom is narrowly related with the action of the fire. Soon after the bloom, still in the rainy period, plants of *C. vernum* starts to invest its energy in the production of vegetative parts, as new pseudobulbs and leaves. The establishment of the symbiotic germination *in vitro* did not disclose resulted

¹ Adviser: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov. EA-UFG.

satisfactory because no protocorms formation were obtained. However, satisfactory results had been founded in the asymbiotic germination *in vitro*, being the ½ MS medium superior to the KC and the complete MS medium for the time, germination of seeds and establishment of protocorms. However, the development of new plants did not occur in none of the three medium, indicating the necessity of the fitohormone use to induce the differentiation and organogenesis.

Key words: orchids, Cerrado, propagation

1 INTRODUÇÃO GERAL

A família Orchidaceae é a que apresenta maior diversidade entre as angiospermas e perfaz 7% entre todas as plantas com flores, com distribuição em quase todo o planeta, com cerca de 35.000 espécies em 800 gêneros e mais de 100.000 híbridos (Miller & Warrem, 1996). Segundo Dressler (1981), as orquídeas originaram-se no período Cretáceo, na região onde hoje compreende a Malásia. Caracterizam-se por serem cosmopolitas e apresentam maior diversidade nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Atualmente, estas estão distribuídas em 191 gêneros e aproximadamente 2.300 espécies. Para o Bioma Cerrado, a estimativa é de cerca de 600 espécies. Muitas espécies, raramente observadas na natureza, encontram-se em diversas listas de prioridade máxima de conservação, por apresentarem baixo sucesso reprodutivo ou habitat restrito (Mendonça & Lins, 2000). Mesmo espécies ainda não listadas encontram-se ameaçadas, justificando trabalhos que visem a sua conservação e reintrodução em ambiente natural. Entretanto, a organização eficiente de programas de reintrodução, conservação e manejo de orquídeas na natureza requer um conhecimento detalhado das estratégias reprodutivas dessas espécies na natureza (Pereira et al., 2003).

Com a descoberta do método assimbiótico de propagação por semente e cultura meristemática *in vitro*, tornou-se possível produzir grande quantidade de inúmeras espécies e híbridos de orquídeas (Paula & Silva, 2004). Porém, pouco tem sido feito com aquelas nativas do Cerrado. Na natureza, as orquídeas necessitam se associar, obrigatoriamente, a fungos micorrízicos para a germinação da semente e nutrição da planta. Estes fungos são de fundamental importância para que a espécie possa completar o seu ciclo de vida, pois além de serem responsáveis pela germinação das sementes, também extraem nutrientes do solo possibilitando a fixação pela planta adulta, o mesmo ocorre com as plantas epífitas e rupículas (Arditti, 1992; Pereira et al., 2003). Diante do exposto, o conhecimento dos fungos micorrízicos associados ao sistema radicular, bem como o seu uso em programas de propagação simbiótica de orquídeas, é de grande importância para a reintrodução, conservação e manejo dessas espécies vegetais (Pereira et al., 2003).

As orquídeas apresentam uma característica única entre as angiospermas: uma estrutura parenquimatosa, o protocormo, que tem origem entre o estádio de semente e plântula, e que utiliza a digestão enzimática de fungos simbiotes como meio alternativo para a obtenção de energia, fenômeno denominado micotrofismo. Fungos micorrízicos de orquídeas já foram isolados de seus hospedeiros naturais, visando à germinação de suas sementes *in vitro*, para fins de reintrodução de espécies ameaçadas de extinção em seu ambiente natural (Zettler, 1997; Peterson et al., 1998; Pereira et al., 2003). Além do isolamento do hospedeiro natural, fungos micorrízicos em cultura pura, previamente isolados de diferentes hospedeiros, são usualmente empregados no cultivo simbiótico da espécie de interesse, visando estudos de especificidade e seleção de isolados que promovam o melhor desenvolvimento dos protocormos (Stewart & Zettler, 2002).

A conservação de sementes em bancos de germoplasma seria outra alternativa interessante para algumas espécies de orquídeas. A vitalidade dessas sementes pode ser favorecida com a adequação do período de coleta dos frutos e com as reduções do teor de água destas estruturas, da temperatura e da pressão de oxigênio na atmosfera de armazenamento (Mello, 2000). O uso de bancos de sementes para conservação *ex situ* de germoplasmas de orquídeas depende de disponibilidade de conhecimentos, capazes de permitir a definição de temperaturas e graus de umidade ao armazenamento (Koopowitz, 1996).

O melhoramento e o cultivo de espécies de orquídeas são necessários por duas razões: a primeira delas é que o extrativismo não irá suprir a demanda por matéria-prima à medida que as espécies forem atingindo maior importância econômica. A segunda razão é que produtores de flores, para se planejarem administrativamente, precisarão saber com que quantidade, regularidade e padrão de qualidade poderão contar com a matéria-prima que irão processar. Através do extrativismo ou do manejo sustentado, nem sempre se consegue matéria-prima nas especificações que o comprador deseja, pois fatores genéticos, ontogenéticos (o estádio de desenvolvimento da planta) e ambientais dificultam a obtenção de um bom padrão de qualidade, além de responder aos quesitos quantidade e regularidade de maneira menos previsível e elástica do que sob condições de cultivo.

Em função da preocupação com a preservação de *Cyrtopodium vernum* Rchb. f. & Warm, do potencial ornamental e comercial desta espécie e do sucesso da aplicação das técnicas de cultivo *in vitro* para a produção de mudas, tanto para o melhoramento genético quanto para programas de reintrodução da espécie em seu ambiente natural, este

trabalho teve como objetivos a caracterização fenológica, morfológica e reprodutiva de *C. vernum*, o isolamento e identificação de fungos formadores de micorrizas associadas as suas raízes e o estabelecimento de protocolos para a germinação simbiótica e assimbiótica desta espécie de orquídea *in vitro*.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – FAMÍLIA ORCHIDACEAE

A família Orchidaceae possui cerca de 800 gêneros e 35.000 espécies distribuídas em todo o planeta, sendo encontradas nos mais variados tipos de ambiente, com exceção das regiões polares e desertos secos (Miller & Warrem, 1996). No Brasil, ocorrem em maior abundância na Mata Atlântica, mas são observadas também em outros biomas como matas ciliares de todo o país, no Cerrado, na Floresta Amazônica e na Caatinga. Até o momento, das 3.500 espécies de orquídeas localizadas no país, cerca de 500 a 600, ocorrem no Cerrado (Colombo et al., 2004).

2.2 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS ORQUÍDEAS

De acordo com seu local de crescimento as orquídeas podem ser classificadas como terrestres: crescem diretamente no solo (Figura 2.1 A); rupícolas: vivem diretamente sobre as rochas (Figura 2.1 B); saxícolas: vivem nas fendas das pedras, onde ocorre deposição de matéria orgânica e material oriundo da rocha decomposta (Figura 2.1 C); e epífitas: vivem em árvores, beneficiando-se da umidade e dos sais minerais disponíveis sobre a casca (Figura 2.1 D). Apresentam dois tipos de crescimento: simpodial (Figura 2.2 A), com brotação lateral, e monopodial (Figura 2.2 B), com crescimento terminal em um único eixo. Em muitas orquídeas simpodiais, o caule pode ser constituído por uma porção rasteira, o rizoma, e uma porção vertical engrossada, o pseudobulbo. Nas monopodiais, o caule é alongado, não existe rizoma ou pseudobulbos (Bernardo, 2002). Morfologicamente, as orquídeas são constituídas de raiz, caule, folha, inflorescência, flor, fruto e semente (Paula & Silva, 2004).



Figura 2.1. Hábito de crescimento de orquídeas, os círculos mostram as plantas em seus habitats naturais. (A) orquídea terrestre (A1) detalhe da flor de *Epistephium lucidum* Cogn., (B) orquídea rupícola (*Bulbophilum* sp.), (C) orquídea saxícola (*Cyrtopodium* sp.), (D) orquídea epífita (*Cyrtopodium santlegerianum* Rchb. f.) (Fotos – Fábio José Gonçalves).



Figura 2.2. Tipos de crescimento de orquídeas. (A) crescimento simpodial (*Cattleya* sp.), (B) crescimento monopodial (*Wanda* sp.). (Fotos. Fábio José Gonçalves).

2.2.1 Raiz

As raízes das orquídeas surgem ao longo do caule e, quando aéreas, possuem as extremidades clorofiladas (Figura 2.3 A), realizando desse modo, a fotossíntese. Portanto, deve-se proporcionar a esse tipo de orquídeas, substratos que permitam bom arejamento. Nas orquídeas terrestres, as raízes, em geral, são tuberosas, ou seja, acumulam reservas de nutrientes (Paula & Silva, 2004). A maioria das orquídeas, independentemente do local de crescimento, apresenta um tecido esbranquiçado e esponjoso revestindo suas raízes, denominado velame (Figura 2.3 B). Este tecido é responsável pela rápida absorção de água e nutrientes, permitindo que muitas espécies vivam em locais praticamente desprovidos de solo como rochas, sobre areia ou galhos (Bernardo, 2002).



Figura 2.3. Raízes de orquídea. As setas indicam (A) ponta clorofilada, (B) velame (Foto – Fábio José Gonçalves).

2.2.2 Caule

O caule é uma estrutura pouco perceptível, de onde crescem as raízes, folhas e inflorescências, sendo na maioria das espécies do tipo rizoma. Sobre o rizoma, na base das folhas em algumas espécies forma-se uma estrutura geralmente de conformação bulbosa, chamada de pseudobulbo (Figura 2.4 A), que é o local de armazenamento de água e

nutrientes. O pseudobulbo ocorre nas orquídeas de crescimento simpodial e na maioria das epífitas. Em alguns gêneros, como em *Cyrtopodium*, apresenta vários nós, nos quais após a floração desenvolvem algumas vezes, novos brotos a partir de gemas axilares (Figura 2.4 B) (Paula & Silva, 2004).

Na maioria das espécies, forma-se um pseudobulbo por ano por frente de crescimento. As orquídeas possuem capacidade de translocar partes de nutrientes armazenados nos pseudobulbos mais velhos para os que estão em formação. Assim, deve-se manter os pseudobulbos mais velhos nas plantas até um pouco antes deles murcharem ou apresentarem sinal de apodrecimento (Paula & Silva, 2004).

Algumas espécies não apresentam pseudobulbos nem rizoma, mas sim uma haste, que é um caule do tipo aéreo, ereto, herbáceo, ao longo do qual se inserem as folhas. Algumas hastes emitem brotações aéreas após a floração; esses brotos podem ser removidos para se obter uma nova planta (Paula & Silva, 2004).



Figura 2.4. (A) Pseudobulbos de *Cyrtopodium eugenii* Rchb. f. & Warm., (B) brotação na região de nó de *Cyrtopodium santlegerianum* Rchb. f. (Foto – Fábio José Gonçalves).

2.2.3 Folha

A folha é geralmente alongada, inserindo-se no ápice ou na base do pseudobulbo, ou ao longo da haste. É constituída por lâmina ou por lâmina e bainha. Pode ter uma por pseudobulbo ou várias. Em algumas espécies terrestres, as folhas se dispõem em rosetas, como nas bromélias. Quanto à consistência, podem ser herbácea ou coreácea. Na época da

floração forma-se uma bráctea na qual emerge uma inflorescência. Essa bráctea é normalmente chamada de espata (Paula & Silva, 2004). Segundo Silva et al. (2006) espécies de orquídeas apresentam caracteres xeromórficos: folhas coriáceas ou coriáceas suculentas, cutícula espessa e estriada, hipoderme, grupos de fibras esparsas no mesofilo homogêneo, parênquima aquífero com espessamento em barras ou espiralados nas paredes, idioblastos de ráfides e feixes vasculares colaterais circundados e com calotas de fibras. Nas espécies com redução das partes aéreas ocorrem investimentos diferenciados e os caracteres xeromórficos não são acentuados. As folhas são delgadas, com células epidérmicas adaxiais altas, sendo a cutícula delgada geralmente desprovida de estriamentos e a presença de idioblastos de ráfides frequentes no mesofilo. Não ocorre hipoderme e os feixes vasculares são reduzidos e sem associações com fibras.

2.2.4 Inflorescência e flores

Quando a flor e o conjunto dos órgãos que a sustenta, junto com os seus acessórios (como brácteas etc.) surgem em agrupamentos e não de forma isolada, tem-se uma inflorescência. Dependendo do tipo de ramificação as inflorescências recebem o nome de racimo, panícula, etc. No caso de *Cyrtopodium*, por exemplo, a inflorescência mais comum é a do tipo rácimo (Rocha, 2008). Esta pode surgir no ápice ou na base do pseudobulbo, ou ainda entre as folhas naquelas que possuem caule do tipo haste. Para as que possuem folhas do tipo roseta, a inflorescência emerge do centro desse agrupamento de folhas (Paula & Silva, 2004).

A flor das orquídeas é constituída de três sépalas (mais externas) e três pétalas (mais internas). Na maioria das espécies, uma das pétalas é distinta das demais e recebe um nome especial, o labelo, que geralmente apresenta cores vistosas e serve como atrativo e campo de pouso aos polinizadores. No centro da flor encontra-se um órgão especializado, a coluna, resultado da fusão dos estames (órgãos de reprodução masculinos) com o pistilo (órgão de reprodução feminino) (Figura 2.5). No ápice da coluna, os grãos de pólen apresentam-se unidos em pequenas massas, ou polínias, protegidas pela antera. Logo abaixo, uma pequena cavidade representa a porção receptiva feminina, o estigma (Paula & Silva, 2004).

Pela sua estrutura reprodutiva, as orquídeas obrigatoriamente necessitam do auxílio de animais, principalmente insetos, para o transporte do pólen ao órgão feminino de

suas flores, uma vez que a massa polínica é pesada demais para ser levada pelo vento, e a parte receptiva do órgão feminino não é exposta o suficiente para recebê-la naturalmente. Assim, as orquídeas desenvolveram diferentes estratégias para promover a polinização. As flores podem possuir cores e aromas que atraem a atenção de polinizadores diversos, como abelhas, borboletas, mariposas diurnas e noturnas, morcegos, besouros e beija-flores. Sua forma e tamanho também correspondem ao tipo de polinizador (Bernardo, 2002).

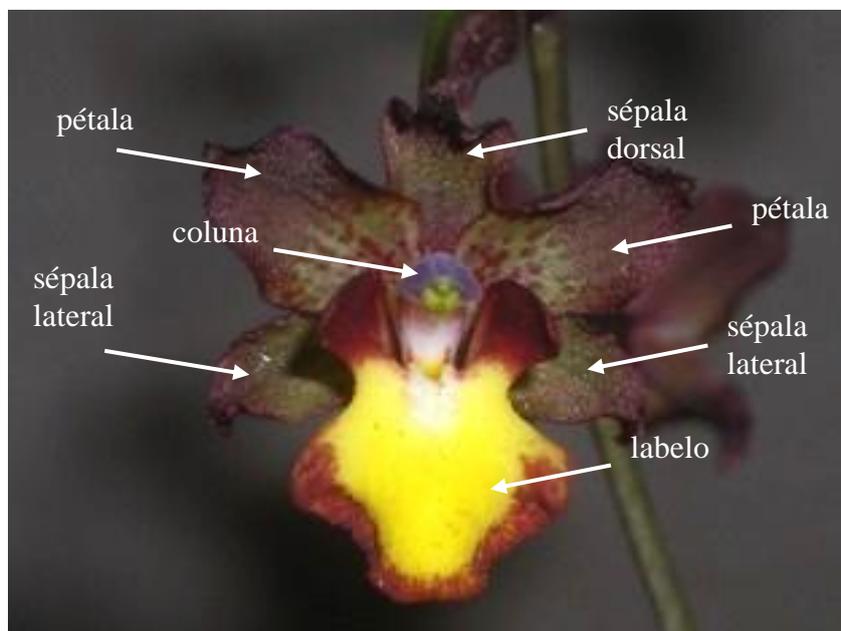


Figura 2.5. Flor de *Cyrtopodium gonzalezii* L.C. Menezes indicando suas peças florais (Foto – Fábio José Gonçalves).

O néctar é um recurso floral encontrado em flores de orquídeas visitadas por borboletas, abelhas, beija-flores e também em algumas flores visitadas por moscas, sendo a concentração e o volume variáveis (Baker & Baker 1982; Vogel 1983). Nestas flores, o néctar geralmente é produzido e armazenado no cálcx, uma estrutura que surge como prolongamento de algum segmento do perianto, podendo ser tubular ou saquiforme (Dressler, 1981).

2.2.5 Fruto e semente

O fruto das orquídeas, denominado cápsula, encerra seu desenvolvimento entre três e doze meses, sendo em média nove meses, após a fecundação dos óvulos no ovário, quando então se rompe em três fendas longitudinais, liberando as sementes. O fruto pode conter mais de um milhão de sementes (Figura 2.6). Contudo, na natureza, somente cerca

de 1% germinará, e poucos indivíduos chegarão à fase adulta. As sementes das orquídeas estão entre as menores do reino vegetal. O tamanho reduzido e a leveza facilitam a dispersão pelo vento, em muitos casos a grandes distâncias (Paula & Silva, 2004).



Figura 2.6. Fruto de *Cattleya nobilior* Rchb. f. seccionado longitudinalmente mostrando seu interior com sementes (Foto – Fábio José Gonçalves).

2.3 ORQUÍDEAS DO CERRADO

Segundo Dias (1992), o Cerrado ocupa aproximadamente 2 milhões de quilômetros quadrados do território brasileiro, o que corresponde a 23% da área total do país, e fica localizado entre 3° e 24° de latitude sul e 41° e 63° de longitude oeste. Este bioma compreende todo o Distrito Federal, os estados de Goiás e Tocantins e porções de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Piauí, Maranhão e Rondônia. Cabe ainda salientar a ocorrência de manchas da vegetação de Cerrado nos estados do Pará, Amapá, Roraima, São Paulo e Paraná. Além do território brasileiro, esta vegetação encontra-se em áreas da Bolívia. Segundo Mendonça et al. (1998), a flora do Cerrado é apenas parcialmente conhecida, e as famílias mais representadas no bioma são Leguminosae, seguida de Compositae, Orchidaceae, Gramineae, Rubiaceae, Melastomataceae, Myrtaceae, Euphorbiaceae, Malpighiaceae e Lythraceae. Essas dez famílias, que retratam menos de 7% do total de famílias encontradas, contribuem com mais de 51% da riqueza florística do Cerrado. A família Orchidaceae está entre as mais ricas do Cerrado, como também nas Florestas Atlântica e Amazônica. No Cerrado há o predomínio

de orquídeas terrestres, com 51% das espécies, seguidas de espécies epifíticas, com 37% (Mendonça et al., 1998). Batista et al. (2005) apresentaram uma lista de espécies de orquídeas registradas na Reserva do Guará, no Distrito Federal. Segundo os autores, dos 44 gêneros, 100 espécies, quatro variedades e uma forma, totalizando 105 táxons de orquídeas o gênero *Habenaria* destaca-se com 32 táxons (30 espécies). Outros grupos bem representados na Reserva são a subtribo Spiranthinae, com seis gêneros e 14 táxons (13 espécies) e *Cyrtopodium* (7 espécies). Ainda segundo os autores, dos 105 táxons registrados para a área, 76% são terrestres, 21% são epífitas; 2%, representados por *Vanilla*, são escandentes, ou seja, crescem emitindo novos brotos para o alto, de modo a subir pelas árvores em direção à luz e 1%, *Epidendrum secundum*, cresce tanto como terrestre como epifítico.

2.3.1 Importância do fogo na reprodução de orquídeas do Cerrado

No Cerrado, a ocorrência de fogo é um fenômeno antigo, o que é evidenciado pela existência de amostras de carvão datadas entre 27.100 a 41.700 anos antes do presente (Vicentini, 1993). Segundo Coutinho (1990), o fogo é um dos determinantes da vegetação deste bioma, juntamente com a sazonalidade da chuva e com o solo pobre em nutrientes. Entre as características que reforçam a idéia de estratégias adaptativas dessa vegetação ao fogo, estão a forte suberização do tronco e dos galhos, o que permite certo grau de isolamento térmico dos tecidos internos, mesmo em temperaturas elevadas (Coutinho, 1990; Guedes, 1993), e também a capacidade que os frutos têm de proteger as sementes por apresentarem cascas coreáceas ou frutos com polpa densa (Landim & Hay, 1995; Cirne, 2002).

Já foram verificados efeitos positivos do fogo sobre a dispersão de sementes de algumas espécies vegetais por promoverem abertura de frutos indeiscentes ou semi deiscentes (Coutinho, 1977) e em relação à indução de floração do estrato herbáceo (Coutinho, 1976; Oliveira et al., 1996). Trabalho realizado por Coutinho (1976) mostrou que 150 espécies do estrato herbáceo subarbustivo floresceram em até 90 dias após a ocorrência de queimadas em diferentes estados da região do Cerrado. Após a queima, este estrato encontra-se num crescimento vigoroso, que em poucos dias apresenta seus órgãos subterrâneos estimulados a rebrotar (Figura 2.7). A indução à floração, em resposta ao fogo, tem importante papel para as populações que assim se comportam, pois, ao

sincronizar a produção de flores, permitem a polinização cruzada (Coutinho, 1990). Freitas (1998) apresenta resultados semelhantes em estudo sobre áreas recém queimadas de Campo Sujo, onde 135 espécies floresceram entre 14 e 94 dias após a passagem do fogo. O efeito do fogo na floração de orquídeas também pode ser observado. Schepe (1970), citado por Menezes (2000), observa que os incêndios naturais não causam danos às espécies terrestres de orquídeas da África do Sul e que algumas espécies são mais floríferas após a passagem do fogo. Trabalho realizado por Oliveira et al. (1996), mostrou que 44 espécies de orquídeas terrestres floresceram depois das queimadas em áreas de Cerrado, com algumas florescendo até duas semanas após a passagem do fogo (Figura 8). Segundo os autores, *Habenaria armata* floresceu intensamente logo após a passagem do fogo, não se verificando nenhuma floração nos quatro anos anteriores, enquanto a área de estudo esteve protegida da queima.

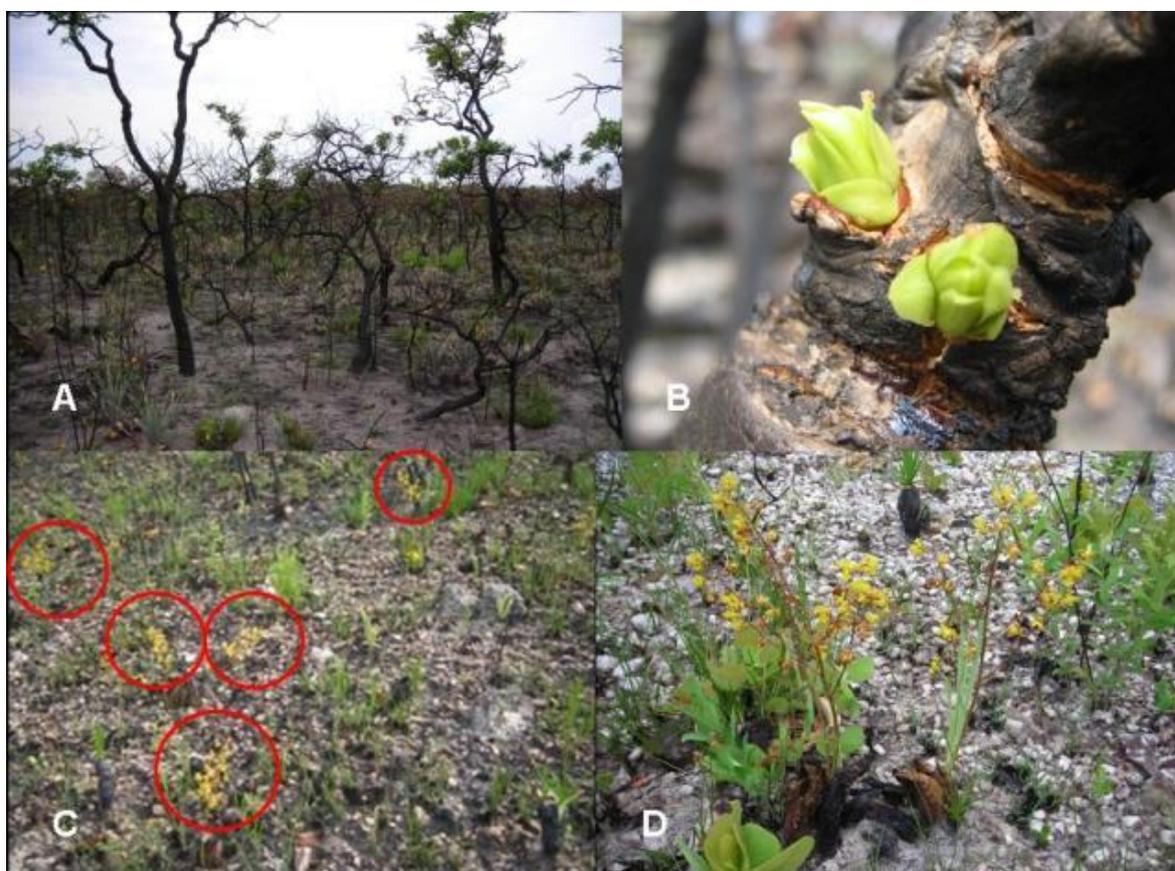


Figura 2.7. Área queimada pelo fogo (A), Planta em rebrota após passagem do fogo (B), *Cyrtopodium venum* florescendo após a passagem do fogo (C e D) em Cerrado Rupestre da Reserva Biológica José Ângelo Rizzo, em Mossâmedes – GO (Fotos – A e B, Sérgio Tadeu Sibov; C e D, Fábio José Gonçalves).

2.4 O GÊNERO *Cyrtopodium*

O gênero *Cyrtopodium* foi proposto por Robert Brown, em 1813. O nome do gênero vem do grego *kyrtos*, inclinado, e *podium*, pé, provável referência à inclinação do pé da coluna de suas flores (Menezes, 2000). Apresenta porte muito variável, pseudobulbos agrupados, que em algumas espécies são baixos e espessos, em outras altos e mais delgados, chegando a superar os setenta centímetros de altura, envoltos em bainhas foliares. Possuem estreitas e finas folhas disticamente organizadas e nervuradas, caducas, de lâmina articulada e ápice acuminado. A inflorescência brota da base do pseudobulbo, podendo ser racemosa ou paniculada, ereta, e carrega-se de pequenas flores protegidas por grandes brácteas vistosas, unduladas e coloridas, que em alguns casos parecem fazer parte das flores com cerca de três centímetros de diâmetro, geralmente amarelas, com ou sem pintas marrons ou avermelhadas. O labelo de suas flores, mais ou menos trilobado, apresenta complicado calo verrucoso ou tuberculado. A coluna é levemente arqueada, com antera terminal e duas polínias (Watson & Dallwitz, 1992). *Cyrtopodium* é um gênero Neotropical, distribuído do sul da Flórida ao norte da Argentina e contém aproximadamente 45 espécies, principalmente terrestres, mas também epífitas e rupícolas, das quais 36 ocorrem no Brasil. O centro de diversidade do gênero é o Cerrado do Brasil Central, onde ocorrem cerca de 28 espécies (Batista & Bianchetti, 2004).

2.4.1 A espécie *Cyrtopodium vernum* Rchb. f. & Warm

Segundo Menezes (2000), *C. vernum* é uma espécie terrestre, apresenta flores atrativas e vistosas de cor amarela áurea (Figura 2.8 A). Apresenta pseudobulbos fusiformes, entre 10 cm a 15 cm de altura de onde surgem folhas coreáceas. Inflorescência paniculada que pode atingir até 1 m de altura. Flores perfumadas com pouco mais de 3 cm de diâmetro. Região apical das sépalas e pétalas salpicadas com traços e pontos marrom avermelhados. Floresce durante a primavera, no início de outubro, com o início das chuvas, época em que ocorrem os últimos incêndios na região de seu habitat, que são os Campos Rupestres (*lato sensu*), Cerrado (*lato sensu*) e Campo Sujo Seco (Sano et. al., 2008), e de suas flores, surgem os frutos (Figura 2.8 B).

Tem potencial ornamental pela beleza de suas flores e número destas em suas inflorescências, podendo ser utilizadas em arranjos, como flores de corte ou mesmo para

vasos. Na sua fase vegetativa podem ser utilizada em jardins, pois seus pseudobulbos, ainda que sem folhas tem potencial ornamental devido a sua estrutura e coloração verde com estrias marrons (Silva, 1994).



Figura 2.8. Flor de *Cyrtopodium venum* (A), pseudobulbos (setas) e cápsula (círculo) de *C. venum* em ambiente natural (B) (Fotos – Fábio José Gonçalves).

2.5 – PROPAGAÇÃO DE ORQUÍDEAS

2.5.1 Propagação vegetativa

O método mais simples de reprodução é, em geral, a divisão do rizoma. Toma-se uma planta adulta com pelo menos seis pseudobulbos formados, de preferência logo após o término da floração ou início da brotação, e, com uma faca afiada e esterilizada, corta-se o rizoma, de maneira a separar a planta em duas mudas com três pseudobulbos cada. Em casos de plantas maiores, deve-se sempre manter cada muda com o mínimo de três ou quatro pseudobulbos para permitir seu rebrotamento. O plantio deve ser feito em substrato adequado à espécie. A muda deve ficar fixa no local do plantio, de alguma forma para que as novas raízes possam brotar e se fixar no substrato. Só quando as raízes estiverem restabelecidas, as plantas voltarão a crescer (Paula & Silva, 2004).

A propagação pode ser realizada por estaquia e esse método é muito utilizado para as espécies do gênero *Dendrobium*. Nestas, o caule, chamado haste, apresenta vários nós, e em cada um há uma gema capaz de formar um novo broto. Assim, pode-se propagá-las

quando iniciar a brotação. Para a realização deste procedimento deve-se selecionar as hastes de maior desenvolvimento e que já emitiram a floração, retirar suas folhas, cortar a haste com uma tesoura esterilizada em pedaços com pelo menos dois nós. Deixar as estacas em local bem iluminado e arejado, sem sol direto, por dois dias, para promover a cicatrização dos cortes. Encher uma bandeja plástica com areia de rio lavada e colocar as estacas deitadas sobre o substrato, preferencialmente com uma gema voltada para cima, e colocar bandeja em local arejado e sombreado (Paula & Silva, 2004). Em poucos dias os novos brotos estarão desenvolvidos e, assim que emitirem raízes, poderão ser colocados em vasos com substrato.

2.5.2 Propagação por sementes

Ao contrário das outras plantas, as sementes das orquídeas são desprovidas de tecidos nutritivos, endosperma e cotilédone, responsáveis pelo fornecimento de energia utilizada na fase inicial da germinação. Na falta de tecido nutritivo, essa energia é fornecida por certos fungos que vivem em simbiose com as orquídeas. O fungo invade a semente e como o desenvolvimento e degeneração de suas hifas é rápida, fornece nutrientes ao embrião, para que esse se desenvolva (Paula & Silva, 2004). As orquídeas utilizam-se da digestão de massas de hifas formadas intracelularmente e denominadas *pelotons*. Tais estruturas estão presentes principalmente nas células do córtex da raiz, como fonte de energia, durante o estágio heterotrófico do seu ciclo de vida (Peterson et al., 1998). Com a formação das raízes, esse fungo vive para sempre em simbiose com a planta. Com a descoberta dos fungos micorrízicos das orquídeas, foi possível compreender esse processo e desenvolver métodos simbióticos e assimbióticos de propagação por sementes (Paula & Silva, 2004). Esse fenômeno, conhecido por micoheterotrofismo ou simplesmente micotrofismo, não é exclusivo das orquídeas, sendo também relatado em outras famílias de monocotiledôneas, a saber: Burmanniaceae, Corsiaceae, Lacandoniaceae, Petrosaviaceae e Triuridaceae e, em famílias de dicotiledôneas, como: Ericaceae (Monotropoideae), Polygalaceae e Gentianaceae (Taylor et al., 2002).

2.5.3 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos é um meio de cultivar células ou tecidos vegetais sob condições controladas para se regenerar plantas. Nesse ambiente, as células, tecidos e

órgãos se multiplicam e continuam a crescer de modo não organizado ou se regeneram em uma planta inteira (Grattapaglia & Machado, 1998). Esta é, sem dúvida, um excelente instrumento de trabalho, podendo ser utilizada como técnica auxiliar ao melhoramento genético convencional, capaz de ampliar a variabilidade genética, reduzir o tempo para lançamento de novas cultivares, introduzir genes de interesse agrônômico, entre outras vantagens. Atualmente, esta técnica vem sendo amplamente utilizada como uma ferramenta biotecnológica para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades desejáveis, tais como resistência a pragas e acúmulo de substâncias ativas de interesse comercial. O grau de sucesso em qualquer tecnologia que emprega cultura de células, tecidos ou órgãos é dependente de vários fatores. Um fator significativo é a escolha dos componentes nutricionais e reguladores de crescimento que controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento na cultura de tecidos. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células (Damião Filho, 2002).

A cultura de tecidos é frequentemente utilizada para a propagação clonal em massa de híbridos e espécies de orquídeas, possibilitando a obtenção de plantas de alta qualidade fitossanitária, em curto período de tempo (Arditti & Ernst, 1993).

A cultura assimiótica ou sementeira *in vitro*, de orquídeas, constitui técnica bastante relevante do ponto de vista comercial e também ecológico. Essa resulta em maiores percentuais de germinação, em comparação com as condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos, simbiontes muitas vezes espécie-específicos (Martini, 2001). Porém, trabalhos realizados por Pereira et al. (2003), utilizando-se o método simbiótico de germinação de sementes, ou seja, com presença de fungos micorrízicos, indicam que estas plantas se adaptam melhor às condições naturais do que plantas produzidas pelo método assimiótico de cultivo, sendo mais interessantes em programas de reintrodução de espécies.

Experimentos vêm evidenciando que, dentro da família Orchidaceae, as condições de cultivo simbiótico *in vitro* são específicas para os gêneros e algumas vezes variam para espécies pertencentes ao mesmo gênero (Arditti & Ernst, 1993). Segundo Caramaschi & Caldas (1999), citados por Martini (2001), vários trabalhos foram desenvolvidos visando otimizar a sementeira *in vitro* de orquídeas; para isso, a adição de

componentes aos meios de cultura é balanceada afim de se obter uma germinação mais eficiente das sementes. Como exemplo, a adição do fitohormônio BAP (6-benzilaminopurina) no meio de cultura para germinação de sementes de orquídeas tem apresentado resultados contrastantes. Martini et al. (2001) avaliaram a germinação e a organogênese *in vitro* em orquídeas *Gongora quinquenervis* em dois meios nutritivos, Knudson "C" e Murashige & Skoog, com três concentrações de BAP (0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹). Segundo os autores, os protocormos cultivados no meio Knudson "C" necrosaram e a maioria dos embriões cultivados em meio Murashige & Skoog tendeu a diferenciar-se em calos. Estes calos apresentaram alto potencial morfogenético, regenerando grande número de plantas via organogênese indireta, sobretudo no material proveniente do tratamento desprovido de BAP. Efeitos positivos, como a redução do tempo de germinação de *Encyclia phoenicea*, foram observados por Pauw et al. (1995), citados por Martini (2000), em razão da adição de BAP ao meio de Murashige & Skoog (1962). Por outro lado, a adição de BAP a diversos meios nutritivos, como o meio MS e Knudson C resultou em efeitos deletérios para a germinação de sementes imaturas de *Cyrtopodium eugenii* Rchb. f. & Warm. e *Cyrtopodium cristatum* Lindl. (Caramaschi & Caldas, 1999).

A propagação vegetativa *in vitro*, também conhecida como micropropagação por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática na cultura de tecidos e aquela de maior impacto (Grattapaglia & Machado, 1998), por ser mais eficiente que a produção natural das espécies.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por Morel em 1960, ao se multiplicar orquídeas mediante cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos. A sucessiva divisão desses protocormos acelera a propagação dessas plantas. A utilização da micropropagação em âmbito comercial é realidade há mais de 20 anos em diversos países do mundo, com destaque para os países da Europa Ocidental, Estados Unidos e Taiwan. Os laboratórios comerciais surgiram, em grande maioria, agregados aos viveiros como iniciativa das próprias companhias produtoras de mudas. O objetivo é satisfazer as necessidades internas de material de propagação livre de doenças, ou acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa. A atividade comercial de micropropagação concentra-se principalmente na limpeza clonal e na multiplicação de espécies ornamentais e arbustivas e, em segundo plano, as lenhosas.

No Brasil, apesar dos primeiros trabalhos com cultura de tecidos terem sido realizados na década de 50 pelo Dr. Agesilau Bitancourt do Instituto Biológico de São

Paulo, a aplicação comercial da micropropagação é relativamente recente. Diversos grupos atuam na área em instituições públicas de pesquisa e universidades, entretanto poucas são as empresas privadas dedicadas à cultura de tecidos vegetais. Ainda não é difundida a prática de instalar laboratórios junto a viveiros, exceção feita para algumas empresas que produzem orquídeas e outras reflorestadoras que, nos últimos anos, têm iniciado a propagação vegetativa *in vitro* de árvores selecionadas (Grattapaglia & Machado, 1998).

A cultura de tecidos proporciona taxa de germinação de aproximadamente 100% das sementes, ao passo que a cultura de meristemas é utilizada para propagar plantas idênticas à planta-mãe e isentas de viroses, especialmente plantas de alto valor econômico (Fráguas et al., 2004). Portanto, estes métodos são eficientes na produção em larga escala de plantas de diversas espécies.

2.7 – REFERÊNCIAS

- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: J. Wiley, 1993.
- BAKER, H.G. & BAKER, I. 1982. Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. *In Handbook of experimental pollination biology* (C.E. Jones & R.J. Little, eds.). Van Nostrand, New York, p.117-141.
- BATISTA, J. A. N. & BIANCHETTI, L. B. 2004. Three new taxa in *Cyrtopodium* (Orchidaceae) from central and southeastern Brazil. **Brittonia** 56: 260-274.
- BATISTA, J.A.N.; BIANCHETTI, L. de B. & PELLIZZARO, K. F. **Orchidaceae da Reserva Ecológica do Guará, DF, Brasil**. *Acta Bot. Bras.*, Jun 2005, 19, no.2, p.221-232.
- BERNARDO, A. **Saiba mais sobre as orquídeas**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2002.
- CARAMASCHI, G. M. C. L.; CALDAS, L. S. Comparação da germinação *in vitro* de sementes provenientes de frutos imaturos de *Cyrtopodium* spp. (Orchidaceae) com idades diferentes. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, p. 175, 1999. Suplemento.
- CHASE, M. W. & HILLS, H. G.. Orchid phylogeny, flower sexuality, and fragranceseking - Evidence from variation in chloroplast DNA among subtribes *Catasetinae* and *Cyrtopodiinae*. **BioScience**. 1992. 42: 43-49.
- CIRNE, P. **Efeitos do fogo na regeneração de *Kielmeyera coriacea* (Spr.) Mart. (Guttiferae) em áreas de cerrado *sensu stricto*: mecanismos de sobrevivência e época de queima**. 2002. 83 f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. R. F. P.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.6, n.2, p. 253-258, 2004.

COUTINHO, L. M. **Contribuição ao conhecimento do papel ecológico das queimadas na floração de espécies do cerrado**. 1976. 123 f. Tese (Livre Docência) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1976

COUTINHO, L. M. Aspectos ecológicos do fogo no cerrado. II – As queimadas e a dispersão de sementes em algumas espécies anemocóricas do estrato herbáceo-arbustivo. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 5, p. 57-64, 1977.

COUTINHO, L. M. Fire in the ecology of the brazilian cerrado. In: GOLDAMMER, J. G. (Ed.) **Fire in the Tropical Biota**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 82-105

DAMIÃO FILHO, C. F. **Micropropagação e semeadura de orquídeas (técnicas básicas)**. Ed. Funep. Jaboticabal, SP. 2006.

DIAS, B. F. de S. Cerrados: uma caracterização. In : DIAS, B. F. de S. **Alternativas de desenvolvimento dos Cerrados** : manejo e conservação dos recursos naturais renováveis. Brasília: FUNATURA: IBAMA, 1992. p.11-25.

DRESSLER, R.L. 1981. The orchids. **Natural History and classification**. Harvard University Press, Cambridge.

FRÁGUAS, C. B.; PEREIRA, A. R.; RODRIGUES, V. A.; FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M. **Propagação in vitro de espécies ornamentais**. Disponível em: http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdfextensao/bol_99.pdf

FREITAS, R.I. **Abelhas silvestres (Hymenoptera: Aploidea) e a floração de plantas em área de Cerrado recém queimadas no Distrito Federal**. 1998. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. em **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA, 1998. v. 1. p. 183-242

GUEDES, D. M. **Resistência das árvores do cerrado ao fogo: papel da casca como isolante térmico**. 1993. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 1993.

KOPOWITZ, H. Propagation for genetic diversity. In: HAGSATER, E.; DUMONT, V. (Ed.) **Orchids**. Cambridge: IUCN Publications Service Unit, 1996. p. 27-32.

LANDIM, M. F. & HAY, J. D. Impacto do fogo sobre alguns aspectos da biologia reprodutiva de *Kielmeyera coriacea* Mart. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 56, n. 1, 127-134, 1995.

MARTINI, Priscilla Cavalcante et al . Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por semeadura *in vitro*. **Pesq. agropec. bras.** , Brasília, v. 36, n. 10, 2001 .

MELLO, C.M.C. **Conservação de sementes de orquídeas do Cerrado**. 2000, 48 p. Dissertação (Mestrado em Biologia). - Universidade de Brasília, Brasília, 2000.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JUNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S. & NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do cerrado. In: SANO, S. M. & ALMEIDA, S. P. (Ed.), **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa CPAC, 1998. p. 289-556.

MENDONÇA, M.P. & LINS, L.V. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas & Fundação Zôo-Botânica de Belo Horizonte, 2000.

MENEZES, L. C. **Genus *Cyrtopodium* Espécies Brasileiras**. Brasília: IBAMA, 2000.

MILLER, D.; WARREN, R. **Orquídeas do alto da serra da mata atlântica pluvial do sudeste do Brasil**. Salamandra Consultoria Editorial Ltda, 1996. 256p.

MORAES, L.M.; CAVALCANTE, L. C. D.; FARIA, R. T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1397-1400, 2002.

OLIVEIRA, R. S.; BATISTA, J. A. N.; PROENÇA, C. E. B.; BIANCHETTI, L. Efeito do fogo na floração de espécies de Orchidaceae em Cerrado. In: MIRANDA, H. S.; DIAS, B. F. S.; SAITO, C. H (Eds.) **Impacto de queimadas em área de cerrado e restinga**. Brasília: Universidade de Brasília: Brasília, 1996. p. 61-67.

PAULA, C.C.; SILVA, H.M.P.; **Cultivo prático de orquídeas**. 3 ed. Viçosa: UFV, 2004.

PEREIRA, O.L.; ROLLEMBERG, C.L.; BORGES, A.C.; MATSUOKA, K. & KASUYA, M.C.M. *Epulorhiza epiphytica* sp.nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. **Mycoscience** **44**. 2003. 153–155 p.

PETERSON, R. L.; UETAKE, Y & ZELMER, C. **Fungal symbiosis with orchid protocorms**. **Symbiosis**, 25:29-55, 1998.

SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: Ecologia e Flora**. vol 2 Brasília. Embrapa. 2008.

SILVA, W. **Cultivo de orquídeas no Brasil**. 6 ed. São Paulo: Nobel, 1994.

SILVA, I. V et. al. Estratégias anatômicas foliares de treze espécies de Orchidaceae ocorrentes em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB) - MG, Brasil. **Acta Bot. Bras.** v.20 n.3 São Paulo jul./set. 2006

STEWART, S.L. & ZETTLER, L.W. **symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratilis*) from Florida**. *Aquatic Bot.*, 72:25-35, 2002.

TAYLOR, D.L.; BRUNS, T.D.; LEAKE, J.R. & READ, D.J. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. **Ecol. Studies**, 157:375-413, 2002.

VICENTINI, K. R. F. **Análise Palinológica de uma Vereda em Cromínia-GO**. Brasília: UnB, 1993. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade de Brasília, 1993.

VOGEL, S. 1983. Ecophysiology of zoophilic pollination. *In* **Physiological plant ecology III**. (O. L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond & H. Ziegler, eds.). Berlin, p.560-611.

WATSON, L., & DALLWITZ, M. J. 1992 onwards. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 25th November 2008. <http://delta-intkey.com>'.

ZETTLER, L.W. Orchid-fungal symbiosis and its value in conservation. *McIvainea*, 13:40-45, 1997.

ZIMMERMAN, J. K.; AIDE, T. M. Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. **American Journal of Botany**, 1989. 76: 67-73.

3 ASPECTOS FENOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DE *Cyrtopodium vernum* Rchb.f. & Warm.

RESUMO

Cyrtopodium vernum é uma orquídea terrestre comumente encontrada em ambientes de Cerrado, principalmente na fitofisionomia de Cerrado Rupestre. Devido à beleza de suas flores e aspecto rústico, representa importante recurso vegetal a ser utilizado para fins ornamentais. Entretanto, para que este recurso possa ser devidamente utilizado e valorizado, informações básicas sobre esta espécie precisam ser obtidas. Com o intuito de promover estratégias de conservação e melhoramento, o presente trabalho teve por objetivo apresentar os aspectos da fenologia e da morfologia de *C. vernum*. Entre setembro de 2007 e agosto de 2008, foram realizadas visitas mensais para acompanhamento da fenologia e biologia floral de 63 plantas, distribuídas em quatro sub-populações, localizadas na Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo, um remanescente florestal de 500 ha do bioma Cerrado, localizada na Serra Dourada, município de Mossâmedes, GO. A vegetação predominante na área em estudo é do tipo Cerrado Rupestre, onde *C. vernum* foi encontrada crescendo a pleno sol e em solos secos, ácidos e com baixa fertilidade. No mês de setembro de 2007, com o início do período das chuvas, e logo após a queimada da área de estudo, foi verificada uma intensa floração o que possibilitou a identificação e marcação de todas as plantas a serem acompanhadas. Após o término da floração e com o aumento da pluviosidade, a partir de outubro de 2007, observou-se o desenvolvimento de novas folhas e brotos de pseudobulbos. O desenvolvimento destes novos pseudobulbos, com o crescimento constante de novas folhas e o acúmulo de nutrientes, teve duração de aproximadamente seis meses, até março de 2008. A partir de abril de 2008, com o início do período seco, as folhas começaram a secar. A expectativa para o reinício de um novo ciclo de florescimento com o aumento nos índices pluviométricos no mês de setembro de 2008 não se confirmou. Não houve florescimento em nenhuma das plantas de *C. vernum* estudadas, e todas iniciaram um novo ciclo de desenvolvimento de novos pseudobulbos, indicando a importância do fogo na fenologia desta espécie.

Palavras-chave: orquídea, Cerrado, fogo, floração.

ABSTRACT

PHENOLOGIC AND MORPHOLOGIC ASPECTS OF *Cyrtopodium vernum* Rchb. f. & Warm (ORCHIDACEAE: CYRTOPODIINAE)

Cyrtopodium vernum is a terrestrial orchid found usually in the Cerrado Rupestre environments. Because of the beauty of its flowers and rustic aspect, it represents an important vegetal resource to be used for ornamental ends. However, such resource can duly be used and be valued, basic information on this species need to be gotten. With intention to promote strategies of conservation and improvement, the present study had for objective to present aspects of the fenology and the morphology of *C. vernum*. In the period of September/2007 and August/2008, monthly visits for accompaniment of the fenology and floral biology of 63 plants, distributed in four subpopulations, located at the Biological Reserve Prof. Jose Ângelo Rizzo, a forest remainder of 500 ha of bioma Cerrado, whose predominant vegetation is of the type Cerrado Rupestre, located in the Serra Dourada, city of Mossâmedes-GO. The predominant vegetation in the area in study is of the Cerrado Rupestre, where *C. vernum* was found growing in the full sun and in dry ground, acid and with low fertility. In the month of September/2007, with the beginning of the rain season, and soon after ticket of the fire for the study area, an intense budding was verified what it made possible the identification and marking of all the plants to be studied. After the ending of the budding and with the increase of the rainfall, mainly from the month of October/2007, observed the development of new leves and sprouts of pseudobulbs. The development of these new pseudobulbs, with the constant new leaf growth, *C. vernum* accumulate nutrients in next the six months: from October/2007 through March/2008. From the month of April/2008, with the beginning of the dry season, the leves had started to dry. The expectation for the restart of a new cycle of bloom with the increase in the rain indices in the month of September/2008 was not confirmed. *C. vernum* did not have bloom in none of the plants marked, and all had initiated a new cycle of development of new psedobulbs, having indicated the complexity of the fenology of this species are the preponderant paper of the fire in the induction of the budding.

Key words: orchid, Cerrado, fire, flowering.

3.1 INTRODUÇÃO

Segundo Menezes (2000), o gênero *Cyrtopodium* foi descrito primeiramente por Robert Brown em novembro de 1813. O gênero se distribui desde a Flórida até a Argentina, com maior concentração na região Centro-Oeste do Brasil, ocorrendo em áreas campestres secas e úmidas. É uma espécie terrestre, apresenta flores atrativas e vistosas de cor amarela áurea (Figura 2.8 A). Apresenta pseudobulbos fusiformes, entre 10 cm a 15 cm de altura de onde surgem folhas coreáceas. Inflorescência paniculada que pode atingir até 1 m de altura. Flores perfumadas com pouco mais de 3 cm de diâmetro. Região apical das sépalas e pétalas salpicadas com traços e pontos marrom avermelhados. Floresce durante a primavera, no início de outubro, com o início das chuvas, época em que ocorrem os últimos incêndios na região de seu habitat, que são os Campos Rupestres (lato sensu), Cerrado (lato sensu) e Campo Sujo Seco (Sano, et. al. 2008), e de suas flores, surgem os frutos (Figura 2.8 B). Apresentam duas políneas globosas e ceróides. Tem potencial ornamental pela beleza de suas flores e número destas em suas inflorescências, podendo ser utilizadas em arranjos, como flores de corte ou mesmo para vasos. Na sua fase vegetativa podem ser utilizada em jardins, pois seus pseudobulbos, ainda que sem folhas tem potencial ornamental devido a sua estrutura e coloração verde com estrias marrons (Silva, 1994).

Segundo Carvalho (1997), os desmatamentos para expansão da fronteira agrícola, os incêndios naturais ou provocados, ocorrentes principalmente no período seco do ano, além dos extrativismo ilegal realizado para comercialização ou para coleções de amadores e profissionais são alguns dos principais motivos que levam muitas orquídeas nativas a desaparecerem. Neste contexto, o fogo tem papel importante no ciclo vital das orquídeas, podendo alterar a época ou mesmo a intensidade da floração (Menezes, 2000). Segundo Huggins (1991), citado por Menezes (2000), plantas do gênero *Cyrtopodium* foram encontradas floridas somente em áreas queimadas. Entretanto, sob certas condições, espécies de *Cyrtopodium* tiveram seus brotos e suas florações completamente destruídas devido à queima das suas hastes florais, sendo a espécie *Cyrtopodium eugenii* a mais afetada, por ter sua floração coincidindo com as primeiras queimadas no Cerrado.

C. vernum Rchb. f. & Warm é uma espécie terrestre, cuja floração ocorre no início do período chuvoso, época subsequente às queimadas no Cerrado (Menezes, 2000). A intensificação deste fenômeno tem feito com que diversas espécies tenham suas

reproduções naturais por sementes e seus processos fenológicos completamente ameaçados, dado que os incêndios têm ocorrido com frequência superior à capacidade dos vegetais de se adaptarem à estas condições (Shimizu, 2007). É necessário ainda considerar que a intensa degradação e substituição das áreas nativas do Cerrado pelas atividades agropastoris dificultam, ou em alguns casos impossibilitam, os estudos sobre diversas espécies ocorrentes nesta região, sobretudo em relação às orquídeas. Desta forma, o presente trabalho objetivou apresentar aspectos da fenologia e da morfologia floral de plantas de *C. vernum*. Este trabalho é necessário para descrição do comportamento desta espécie em seu habitat natural possibilitando estudos futuros com mais detalhes sobre sua distribuição, conservação, determinação do sistema reprodutivo, melhoramento para uso comercial e em programas de reintrodução da espécie em seu ambiente natural.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram realizados na Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo, um remanescente florestal de 500 ha do bioma Cerrado, cuja vegetação predominante é do tipo Cerrado Rupestre e que está localizada na Serra Dourada, município de Mossâmedes – GO (S 16 04 36.4, W 50 11 16.9, 1006 m de altitude) (Figura 3.1). O clima é caracterizado por duas estações bem definidas, sendo a estação de chuvas ocorrente entre os meses de setembro e março, e a estação seca entre abril e agosto.

Os dados referentes às médias de temperaturas do ar e pluviosidade, entre os meses de setembro de 2007 e agosto de 2008, época em que se desenvolveu o estudo, foram obtidos da Estação Meteorológica de Itaberaí, localizada a 52,4 km de Mossâmedes. Esses dados foram gentilmente disponibilizados pelo Sistema de Meteorologia e Recursos Hídricos do Estado de Goiás (SIMEGO), vinculado à Secretaria Estadual de Ciência e Tecnologia (SECTEC) do Governo de Goiás.

Foi realizada visita prévia para reconhecimento do local e plantas de *C. vernum* foram encontradas floridas. As sub-populações foram delimitadas e todas as plantas presentes nestas, foram marcadas com hastes de metal de um metro de altura e etiquetas plásticas foram afixadas nas suas extremidades e numeradas, resultando num total de 63 plantas, distribuídas nas quatro sub-populações, distantes cerca de 400 metros uma da outra. Cada sub-população possuía aproximadamente 100 m² com a seguinte distribuição:

16 plantas na sub-população 1, 12 plantas na sub-população 2, 20 plantas na sub-população 3 e 15 plantas na sub-população 4.



Figura 3.1. Vista de parte da Serra Dourada indicando no detalhe o caminho até a Reserva Biológica (A). Área da Reserva Biológica, com plantas de *C. vernum* floridas (B) (Foto – Fábio José Gonçalves).

No Herbário da Universidade Federal de Goiás (HERBUFG), em Goiânia, estão depositadas exsicatas constituídas de plantas inteiras, sob número 40464, com as seguintes especificações: Orchidaceae, *Cyrtopodium vernum* (Rchb. f. & Warm), Goiás, município de Mossâmedes, Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo, Serra Dourada.

3.2.1 Fenologia

Para acompanhamento da fenologia foram realizadas avaliações mensais entre setembro de 2007 e agosto de 2008, com observações geralmente das 9:00h até às 17:00h, totalizando, ao final do estudo, 160 horas. Foram coletados dados referentes ao número e altura dos pseudobulbos, existência de brotos nos pseudobulbos e número de folhas por pseudobulbo. As características fenológicas foram comparadas aos dados de pluviosidade e temperatura.

De forma complementar, analisou-se as características físicas e químicas do solo, a análise do solo foi realizada pelo Laboratório de Análise de Solo e Foliar da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás. Em cada unidade amostral, obteve-se uma amostra composta, proveniente da mistura de 10 sub-amostras, tendo cada sub-amostra sido retirada entre 5-20 cm de profundidade no solo onde ocorriam a presença das orquídeas.

3.2.2 Morfologia floral

As observações sobre a biologia floral foram realizadas no período de Setembro e Outubro de 2007, período em que as plantas foram encontradas floridas, logo após a ocorrência de queimada na Reserva Biológica. Para medidas, descrição e ilustração da morfologia floral, 20 flores frescas foram coletadas durante setembro de 2007, armazenadas em sacos plásticos e lacrados para o transporte. Duas plantas de *C. vernum* coletadas na Reserva Biológica Dr. José Ângelo Rizzo e mantidas na Coleção de Orquídeas do Cerrado na Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, também foram utilizadas para a verificação de detalhes morfológicos.

3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 – Aspectos morfológicos

C. vernum é uma orquídea de hábito terrestre que apresenta pseudobulbos completamente expostos, pequenos, podendo chegar a 18 cm de altura, oblongos e encurvados, desprovidos de folhas a partir do primeiro ano do seu surgimento (Figura 3.2). Apresenta raízes numerosas, esbranquiçadas e com velame espesso (Figura 3.2). As folhas possuem bainhas partindo ao longo do pseudobulbo, bem desenvolvidas, com aproximadamente 75 cm de comprimento quando bem desenvolvidas, coriáceas, lanceoladas e paralelinérveas. A inflorescência é lateral, partindo da base do pseudobulbo, ereta, racemosa, podendo alcançar 45 cm de comprimento, marrom-claro a marrom-escuro; ovário e pedicelo com 2,5 cm - 4 cm de comprimento, verdes, uma bráctea oblongo-lanceolada, amarela com pintas marrons. Apresenta flores pequenas. Sépala oblongo-lanceolada a ligeiramente lanceolado-ovadas, com ápice apiculado, amarelas freqüentemente com pintas marrom escuro; sépala dorsal de 1,2 cm x 2,0 cm; sépala laterais ligeiramente oblíquas, de 1,2 cm x 2,0 cm. Pétala largo-elíptica a largo-lanceolada, ápice mucronado, discretamente apiculado, de 1,3 cm x 2,1 cm, amarelas com pequenas pintas marrons. Labelo lobulado, de 1,5 cm x 1,5 cm comprimento, amarelado com laterais amarronzadas; lobos laterais eretos, paralelos, oblongo-falcados, ápice obtuso,

vermelho-amarronzado; calo verrucoso, ligeiramente sulcado, disposto da base do lobo central ao pé da coluna, branco, ocasionalmente branco-amarelado; coluna ereta, discretamente arqueada, com 1,0 cm de comprimento, verde. Antera com 2 mm de comprimento, 1,5 mm largura, amarelada; duas políneas, cerosas, sulcadas, 1 mm comprimento, 0,5 mm largura, amarelas. Fruto verde, oblongo a alongado, sulcado, 4 x 6 cm, incluindo o pedicelo (Figura 3.2).

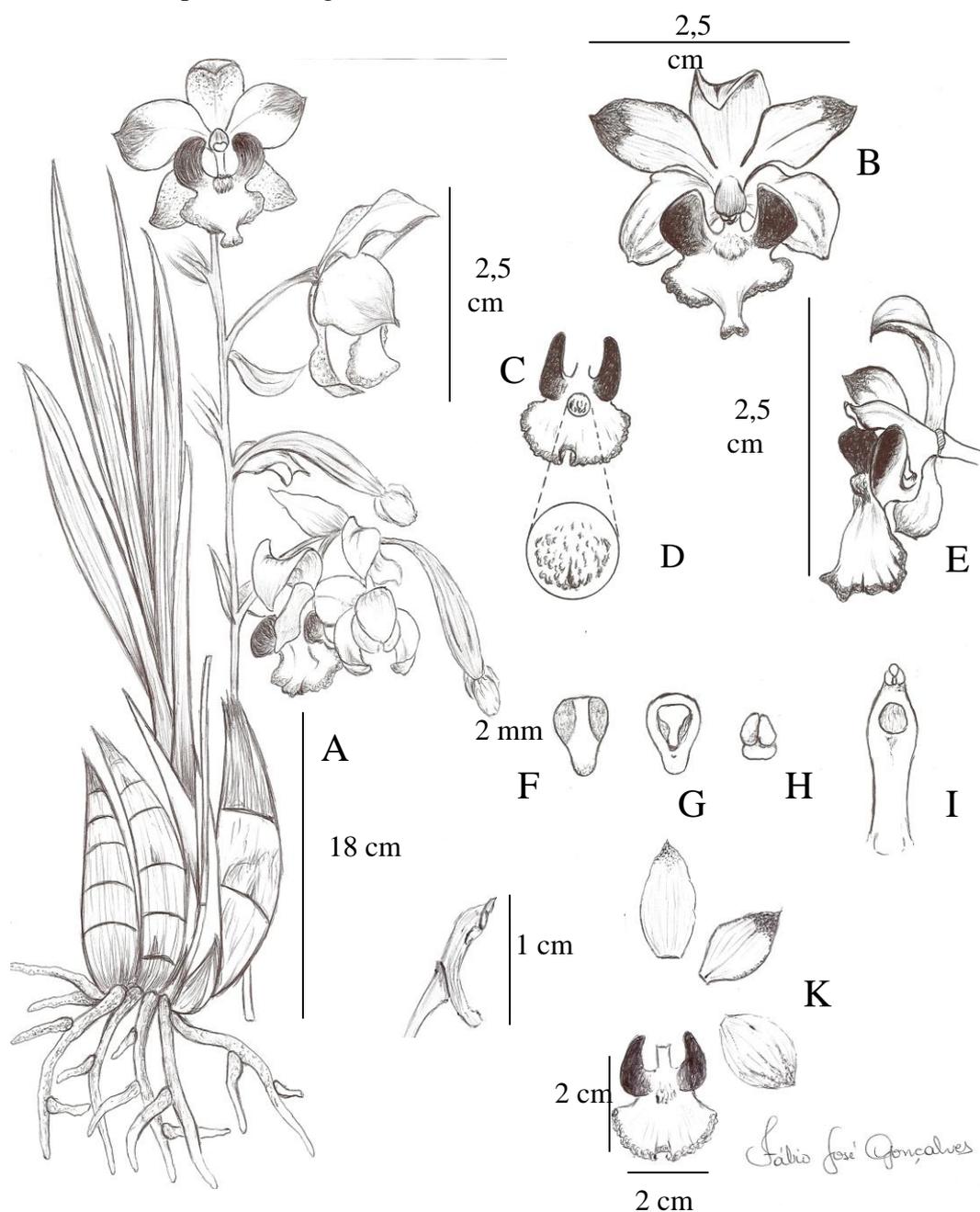


Figura 3.2. *Cyrtopodium vernum*: Hábito. Haste floral aumentada mostrando detalhes da inflorescência (A); Flor, vista frontal (B); Labelo (C); Detalhe do calo aumentado (D); Flor, vista lateral (E); Antera, vista dorsal (F); Antera, vista ventral (G); Polínias (H); Coluna, vista ventral (I); Coluna, vista lateral (J); Análise floral (K).

3.3.2 Aspectos ambientais

De acordo com as análises físicas e químicas (Anexo A), os solos das quatro áreas é ácido, com pH variando entre 4,0 e 4,2, texturalmente arenoso, com teores de argila e silte abaixo de 23% e 19% respectivamente, indicando que *C. vernum* cresce em solos altamente lixiviáveis, ou seja, com baixa retenção de água e nutrientes, característicos de Campos Rupestres do Cerrado. De acordo com o Sistema de Classificação de Solos da Embrapa (Embrapa, 1999), este solo é do tipo Neossolo Litolítico, o qual representa 0,15 % dos tipos de solos encontrados em Goiás e 7,49 % dos tipos de solos do Cerrado, estando associados aos Cambissolos rasos plínticos ou concrecionários. São solos sem aptidão agrícola, devendo ser mantidos com vegetação natural (Carvalho & Amabile, 2006). Não se tem conhecimento de estudos que relacionam espécies de *Cyrtopodium* aos solos do Cerrado.

Os conteúdos de ferro, alumínio e a saturação por alumínio apresentaram-se, nas quatro sub-populações, acima dos níveis críticos para a maioria das culturas cultivadas, de acordo com a Comissão de Fertilidade de Solos de Goiás (1988). Para Sano et al. (2008), a fertilidade do solo é inferida pela saturação por bases, capacidade de troca catiônica, saturação por alumínio e pH. De acordo com essas características, o solo das áreas em estudo pode ser considerado álico, como característico da maioria das fitofisionomias do Cerrado, uma vez que a saturação por alumínio foi superior a 50 %, indicando assim baixa fertilidade e alto teor de alumínio.

Os dados meteorológicos da região em estudo indicam pouca variação na amplitude térmica média anual. A temperatura média anual variou entre $21,1^{\circ}\text{C} \pm 27,4^{\circ}\text{C}$ e as temperaturas máximas e mínimas apresentaram maiores variações entre os meses de abril e julho (Figura 3.3 A), coincidindo com a época de menores precipitações. A precipitação pluvial anual mostrou similaridade com a estação chuvosa na região em estudo, concentra-se entre setembro e março, época em que as temperaturas são mais elevadas (Figura 3.3 B).

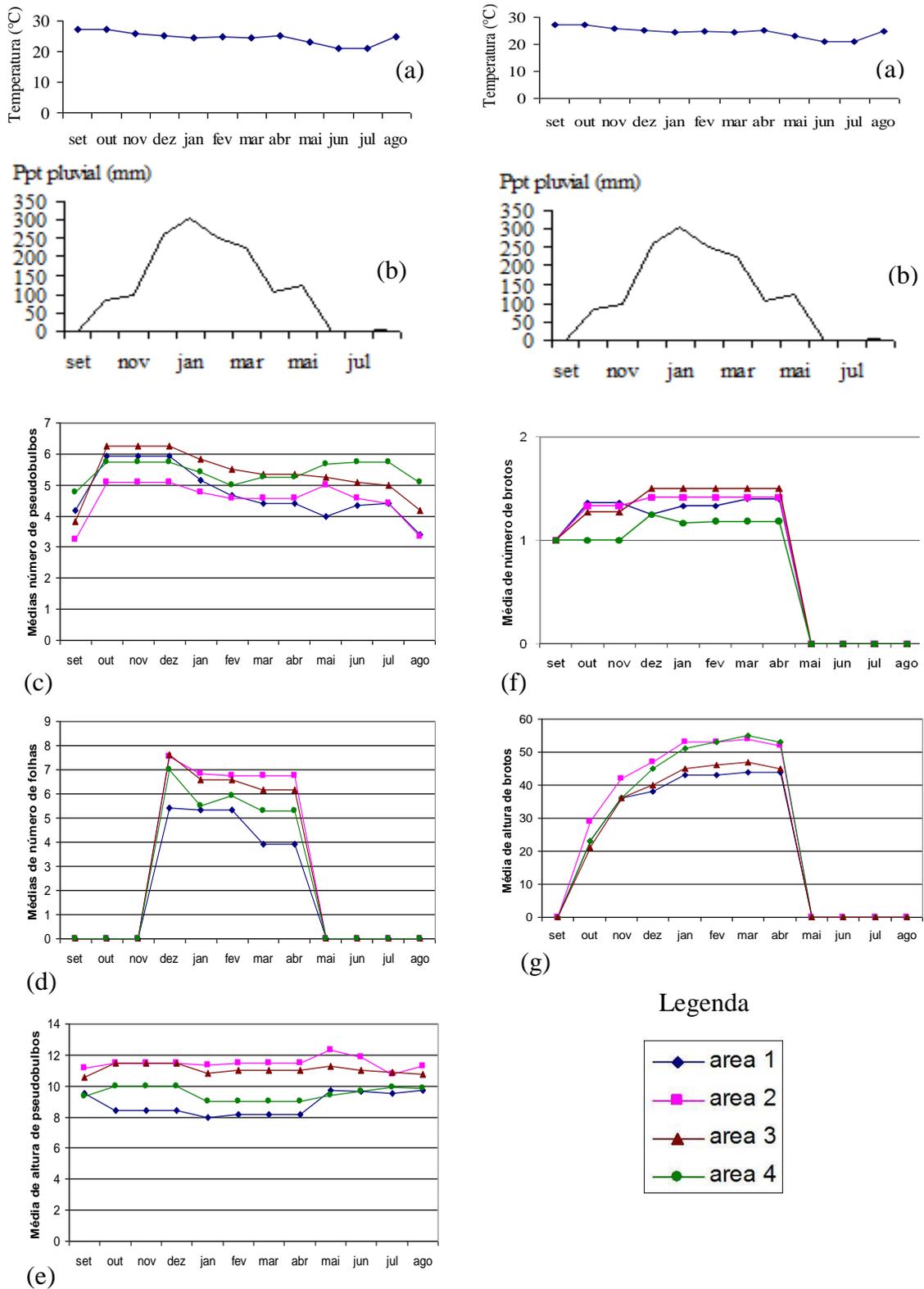


Figura 3.3. Aspectos climáticos e comportamento de *C. vernum* em quatro populações naturais ao longo de um ano de avaliação. a) médias térmicas mensais; b) estimativas de precipitações pluviiais; c) média de número de pseudobulbos; d) médias de número de folhas; e) média de altura de pseudobulbos, f) média de número de brotos, g) média de altura de brotos.

3.3.3 Aspectos Fenológicos

Em setembro as plantas começaram a emitir novas brotações que deram origem a novos pseudobulbos (Figura 3.3 f). Foram considerados brotos, os pseudobulbos jovens, do momento da sua emissão até a abscisão da última folha. As plantas emitiram folhas até o final do mês de novembro e permaneceram com elas até o mês de abril. Em maio, perderam suas folhas quando seus pseudobulbos já estavam bem desenvolvidos (Figura 3.3 E). Em relação ao número de pseudobulbos, esse número foi reduzido no período chuvoso, que coincidiu com o surgimento de novos brotos, devido a translocação de nutrientes dos pseudobulbos mais velhos para os mais jovens. Entre janeiro e abril o número de pseudobulbos foi diminuído em três das populações estudadas (Figura 3.3 C) comparando-se com a figura 3.3 D, onde observou-se um aumento no número de brotações. No mesmo período, observou-se que a altura dos brotos aumentou até abril (Figura 3.3 G), momento em que as folhas caíram (Figura 3.3 D) e a planta apresentou apenas pseudobulbos sem folhas.

Plantas floridas foram encontradas em setembro e outubro de 2007, logo após a ocorrência de queimada acidental na Reserva Biológica (Figura 3.4). No mesmo período em 2008 as plantas não emitiram flores e também não houve queimada na área, o que sugere que o fogo é um fator importante para a floração desta espécie.

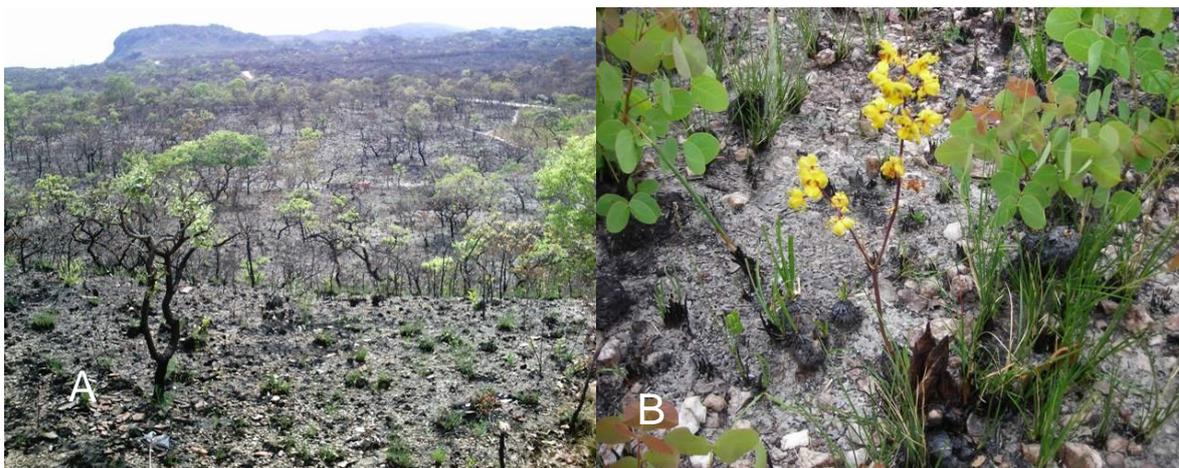


Figura 3.4. Vista da reserva ecológica após a passagem do fogo (A). *C. vernum* em habitat natural com flores após a passagem do fogo (B) (Foto – Fábio José Gonçalves).

Entre os efeitos adversos de queimadas no Cerrado para a flora lenhosa, já foram constatados a diminuição da densidade arbórea, além da diminuição da diversidade de espécies (Sambuichi, 1991). Medeiros (2002) verificou elevadas taxas de mortalidade em

Campo Sujo e Cerrado *sensu stricto* após as queimadas. Em Cerradão, o fogo pode eliminar muitos indivíduos, tornando este tipo de formação mais rala em termos de elementos lenhosos (Souza & Soares, 1983). Também já foram verificados impactos negativos sobre a reprodução sexual de plantas nativas através da destruição de estruturas reprodutivas (Hoffmann, 1998). Porém, segundo Coutinho (1990), a maioria das espécies lenhosas do Cerrado apresenta rebrotações nos caules depois da ocorrência das queimadas e muitas rebrotam a partir das raízes ou da parte basal de seus troncos.

A importância do fogo no desenvolvimento de orquídeas terrestres tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores no mundo. De acordo com Schelpe (1970) em trabalho realizado na África do Sul, orquídeas permaneceram ilesas após incêndios naturais, e, algumas espécies floresceram com mais intensidade após a passagem do fogo, enquanto outras apenas floresceram se previamente queimadas. Segundo Stoutamire (1974), o fogo também induz a floração de algumas espécies de orquídeas na Austrália. O fenômeno é conhecido não apenas em relação às orquídeas, mas também em um grande número de espécies de plantas carnívoras, como *Darlingtonia*, *Dionaea*, *Drosera* e *Sarracenia*, bem como para espécies de outras famílias. Segundo Kricher (1989), o fogo é essencial, porque fertiliza o solo pobre de regiões como o Cerrado, liberando os nutrientes da cobertura vegetal que as plantas necessitam para florescer. Trabalho realizado por Huggins (1991) indicou que espécies de *Cyrtopodium* são encontradas apenas em áreas que sofrem incêndios espontâneos e explica essa situação com o fato do fogo queimar a vegetação dominante formada por gramíneas que cresce ao redor dessas espécies, sufocando-as e impedindo que floresçam. Oliveira et al. (1996) observaram 44 espécies de orquídeas terrestres florescendo depois de queimadas em áreas de Cerrado no Distrito Federal, com algumas florescendo em até duas semanas após a passagem do fogo.

Outra espécie de orquídea foi encontrada florida na Reserva Biológica após a passagem do fogo. Trata-se de um *Cyrtopodium gonzalezii* (Figura 3.5), orquídea de pseudobulbos subterrâneos que dificilmente seria encontrada no local onde vegetam, uma vez que o estrato herbáceo é composto principalmente por gramíneas. Outras espécies de plantas foram encontradas com flor na região logo após a queimada, *Calea microphylla*, *Camarea ericoides*, *Trimezia juncifolia*, *Mandevilla ullustris*, *Ipomoea procumbens*, *Anemopaegma arvense* (Vell.) Steff. ex de Souza. Este fato pode ser um indicativo de que a presença do fogo no Cerrado seja um fator importante para o florescimento de algumas espécies e, conseqüentemente, na sua reprodução. Contudo, são necessários estudos mais

aprofundados no que diz respeito à ação do fogo para estas plantas. Com relação à floração de *C. vernum*, o trabalho de observação de suas fases fenológicas continua. Apenas o acúmulo de dados a longo prazo poderá revelar a real importância do fogo para a indução do seu florescimento.



Figura 3.5. *Cyrtopodium gonzalezii* em habitat natural (A), detalhe da flor (B) (Foto – Fábio José Gonçalves).

3.4 CONCLUSÕES

- *Cyrtopodium vernum* possui hábito terrestre e vegeta a pleno sol em solos arenosos, ácidos, com altas concentrações de alumínio e baixa retenção de água e nutrientes.
- Os pseudobulbos se desenvolvem durante a época chuvosa, entre os meses de novembro e abril, quando também há a formação de folhas.
- *C. vernum* floresce no início do período chuvoso, a partir do mês de setembro e pode ter a ocorrência do fogo como importante fator para indução de seu florescimento.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA J.A.N., BIANCHETTI L.B., MIRANDA Z.J.G. 2006. A revision of *Habenaria* section *Macroceratitae* (Orchidaceae) in Brazil. **Brittonia** 58: 10-41.

CARVALHO, V. L. de. Bromélias na serra. **Bromélia**. Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p. 10-11, 1997.

CÉSAR, H.L.,. **Efeitos da queima e corte sobre a vegetação de um Campo Sujo na Fazenda Água Limpa, Brasília – DF**. 59p (Dissertação de Mestrado) – UNB, Brasília, 1980.

COUTINHO, L. M. **Contribuição ao conhecimento do papel ecológico das queimadas na floração de espécies do cerrado**. 1976. 123 f. Tese (Livre Docência) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1976

FROST, P. G. H. The responses of savanna organisms to fire. In: TOTHILL, J. C.; MOTT, J. J. (Ed.). **Ecology and Management of the World's Savannas**. Canberra: Australian Academy of Science, 1985. p. 232-237.

MENEZES, L. C. **Genus *Cyrtopodium* Espécies Brasileiras**. Brasília: IBAMA, 2000.

OLIVEIRA, R. S.; BATISTA, J. A. N.; PROENÇA, C. E. B.; BIANCHETTI, L. Efeito do fogo na floração de espécies de Orchidaceae em Cerrado. In: MIRANDA, H. S.; DIAS, B. F. S.; SAITO, C. H (Eds.) **Impacto de queimadas em área de cerrado e restinga**. Brasília: Universidade de Brasília: Brasília, 1996. p. 61-67.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; S. BRIDGEWATER. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Ann. Bot.** 80: 1997. 223-230.

SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: Ecologia e Flora**. vol 2 Brasília. Embrapa. 2008.

SILVA, W. **Cultivo de orquídeas no Brasil**. 6 ed. São Paulo: Nobel, 1994.

WATSON, L. & DALLWITZ, M.J. 1992. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 25th November 2008.

4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM *Cyrtopodium vernum* Rchb. f. & Warm e *Cyrtopodium eugenii* Rchb. f.

RESUMO

Pelo menos 80% das plantas vasculares formam associações mutualísticas entre a parte radicular e determinados tipos de fungos, denominadas micorrizas. A presença de micorrizas aumenta a absorção de água e nutrientes do solo pela planta. Na natureza, as orquídeas também apresentam associação simbiótica com fungos micorrízicos. Além de proporcionarem melhor desenvolvimento das plantas, os fungos micorrízicos são essenciais para o processo de germinação em orquídeas. Por apresentarem sementes muito pequenas, com pouca reserva nutricional, essas devem ser colonizadas pelo fungo simbionte, para que ocorra a germinação. Além disso, orquídeas cultivadas por meio do cultivo assimbiótico, apresentam uma taxa de sobrevivência relativamente baixa, quando transferidas para seu habitat natural, justificando estudos sobre a germinação simbiótica de sementes. Em agosto de 2008 foram coletadas raízes de duas espécies de orquídeas, *Cyrtopodium vernum* e *Cyrtopodium eugenii* localizadas na Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo, um remanescente florestal de 500 ha do bioma Cerrado na Serra Dourada, município de Mossâmedes, GO. A vegetação predominante na área em estudo é do tipo Campo Rupestre, onde estas espécies foram encontradas crescendo em solos secos, ácidos e com baixa fertilidade. A partir destas raízes, foram isoladas 18 colônias de fungos sendo que apenas uma colônia apresentava as características determinantes para um fungo micorrízico. Esta colônia foi identificada como pertencente ao gênero *Epulorhiza*, um basidiomiceto encontrado com frequência em associação com orquídeas terrestres e rupícolas. Também foram feitos cortes histológicos das raízes que permitiram verificar a presença de massas de hifas do fungo, denominadas *pelotons*, dentro das células do córtex das raízes e o padrão de colonização do fungo nos tecidos radiculares.

Palavras-chave: micorriza, Cerrado, orquídea, *Epulorhiza*

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MYCORRHIZAE FUNGI OF TWO SPECIES OF TERRESTRIAL ORCHIDS *Cyrtopodium vernum* Rchb. f. & Warm and *Cyrtopodium eugenii* Rchb. f.

At least 80% of the vascular plants form mutualistic associations between the roots and definitive fungi species. Such associations are called mycorrhiza. The presence of mycorrhizas increases the nutrients and water absorption of the ground for the plant. In the nature, the orchids also present simbiotic association with mycorrhizae fungi. Beyond providing better development, mycorrhizae fungi are essential for the orchids germination process. By presenting very small seeds, without reserve of nutrients, orchids seeds must be colonized by simbiotic fungi, so that the germination occurs. Moreover, orchids cultivated by means of the assymbiotic culture, without the mycorrhizae fungi, present a survival plant tax relatively low, when transferred to its natural habitat, justifying studies on the symbiotic germination of seeds. In August of 2008, during the dry season, roots of two species of orchids of the *Cyrtopodium* genera had been collected at the Biological Reserve Prof. Jose Ângelo Rizzo, a forest remainder of 500 ha of bioma Cerrado, located in the Serra Dourada, city of Mossâmedes-GO. The predominant vegetation in the area in study is of is of the type Cerrado Rupestre, where species *C. eugenii* and *C. vernum* had been found growing in dry ground, acid and with low fertility. From these roots, 18 colonies of fungi had been isolated being that only one colony presented the determinative characteristics for one mycorrhizae fungi. This colony was identified as pertaining to the *Epulorhiza* genera, one basidiomycete frequently found in association with terrestrial and lithophyte orchids. Histologic cuts of the roots had been made that had allowed to verify the presence of masses of hyphae, called pelotons, inside of the cells of the root cortex and the colonization process of mycorrhizae fungi in root tissues.

Key words: mycorrhiza, Cerrado, orchids, *Epulorhiza*

4.1 INTRODUÇÃO

As tentativas de multiplicação de mudas de orquídeas em larga escala através da cultura de tecidos tiveram início no começo do século XX; todavia, a maioria dos métodos e meios de cultura relatados estabelece o cultivo assimbiótico das sementes *in vitro*. Segundo Arditti et al. (1990), a germinação de sementes de orquídeas em um meio de cultura asséptico, já vem sendo realizada por floricultores, seguindo procedimentos inicialmente desenvolvidos por Lewis Knudson na década de 1920. Porém, plântulas cultivadas por estes métodos apresentam uma taxa de sobrevivência relativamente baixa, quando transferidas para seu habitat natural, em programas de reintrodução de espécies no campo (Clements et al., 1986), justificando trabalhos com germinação simbiótica de sementes.

Segundo Raven (2001), pelo menos 80% das plantas vasculares formam associações mutualísticas de suas raízes com fungos, denominadas micorrizas. Os principais grupos de micorrizas são as ectomicorrizas, as quais circulam as células da raiz e, as endomicorrizas, que penetram as células da raiz. Nas orquídeas, esses fungos fornecem ao hospedeiro o carbono, advindo do consumo de glicose pelos fungos, como suprimento.

Segundo Clements (1998) desde 1889 há registros na natureza de associação simbiótica de orquídeas com fungos micorrízicos, os quais são principalmente *Basidiomycetes*, com mais de 100 espécies envolvidas.. Por apresentarem sementes muito pequenas, com pouca reserva nutricional, estas devem ser colonizadas pelo fungo simbiote, para que ocorra a germinação na natureza (Rasmussen, 1995; Peterson et al., 1998; Pereira et al., 2003).

Após a colonização, ocorre a formação de uma estrutura intracelular denominada *peloton*, que é uma massa de hifas do fungo dentro das células da semente. Os produtos advindos da digestão enzimática desta estrutura são utilizados pelo embrião para o rompimento do tegumento da semente e, a partir daí, para o surgimento de uma estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, denominada protocormo (Kraus et al., 2006). O protocormo é totalmente dependente de um fungo simbiote para se desenvolver até tornar-se plântula autotrófica, sendo esta atividade denominada micotrofismo (Pereira et al., 2003). O micotrofismo, não é exclusivo da família Orchidaceae, sendo também relatado em outras famílias de Magnoliopsidas e Liliopsidas (Taylor et al., 2002).

A simbiose micorrízica em Orchidaceae tem muito a revelar para a ciência, quando comparada a outros aspectos fundamentais da biologia dessas plantas, a exemplo da sua taxonomia (Rasmunssen, 1995). Registros que descrevem os fungos endofíticos de orquídeas do Novo Mundo são raros, particularmente para táxons epífitos ou rupícolas (Richardson et al., 1993; Richardson & Currah, 1995; Pereira et al., 2003).

Segundo Otero et al. (2004), citados por Linhares (2006), a taxonomia de fungos micorrízicos de orquídeas é dificultada não só pela característica de não produzir conídios na fase assexuada, mas também pela rara observação da fase sexuada em campo. Sendo assim, torna-se importante o conhecimento desses fungos associados ao sistema radicular de espécies terrestres, como é o caso de *Cyrtopodium eugenii* e *Cyrtopodium vernum*, tanto para seu uso em programas de propagação simbiótica, como para a conservação, manejo e reintrodução de orquídeas ou outras espécies que se desenvolvem associadas à fungos. Uma das alternativas para propagação de orquídeas é por meio da multiplicação *in vitro*, utilizando germinação simbiótica com fungos micorrízicos isolados das raízes de plantas adultas (Warcup, 1981).

Estudar e explorar o processo de simbiose entre fungos micorrízicos e as espécies de orquídeas possibilita o início do esclarecimento das etapas que envolvem esta relação, além da utilização deste processo no cultivo comercial de orquídeas. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar fungos micorrízicos associados a raízes de duas espécies de orquídeas terrestres, *C. vernum* e *C. eugenii*, visando o melhor desenvolvimento de protocormos na propagação *in vitro* destas espécies.

4.2 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia, GO e no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão localizada em Santo Antônio de Goiás, GO. O material vegetal utilizado foi coletado na Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo, localizada na Serra Dourada, município de Mossâmedes, GO (S 16 04 36.4, W 50 11 16.9, 1006 m de altitude).

4.2.1 - Isolamento de fungos

Foi utilizado o protocolo descrito por Pereira et al. (2003) para o isolamento dos fungos. Cinco raízes de *C. eugenii* e outras cinco raízes de *C. vernum* foram lavadas em água corrente por 10 min, cortadas em fragmentos de 2cm a 3 cm de comprimento e desinfestadas superficialmente, por imersão em etanol 70% (70 mL etanol + 30 mL de água destilada) durante 1 min., e 5 min. em solução de hipoclorito de sódio comercial 2% diluído numa proporção de 1:10, seguindo-se de cinco lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. O velame foi retirado com bisturi estéril e as raízes foram maceradas em almofariz de porcelana, previamente autoclavado. O macerado foi espalhado superficialmente em placa de Petri contendo 10 mL de meio batata-dextrose-ágar (BDA) para promover o crescimento de micélios fúngicos (Nogueira et al. 2005). As placas foram incubadas por 3 dias a 28° C e observadas diariamente sob microscópio óptico para o isolamento do micélio crescido a partir do *peloton*. Espécies fúngicas que cresceram no meio de cultura BDA foram isoladas e transferidas para meio de cultura Melin-Norkran's modificado (MNM - Marx, 1969).

4.2.2 Caracterização morfológica do isolado micorrízico

Para a caracterização das colônias micorrízicas, observou-se o crescimento de cada isolamento em meio BDA, a 25°C, descrevendo-se a coloração, o aspecto micelial da colônia, a presença do micélio aéreo e presença de borda. Também mediu-se o diâmetro das hifas vegetativas.

Para estimar a taxa diária de crescimento das colônias em meio FA (Fubá-ágar) e BDA, discos de micélio de 9 mm de diâmetro foram retirados das bordas das colônias dos isolados, previamente mantidos em meio BDA, e transferidos para o centro de placas contendo 20 mL dos respectivos meios. As placas foram mantidas incubadas a 25°C ± 2°C, por sete dias. O diâmetro da colônia nos dois meios foi medido diariamente, durante oito dias, sendo que para cada meio foram feitas cinco repetições.

4.2.3 Cortes histológicos

Os *pelotons* foram identificados no tecido vegetal através de cortes histológicos transversais e longitudinais das raízes de *C. eugenii* e *C. vernum*. Inicialmente, as raízes foram fixadas em FAA₅₀ (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 50 % 5:5:90 v/v), por

dois dias e, em seguida, transferidas para álcool 70%. Os cortes foram feitos à mão livre e colocados em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 2% por, aproximadamente, 5 min., para clarear. Posteriormente, os cortes foram lavados por oito vezes consecutivas em água destilada, corados com safranina 1% por dois minutos, azul de Astra 0,3% por trinta segundos, e enxaguados uma vez em água destilada. A seguir, o material foi desidratado em série alcoólica, que continha concentrações de 30%, 70%, 90%, 95% e 100% de álcool, 3:1, 1:1, 1:3 de álcool-xilol e xilol puro, pela imersão, durante 10 min., em cada uma das soluções. O material foi montado entre lâmina e lamínula com uma a duas gotas de verniz e observado em microscópio ótico.

4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as 18 colônias de fungos obtidas do macerado das raízes de *C. eugenii* e *C. vernum* e crescidos em meio BDA, oito foram isoladas de *C. eugenii* e dez foram isoladas de *C. vernum*. Como o objetivo era a procura por fungos micorrízicos, a seleção destas colônias ocorreu baseando-se nas características morfológicas para este tipo de fungo descritas por Currah (1986), Moore (1987), Currah et al. (1987; 1989; 1997), Zelmer & Currah (1995) e Linhares (2006). Apenas um único isolado destacou-se como a espécie fúngica que mais se aproximou destas descrições. Assim, esta colônia foi selecionada e mantida em placas de Petri contendo 10 mL de meio BDA para, posteriormente, ser utilizada nos testes de germinação simbiótica. As demais colônias foram armazenadas em meio BDA a 4° C, para futuros trabalhos de identificação.

As colônias das micorrizas associadas às raízes de *C. eugenii* e *C. vernum* apresentaram hifas sem constrição no ponto de ramificação, micélio vegetativo consistido de hifas septadas, com algumas ramificações em ângulo reto, ausência de grampo de conexão e presença de formação de células monilióides (Figura 4.1). Todos os micélios analisados apresentaram coloração castanha, tornando-se acinzentada em poucos dias, colônia grumosa e escassa (Figura 4.2).

A taxa média de crescimento diário das colônias foi mais lenta em meio FA, de 1,3 cm/ dia, comparando com o crescimento no meio BDA, onde a taxa foi de 1,8 cm/ dia.

Tais características demonstram que a micorriza associada às raízes de *C. eugenii* e *C. vernum* pertencem ao gênero *Epulorhiza*, confirmando as observações de que uma maior frequência deste gênero é constatada em espécies terrestres e rupícolas (Currah

& Zelmer, 1992) e, juntamente com o gênero *Ceratorhiza*, são os mais comumente associados a orquídeas nativas dos trópicos (Richardson, 1993; Pereira et al., 2005).

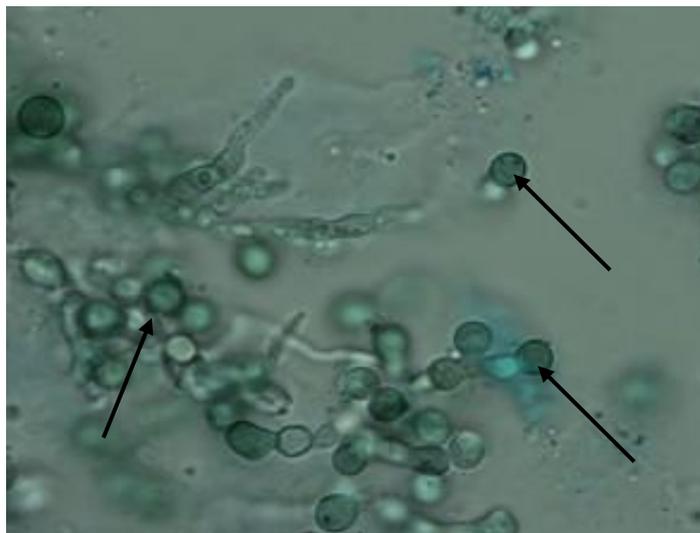


Figura 4.1. Colônia da micorrízica (400x) isolada da raiz de *C. vernum*; as setas indicam células monilióides no micélio (Foto – Fábio José Gonçalves).

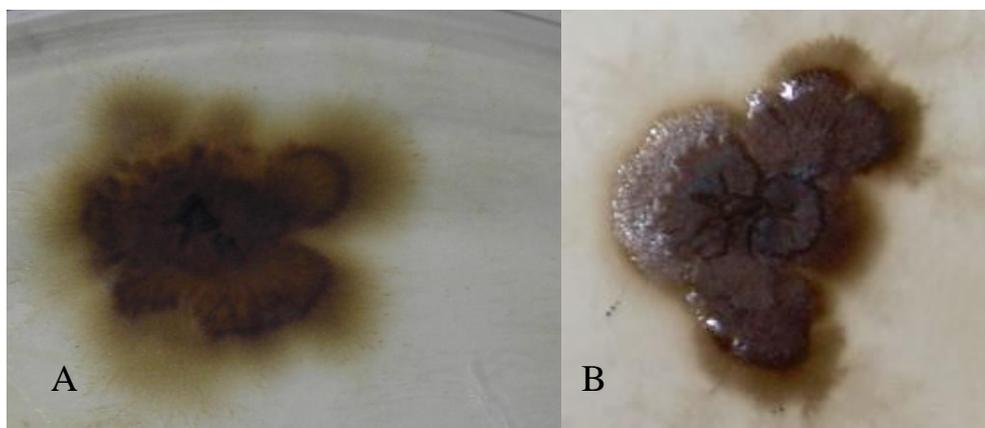


Figura 4.2. Micélio de micorriza isolado de raiz de *Cyrtopodium vernum* (A), e isolado da raiz de *C. eugenii* (B) cultivadas em meio de cultura BDA (Foto – Fábio José Gonçalves).

Observou-se a presença de *pelotons* tanto nos cortes transversais (Figura 4.3 A), como nos longitudinais (Figura 4.3 B), no interior das células do córtex, tanto nas raízes de *C. eugenii*, quanto nas de *C. vernum*, revelando que a micorriza associada a estas espécies constituem uma endomicorriza. Também puderam ser observados cristais de oxalato de cálcio do tipo ráfides (Figura 4.4 A) e células lignificadas no parênquima cortical, nos cortes histológicos (Figura 4.4 B). A presença de ráfides nas células do parênquima cortical da raiz é um fato curioso verificado nestas plantas, uma vez que essas estruturas são comuns em células de folhas, pois têm como função evitar o herbivorismo.

Estas estruturas podem ser confundidas com fungos micorrízicos, se a observação microscópica não for atenciosa e detalhista. Quanto à presença de células lignificadas no parênquima, esta característica pode ser considerada para a descrição anatômica das espécies, evitando possíveis divergências taxonômicas.

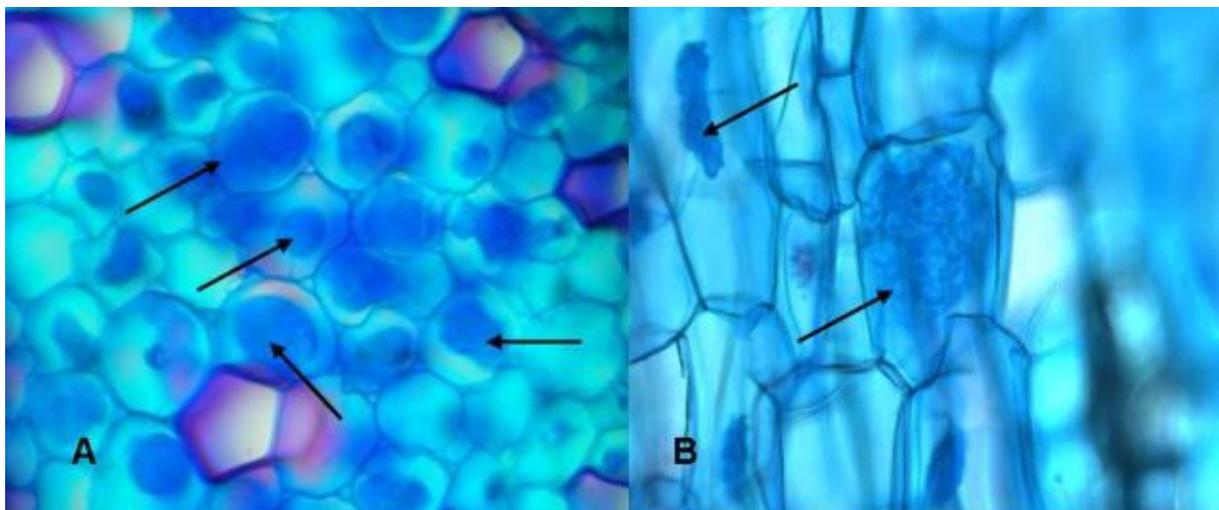


Figura 4.3. (A) *Pelotons* (setas) no interior das células corticais de raiz de *C. vernum* em corte transversal e (B) e *C. eugenii* em corte longitudinal (400x) (Foto – Fábio José Gonçalves).

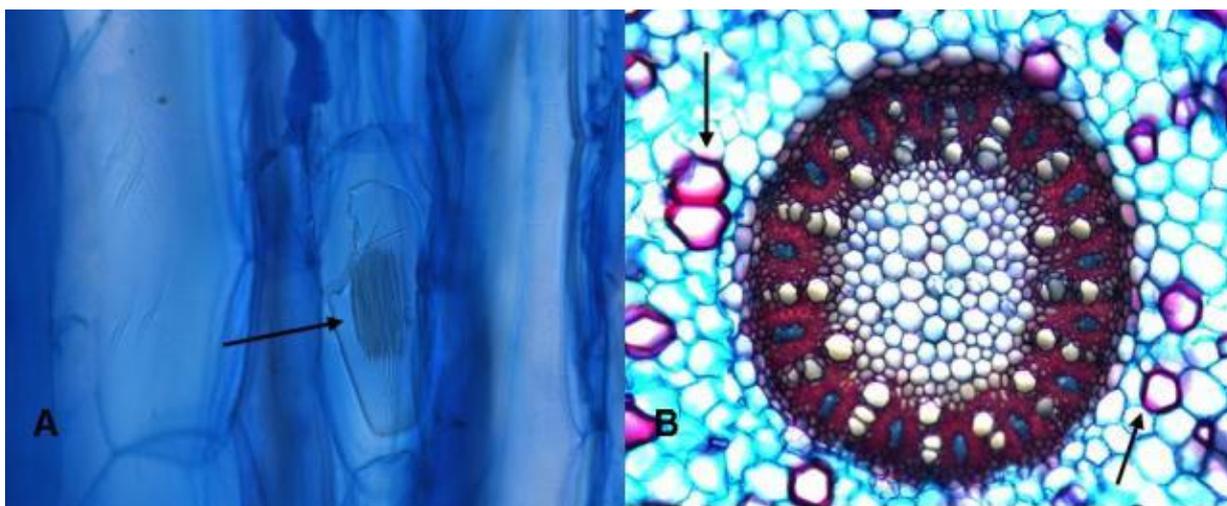


Figura 4.4. (A) Corte longitudinal de raiz de *C. vernum* (400x), (B) corte transversal de raiz de *C. vernum* (100x), as setas indicam, respectivamente, a presença de ráfides e células lignificadas no parênquima cortical das raízes (Foto – Fábio José Gonçalves).

O córtex da raiz mostrou-se colonizado, embora na maior parte dos cortes analisados, os *pelotons* não se apresentaram bem distribuídos, sendo observados pontos de colonização em um mesmo fragmento radicular (Figura 4.5). O estágio de degradação dos *pelotons* tem início com a sua deformação, seguida de uma redução do seu volume e com a

conseqüente formação de uma massa, na qual não é mais possível distinguir as hifas, mas que permanece no interior das células (Figura 4.6). No entanto, de acordo com Uetake (1997) e Rasmussen & Whigham (2002), essa massa de hifas remanescentes pode servir como inóculo para futuras reinfecções, pois os *pelotons*, mesmo depois da degradação e redução do tamanho, permanecem conectados (Figura 4.7).



Figura 4.5. Corte radicular transversal, o círculo indica ponto de colonização de *pelotons*, do lado esquerdo superior (50x) (Foto – Fábio José Gonçalves).

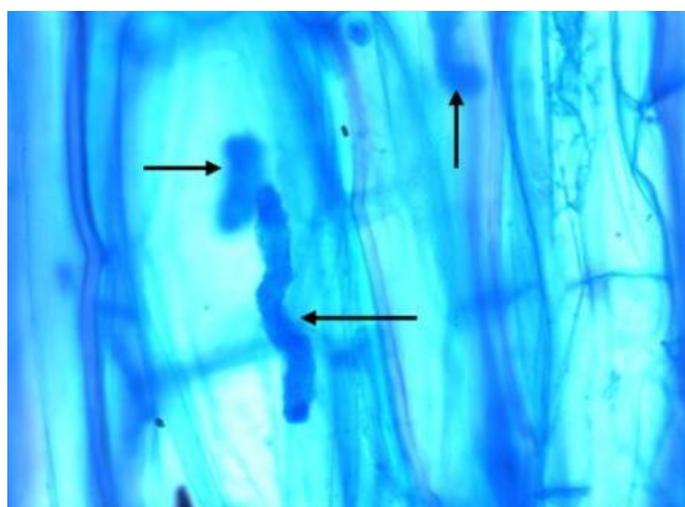


Figura 4.6. Corte longitudinal de raiz de *C. vernum*. As setas indicam *pelotons* degradados no interior das células corticais de raízes (Foto – Fábio José Gonçalves).

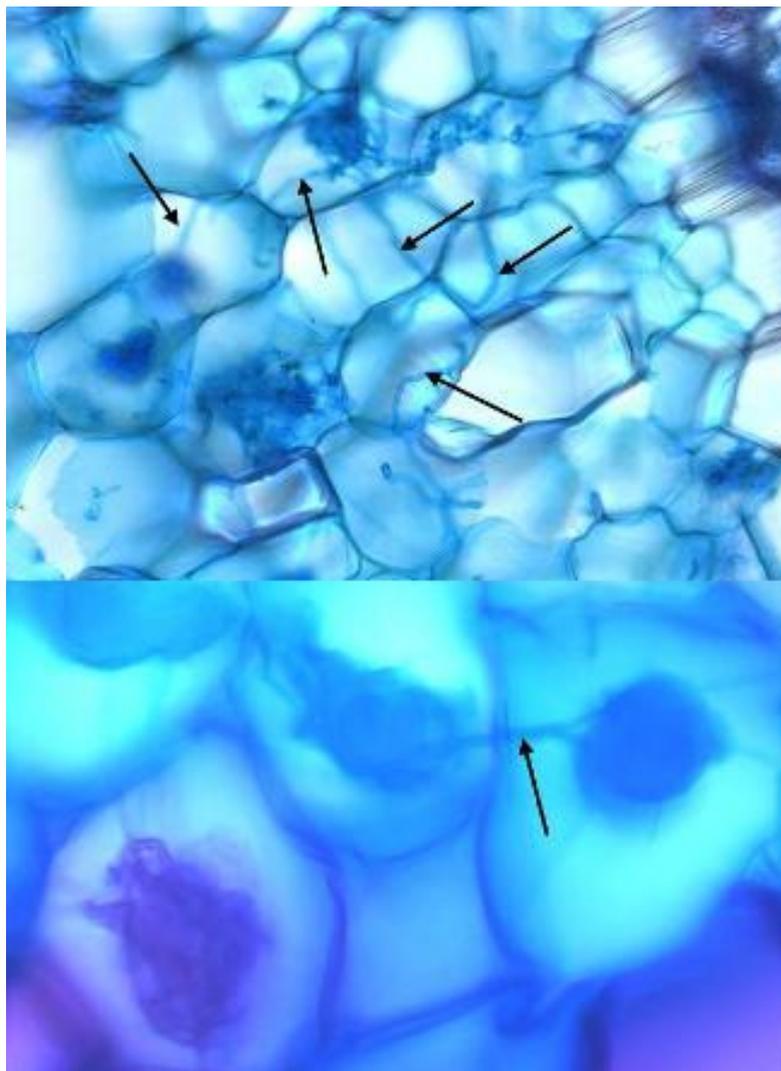


Figura 4.7. *Pelotons*, em degradação conectados entre si. As setas indicam as hifas conectivas entre um *peloton* e outro (Foto – Fábio José Gonçalves).

Um maior número de *pelotons* degradados foi observado quando comparado com o número de *pelotons* intactos. De acordo com Linhares (2006), raízes mais velhas podem apresentar maior quantidade de *pelotons* degradados, intensidade micotrófica mais intensa no período da seca e maior frequência de colonização e atividade micotrófica em espécies crescidas diretamente sobre rochas. Estas afirmações condizem com o fato de ter sido encontrada grande quantidade de *pelotons* degradados nas células corticais das raízes de *C. eugenii* e *C. vernum*. Isto porque o material utilizado para a montagem das lâminas foi coletado no mês de agosto, período de seca no Cerrado, a partir de plantas adultas crescidas diretamente sobre neossolos litolíticos, característicos da Reserva Biológica da Serra Dourada. Dessa forma, o padrão de colonização verificado nas raízes de *C. eugenii* e *C. vernum* difere do mais comumente observado nos cortes de raízes de orquídeas

terrestres de clima temperado a quais, normalmente, revelam sincronismo de *pelotons* degradados e intactos no interior das células corticais (Zelmer et al., 1996).

A confirmação da presença de micorrizas em orquídeas terrestres encontradas em Cerrado Rupestre é uma informação importante para o melhor entendimento tanto deste tipo de associação simbiótica, quanto para o desenvolvimento de estratégias de propagação e conservação destas espécies. Outro campo que se abre para novos estudos é a especificidade desta relação fungo-planta. É difícil avaliar quantas espécies de fungos e novos padrões de associação podem surgir a partir de análises de raízes de outras espécies de orquídeas, não só terrestres, mas também rupícolas, saxícolas e epífitas, que crescem em um ambiente tão diverso e pouco pesquisado como o Cerrado.

4.4 – CONCLUSÕES

- Raízes das espécies *Cyrtopodium eugenii* e *Cyrtopodium vernum* apresentam associações com fungos micorrízicos.
- O fungo micorrízico identificado em ambas as espécies pertence ao gênero *Epulorhiza*.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDITTI, J.; ERNST, R.; YAM, T.W. & GLABE, C. The contributions of orchid mycorrhizae fungi to seed germination: a speculative review. **Lindleyana** 5. 1990. 249-255 p.

CLEMENTS, M. A. Orchid mycorrhizal associations. **Lindleyana**, Florida, v.3, p. 73-86, 1986.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. R. F. P.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.6, n.2, p. 253-258, 2004.

CURRAH, R.S. *Thanatephorus pennatus* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of *Calypso bulbosa* (Orchidaceae) from Alberta. **Canadian Journal of Botany**, St. Louis, v. 65, p. 1957-1960, 1986.

CURRAH, R.S.; SINGLER, L.; HAMBLETON, S. New records and new taxa of fungi from the micorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. **Canadian Journal of Botany**, St. Louis, v. 65, p. 2473-2481, 1987.

CURRAH, R.S.; SMERECIU, E. A.; HAMBLETON, S. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Plantathera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae). **Canadian Journal of Botany**, St. Louis, v. 68, p. 1171-1181, 1989.

CURRAH, R.S.; ZETTLER, L. W; McINNIS, T. M. *Epulorhiza inquilina* sp. nov. from *Plantathera* (Orchidaceae) and a key to *Epulorhiza* species. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 61, p. 338-342, 1997.

KRAUS, J. E.; KERBAUY, G. B.; MONTEIRO, W. R. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. f. in vitro: aspectos estruturais e conceituais. **Hoehnea**, v. 33, n.2, p. 177-184, 2006.

LINHARES, D. O. **Caracterização morfológica de micorrizas de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* nativas do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro**. 2006. 46f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)–Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MARX, D.H. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic and soil bacteria. **Phytopatology** **59**. 1969. 153-163 p.

MOORE, R. T. The genera *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis* and *Rhizoctonia*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 29, p. 91-99, 1987.

NOGUEIRA, R. E.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M; LANNA, M. C. S.; MENDONÇA, M. P. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do quadrilátero ferrífero, MG, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 3, n. 19, p. 417-424, 2005.

PEREIRA, O.L.; ROLLEMBERG, C.L.; BORGES, A.C.; MATSUOKA, K. & KASUYA, M.C.M. *Epulorhiza epiphytica* sp.nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. **Mycoscience** **44**. 2003. 153–155 p.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; ROLLEMBERG, C. L.; CHAER, G. M. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 191-197, 2005.

PETERSON, R. L.; UETAKE, Y & ZELMER, C. Fungal symbiosis with orchid protocorms. **Symbiosis**, 25:29-55, 1998

RASMUSSEN, H. N.; WHIGHAM, D. F. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. **New Phytologist**, Cambridge, v. 154, p. 797-807, 2002.

RASMUSSEN, H.N. **Terrestrial Orchids: From Seed to Mycotrophic Plant**. Cambridge, Cambridge University Press. 1995.

RICHARDSON, K.A.; CURRAH, R.S. & HAMBLETON, S. Basidiomycetes endophytes from the roots of neotropical epiphytic orchidaceae. **Lindleyana** **8**. 1993. 127-137 p.

RICHARDSON, K.A. & CURRAH, R.S. The fungal community associated with the roots of some rainforest epiphytes of Costa Rica. **Selbyana** **16**. 1995. 49-73 p.

RIKER, A.J. & RIKER, R.S. **Introduction to Research on Plant Diseases**. St. Louis, Mo., John S. Swift Co. 1936.

TAYLOR, D.L.; BRUNS, T.D.; LEAKE, J.R. & READ, D.J. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. **Ecol. Studies**, 157:375-413, 2002.

UETAKE, Y.; FARQUHAR, M. L.; PETERSON, R. L. Changes in microtubules arrays in symbiotic orchid protocorm during fungal colonization and senescence. **New Phytologist**, Cambridge, v. 135, p. 701-709, 1997.

WARCUP, J. H. Symbiotic germination of some Australian terrestrial Orchids. **New Phytologist**, Cambridge, v. 72, p. 371-381, 1981.

ZELMER, C. D.; CURRAH, R.S. *Ceratorhiza pernacatena* and *Epulorhiza calendulina* spp. nov. mycorrhizal fungi of terrestrial orchids. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 73, p. 1981-1985, 1995.

ZELMER, C. D.; CUTHBERTSON, L.; CURRAH, R.S. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. **Mycoscience**, Tokyo, v. 37, p. 439-448, 1996.

5 GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Cyrtopodium vernum* Rchb.f. & Warm (ORCHIDACEAE)

RESUMO

Embora cada cápsula (o fruto da orquídea) possa conter milhares de sementes, apenas pequena parte germina na natureza. Como as sementes não possuem nenhum tipo de tecido de reserva, dependem da associação simbiótica com fungos micorrízicos que normalmente vivem associados às plantas adultas. Técnicas de cultura de tecidos *in vitro* têm auxiliado nas tentativas de propagação e preservação de inúmeras espécies de orquídeas. Nestas técnicas são fornecidos os nutrientes e as condições de pH, luminosidade e temperatura adequados para que as sementes germinem sem necessidade da associação micorrízica. Porém, plantas originadas a partir deste cultivo assimbiótico *in vitro* tem apresentado baixa sobrevivência quando o objetivo é a reintrodução da espécie em seu habitat natural. Assim, também se faz necessária a pesquisa com o cultivo simbiótico *in vitro*. O presente trabalho teve como objetivos obter protocolos para a germinação *in vitro* de *Cyrtopodium vernum* de forma simbiótica e de forma assimbiótica. O material vegetal obtido foi proveniente da Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo, localizada na Serra Dourada, município de Mossâmedes – GO. Cápsulas em fase de maturação e sem sinais de contaminantes foram previamente desinfestadas antes de se iniciar a semadura. Para o cultivo simbiótico, os resultados obtidos 120 dias após a inoculação não foram satisfatórios, uma vez que não foi verificada presença de protocormos. No cultivo assimbiótico observou-se o surgimento de protocormos no meio ½ MS 35 dias após a inoculação. Após 60 dias, todos os tratamentos já apresentavam a formação de protocormos. O meio ½ MS revelou-se superior aos demais no tempo e taxa de germinação e no desenvolvimento de protocormos. Porém, em nenhum dos três meios testados ocorreu a formação de novas plântulas indicando a necessidade de aperfeiçoar a indução da organogênese de protocormos de *C. vernum*.

Palavras-chave: cultura de tecidos, germinação, orquídea.

ABSTRACT

IN VITRO SEED GERMINATION OF *Cyrtopodium vernum* Rchb. f. & Warm (ORCHIDACEAE: CYRTOPODIINAEE).

Although each capsule (as the orchid fruit is called) can contain thousands of seeds, only small part germinates in the nature. As the seeds do not possess nutrient reserve, they depend on the simbiotic association with mycorrhizae fungi that normally associates to the adult plants live. Tissue culture techniques have assisted in the attempts of propagation and preservation of innumerable orchids species. In these techniques nutrients are supplied and the adequate conditions of pH, luminosity and temperature so that the seeds germinate without necessity of the mycorrhizae association. However, plants originated from this assymbiotic *in vitro* culture has low survival when the objective is the species reintroduction in its natural habitat. Thus, it makes necessary the research with the symbiotic *in vitro* culture. The present study had, therefore as objective to get protocols for the *in vitro* germination of *C. vernum* of symbiotic form and assymbiotic *in vitro* culture. Capsules of *C. vernum* had been collected at the Biological Reserve Prof. Jose Ângelo Rizzo, a forest remainder of 500 ha of bioma Cerrado, located in the Serra Dourada, city of Mossâmedes-GO. Capsules in phase of maturation and without signals of contaminantes, previously had been disinfested before if initiating the sow of seeds. For the symbiotic culture, the gotten results after 120 days the inoculation had not been satisfactory, because was not verified the presence of protocorms. New tests with different methodologies and other fungi isolated will have to be carried through. In the assymbiotic culture the sprouting of protocorms in the ½ MS media was observed 35 days after the inoculation. After 60 days, all the treatments already presented the formation of protocorms. The ½ MS media showed superior in the time and the tax of germination and in the development of protocorms. However, in none of the three treatments the formation of seedlings occurred indicating the necessity to test the induction of organogenesis of these protocorms.

Keywords: tissue culture, germination, orchid.

5.1 INTRODUÇÃO

A propagação *in vitro* tem sido utilizada como um meio rápido de propagação vegetativa de plantas ornamentais, permitindo a obtenção de um grande número de clones em qualquer época do ano. O sucesso desta técnica não só depende dos fatores inerentes ao tecido vegetal (genéticos e fisiológicos), mas também das condições térmicas e luminosas em que a cultura é mantida, e do meio de cultura apropriado, que permite a indução, a multiplicação e o crescimento de novas plantas (Nagao et al., 1994). A técnica consiste na separação de algumas células de tecido vegetal, fazendo com que elas se reproduzam, formando uma nova planta. Baseia-se no princípio da chamada totipotência celular, que é a capacidade de uma única célula vegetal se multiplicar e gerar uma nova planta (Damião Filho, 2006). Segundo Milaneze (1997), com os trabalhos de Lewis Knudson nas décadas de vinte a quarenta do século XX, tornou-se possível a germinação das sementes e o desenvolvimento de plântulas de orquídeas *in vitro* assimbioticamente, na presença de sais minerais e carboidratos solúveis em meio de cultura solidificado com ágar. A partir de então, o comércio de plântulas de orquídeas produzidas em laboratório aumentou significativamente. A micropropagação ou propagação *in vitro* tem sido utilizada no Brasil há pouco mais de 25 anos, para aumentar principalmente a produção de mudas, reduzindo seu custo e contribuindo para aliviar as pressões sobre as espécies nativas salvando muitas orquídeas da extinção (Stancato et al., 2001).

A propagação de orquídeas pode ser tanto vegetativa, quanto por meio de sementes (Paula & Silva, 2004); estas, embora produzidas em grande quantidade, apenas germinam na natureza se houver associação simbiótica com fungos micorrízicos, pois não possuem endosperma funcional (Pereira et al., 2003). Para que haja germinação, é necessário que as sementes entrem em contato com fungos micorrízicos, que normalmente vivem associados às plantas adultas (Paula & Silva, 2004), ou que estejam em meio de cultura adequado, em laboratório. Na germinação simbiótica, inicialmente, as hifas penetram por poros localizados nas extremidades das sementes, infectando as células suspensoras. Posteriormente, penetram pela parede celular das células do córtex, adjacentes às células suspensoras, ramificando-se entre a parede celular e a membrana citoplasmática. Após a ramificação, as hifas envelhecem-se, dando origem aos *pelotons*, estruturas que caracterizam a associação micorrízica orquidóide. Formados os *pelotons*, o embrião desenvolve-se por meio dos produtos advindos da digestão enzimática do fungo,

dando origem aos protocormos (Pereira et al., 2004). Segundo Zettler (1997), citado por Pereira et al. (2004), poucos trabalhos sobre germinação de orquídeas com fungos micorrízicos são realizados em espécies terrestres. Além do isolamento do hospedeiro natural, estes fungos micorrízicos em cultura pura são empregados no cultivo simbiótico da espécie de interesse, visando estudos de especificidade e seleção de isolados que promovam melhor desenvolvimento dos protocormos (Stewart & Zettler, 2002).

O objetivo deste trabalho foi selecionar meios de cultura adequados para a germinação e o desenvolvimento de plântulas de *Cyrtopodium vernum in vitro*, durante a fase de micropropagação em cultivo assimbiótico, e testar a especificidade micorriza-planta em cultivo simbiótico.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Cápsulas de *C. vernum* em fase de pré-maturação, sem rachaduras e sintomas da presença de contaminantes, foram coletadas em áreas de Cerrado Rupestre da Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo, localizada na Serra Dourada, município de Mossâmedes, GO (S 16 04 36.4, W 50 11 16.9, 1006 m de altitude). As cápsulas foram levadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás para a semeadura *in vitro*. Para a desinfestação, as cápsulas foram lavadas em água corrente e imersas em solução de álcool 70% durante 1 minuto; posteriormente transferidas para solução de hipoclorito de sódio comercial a 10% durante 15 minutos. Em seguida, as cápsulas passaram por um enxágüe em água destilada autoclavada.

5.2.1 Cultivo assimbiótico

Os meios de cultura utilizados foram MS (Murashige & Skoog, 1962); ½ MS (com metade da concentração de macronutrientes) e KC (Knudson, 1922). O pH dos meios foram ajustados para 5,8 e distribuídos 30 mL do meio em cada frasco com capacidade de 120 mL, em seguida, foram autoclavados à temperatura de 120°C por 20 minutos. Com um bisturi estéril, as cápsulas de foram abertas e as sementes semeadas uniformemente nos meios de cultura. Após a semeadura, os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob condições de 16 horas de luz diária, intensidade luminosa de 35 $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 25°C \pm 2°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado,

com três tratamentos e 12 repetições. Foram realizadas avaliações a cada 30 dias para a germinação e desenvolvimento dos protocormos. Aos diferentes estágios de desenvolvimento dos protocormos, foram atribuídas notas de 0 a 6, observando-se as seguintes características: 0 = não ocorreu germinação; 1 = embrião bem desenvolvido dentro do envoltório; 2 = aparecimento dos protocormos; 3 = protocormos bem desenvolvidos; 4 = início da formação da primeira folha; 5 = primeira folha bem desenvolvida e; 6 = início da formação da segunda folha. Os dados referentes ao número de protocormos obtidos por frasco e por meio foram transformados em raiz quadrada de $(x+0,5)$, submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

5.2.2 Cultivo simbiótico

Com o auxílio de um bisturi estéril, as cápsulas de *C. vernum*, previamente desinfestadas, foram seccionadas longitudinalmente e, cerca de cem sementes foram distribuídas em papel filtro de 2,3 cm de diâmetro, previamente autoclavado, dentro de uma placa de Petri contendo 20 mL de meio ágar-aveia (AA) modificado (Dixon, 1987).

Em uma das extremidades da placa de Petri foi colocado o papel filtro e sobre esse foram distribuídas as sementes; na outra extremidade foi inoculado um disco de 9 mm de meio BDA contendo o micélio fúngico do isolado micorrízico pertencente ao gênero *Epulorhiza*, previamente isolado de raízes de *C. vernum*, retirado das bordas das colônias resultantes do crescimento dos isolados (Figura 5.1).

As placas, 12 no total, foram seladas com filme PVC e incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro, por duas semanas e, em seguida a 16 horas de luz, intensidade luminosa de $35 \mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e mantidas sob a mesma temperatura média. A cada 30 dias, as sementes induzidas à germinação simbiótica sobre os discos de papel foram transferidas para lâmina de vidro, encobertas com lamínula e observadas ao microscópio ótico para classificação do estágio de desenvolvimento e para determinação da porcentagem de sementes germinadas. Aos diferentes estádios de desenvolvimento das sementes foram atribuídas notas de 0 a 5, como mostra a Tabela 5.1.

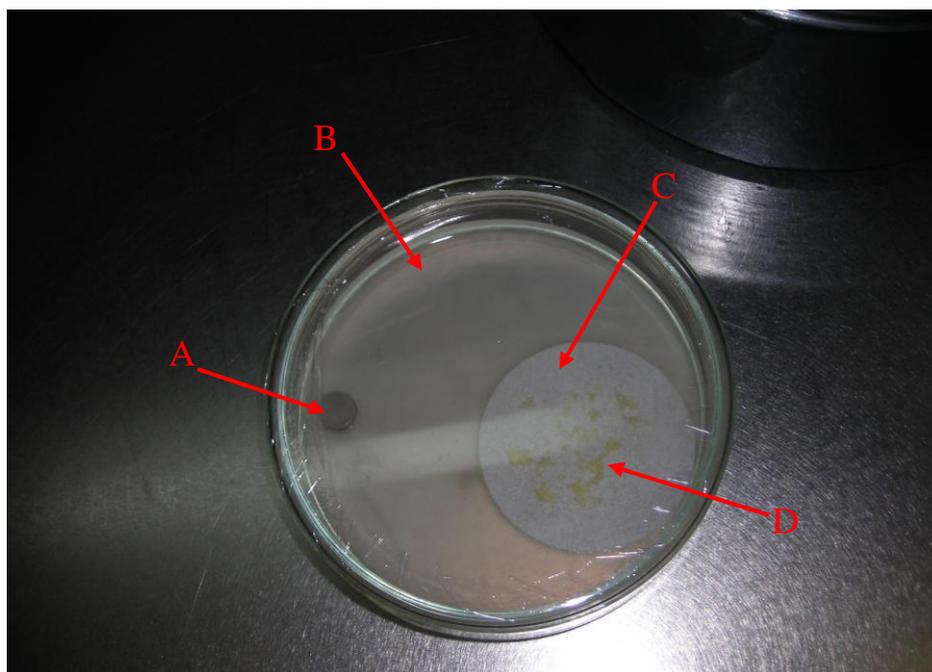


Figura 5.1. Cultivo simbiótico *in vitro* de sementes de *C. vernum*. As setas indicam, (A) disco com isolado fúngico, (B) Meio de cultura em placa de Petri, (C) papel Watman nº 3, (D) sementes de *Cyrtopodium* (Foto – Fábio José Gonçalves).

Tabela 5.1. Notas atribuídas aos estádios de desenvolvimento de sementes de *C. vernum* cultivadas simbioticamente *in vitro*.

Estágio	Descrição
0	Não ocorreu germinação
1	Embrião intumescido dentro da semente
2	Início do rompimento do tegumento
3	Estabelecimento dos protocormos
4	Formação dos primórdios foliares
5	Protocormos com 0,5 cm de diâmetro

Fonte: Zettler & Hofer (1998), adaptada.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Cultivo assimbiótico

Dos frascos semeados com as sementes de *C. vernum*, seis apresentaram oxidação deixando o meio de cultura escurecido. A germinação ocorreu 35 dias após a semeadura e, mesmo nos frascos onde as sementes oxidaram houve germinação (Figura 5.2). Os resultados de percentual de germinação estão apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Porcentagem de germinação em diferentes estádios de desenvolvimento dos protocormos de *Cyrtopodium vernum*, 60 dias após inoculação das sementes em três meios de cultura diferentes.

Meio de cultura	Estádio de desenvolvimento						
	0	1	2	3	4	5	6
	Porcentagem de sementes nestes estádios						
MS	90	15	5	0	0	0	0
½ MS	10	10	60	20	0	0	0
KC	40	40	20	0	0	0	0

0 = não ocorreu germinação; 1 = embrião bem desenvolvido dentro do envoltório; 2 = aparecimento dos protocormos; 3 = protocormos bem desenvolvidos; 4 = início da formação da primeira folha; 5 = primeira folha bem desenvolvida e 6 = início da formação da segunda folha.



Figura 5.2. Protocormos de *C. vernum* desenvolvidos em meio de cultura 1-2 MS (com metade da concentração de macronutrientes) asséptico, após 35 dias de cultivo (Foto – Fábio José Gonçalves).

Houve diferenças significativas entre os tratamentos. Aos 60 dias após a inoculação das sementes, o meio ½ MS foi mais eficiente na germinação das sementes de *C. vernum*, seguido do meio KC. Em meio MS, a taxa de germinação foi baixa (Figura 5.3).

As sementes de *C. vernum* cultivadas em meio MS com metade da concentração de macronutrientes, apresentaram percentual de germinação maior, quando comparadas aos outros meio de cultura, após 120 dias de cultivo. Apesar de haver germinação e de ocorrer um bom estabelecimento dos protocormos aos 120 dias de cultivo, as plântulas não se desenvolveram em nenhum dos meios testados, mesmo após 60 dias da

última análise estatística realizada, indicando que outros meios de cultura ou meios de cultura acrescidos de nutrientes ou fitorreguladores deverão ser utilizados para o enraizamento e desenvolvimento da parte aérea.

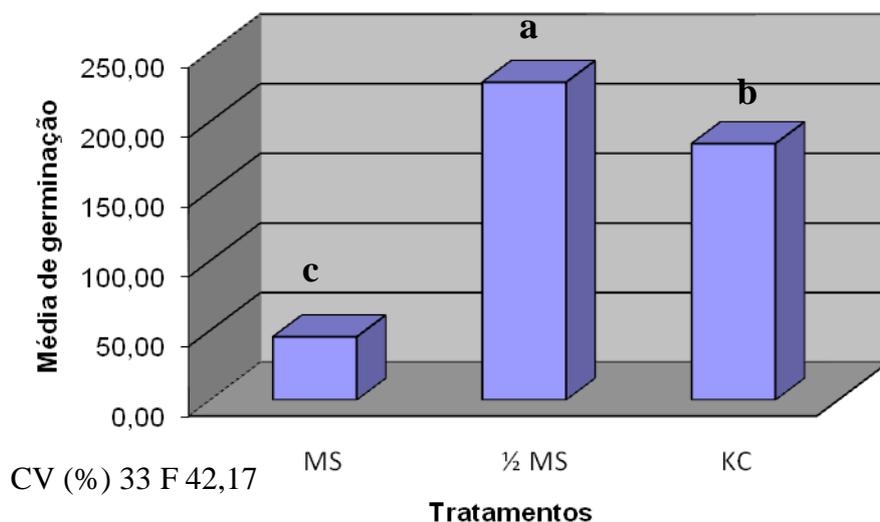


Figura 5.3. Médias de germinação de sementes de *C. vernum* em diferentes meios de cultura, 60 dias após semeadura. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey (5%).

Santos (2007) realizou trabalhos de germinação com sementes de *Cattleya bicolor*. O meio de cultura utilizado foi o KC e as sementes foram tratadas em soluções com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA) e ácido giberélico (GA_3). As avaliações foram feitas sobre os percentuais de germinação de sementes, de protocormos mortos e de protocormos com gemas. Segundo o autor, os tratamentos com maior concentração de GA_3 (2 mg/L^{-1} e 5 mg/L^{-1}) proporcionaram maior formação de gemas em comparação com o controle e tratamento com ANA. As sementes tratadas com ácido giberélico na concentração de 1 mg/L^{-1} apresentaram um desenvolvimento mais acelerado do que as sementes do grupo controle, ao final de quatro meses de avaliação.

Segundo Miyoshi & Mii (1995), o uso de reguladores químicos como tratamento pré-germinativo pode auxiliar no processo de germinação e desenvolvimento de protocormos. O ácido naftaleno acético (ANA), Ethephon e 6-benzilaminopurina (BAP) promovem aumento na pré-germinação e formação de protocormos de *Calanthe discolor*. Porém a adição de BAP no meio de cultura para germinação de sementes de orquídeas tem apresentado resultados contrastantes. Efeitos positivos, como a redução do tempo de germinação de *Encyclia phoenicea*, foram observados por Pauw et al. (1995), em razão da

adição de BAP ao meio de Murashige & Skoog (1962). Entretanto, a adição de BAP a diversos meios nutritivos resultou em efeitos deletérios para a germinação de sementes imaturas de *Cyrtopodium eugenii* e *Cyrtopodium cristatum* (Caramaschi & Caldas, 1999).

Em geral, nas culturas *in vitro*, utilizam-se reguladores de crescimento vegetal com funções auxínicas, como verificado por Barroso et al. (1990) e Miyoshi & Mii (1995). Combinações de cinetina (KIN) e ácido indolacético (AIA), descritas por Hadley e Harvais (1968), permitem um bom desenvolvimento de orquídeas; e além disso, que fatores externos, como luz e temperatura, podem antecipar o estágio de desenvolvimento dessas plantas.

Trabalho realizado por Araújo (1999), com *Cyrtopodium palmifrons* e *Cattleya walkeriana*, indica que os meios de cultura sem a adição de fitorreguladores podem ser recomendados para as fases iniciais de desenvolvimento das duas espécies. Porém a espécie *C. walkeriana* apresenta melhores percentuais de germinação em meio MS acrescido de 5 mg L⁻¹ de cinetina e 30 mg L⁻¹ de AIA (ácido indolacético). Pasqual (2006) apresenta resultados de germinação de sementes de *C. walkeriana* em meio de cultura KC acrescido de polpa de banana nanica e carvão ativado. Segundo o autor, o acréscimo de 20 mL por frasco de meio de cultura líquido obtido com a mesma formulação de KC, porém sem ágar, polpa de banana nanica e carvão ativado, ao cultivo das sementes, 15 dias após a semeadura, promovem maior proliferação de brotos e massa seca total das plântulas. Oliveira & Faria (2005), realizou estudos comparativos entre os meios MS, Knudson C, Vacin & Went e meios a base de adubo NPK (10-5-5) na concentração de 3,0 g L⁻¹ e NPK (10-30-20) na concentração de 3,0 g L⁻¹. Segundo os autores, as melhores médias de comprimento da maior raiz foram obtidas em meio com NPK (10-5-5), para *Catasetum fimbriatum* e *Cyrtopodium paranaensis*.

Sorace et al. (2008), estudando a germinação de sementes de *Oncidium baueri* em meio de cultura MS e ½ MS, com diferentes concentrações de sacarose, mostraram que o meio ½ MS acrescido de 40 gL⁻¹ de sacarose foi mais eficiente no desenvolvimento vegetativo *in vitro* da espécie.

Embora o objetivo inicial tenha sido a obtenção de protocolos de germinação assimbiótica *in vitro* de baixo custo, os resultados demonstram que, para *C. vernum*, o uso de fitorreguladores adicionados ao meio seja passo necessário para que ocorra a diferenciação e organogênese da parte aérea e de raízes a partir dos protocormos. Meios de

cultura com pHs mais baixos também podem ser testados, uma vez que o pH dos solos onde *C. vernum* ocorre apresentam valores entre 4,0 e 4,2.

5.3.2 Cultivo simbiótico

Em relação ao cultivo simbiótico, não houve contaminação das sementes com o fungo micorrízico. A porcentagem de germinação nos diferentes estádios de desenvolvimento, 120 dias após a inoculação, assim como a porcentagem total de germinação, podem ser observadas na Tabela 5.3, adaptada de Pereira et al. (2005). Considerando que a germinação é iniciada a partir do 3º estágio de desenvolvimento das sementes, quando há o rompimento do tegumento, a germinação simbiótica não obteve resultados satisfatórios pelo método utilizado. Esses resultados sugerem a falta de algum estímulo nessa combinação fungo-planta, conforme foi evidenciado também em outros trabalhos de germinação simbiótica (Zettler & Hofer, 1998; Pereira et al., 2005).

Tabela 5.3. Porcentagem de sementes nos seus diferentes estádios de desenvolvimento e porcentagem total de germinação de sementes de *C. vernum* cultivadas simbioticamente *in vitro*.

Estádio de desenvolvimento	% de germinação
0	6
1	94
2	0
3	0
4	0
5	0
Total de germinação	0

Pereira (2004), buscando estabelecer cultivo simbiótico entre *Epulorhiza epiphytica* e *Cyrtopodium cardiochillum*, também obteve baixo desenvolvimento de protocormos, com porcentagem de apenas 11 % de plântulas, 63 dias após a sementeira.

A especificidade da associação micorrízica em orquídeas ainda é fonte de controvérsia na literatura, visto que enquanto alguns trabalhos demonstram a existência de especificidade entre fungo e planta (Warcup, 1973; 1981), outros demonstram a baixa especificidade (Stewart & Zettler, 2002). Para Currah & Zelmer (1992), a especificidade entre uma determinada espécie de orquídea e fungos micorrízicos é freqüente e pode ser um indício da coevolução da espécie da orquídea com o seu simbiote, podendo assim ser

estabelecida uma relação com o hábito da planta, uma vez que *Epulorhiza* sp. é observado com maior frequência em associação com as orquídeas terrestres e rupícolas. Todavia, *Epulorhiza* sp. já foi constatado em plantas do gênero *Epidendrum* por Zettler et al. (1998), Pereira et al. (2003) e Nogueira et al. (2005), demonstrando que a especificidade fungo-planta pode ser maior que a especificidade fungo-habitat.

A germinação de sementes e o desenvolvimento de protocormos de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) induzidos simbioticamente foram descritos pela primeira vez por Pereira et al (2005). Segundo os autores, sementes de *O. flexuosum* foram inoculadas com dez fungos micorrízicos rizotonióides, previamente isolados de micorrizas de dez espécies de orquídeas neotropicais do Brasil, incluindo *O. flexuosum*. Foram utilizados um isolado pertencente à espécie *Epulorhiza repens*, dois pertencentes à *Epulorhiza epiphytica*, seis de *Ceratorhiza* spp. e um de *Rhizoctonia* sp. Sementes inoculadas com o isolado de *Ceratorhiza* sp., originalmente isolado do sistema radicular de *O. flexuosum* em habitat natural, promoveu a germinação das sementes em sete dias e em, aproximadamente, 30 % das plântulas, houve formação de folhas após 50 dias de incubação, apresentando *pelotons* em algumas células do protocormos e das radicelas. Os demais isolados promoveram a germinação das sementes; entretanto, não promoveram um desenvolvimento ótimo dos protocormos. Seus estudos mostraram que sementes incubadas na ausência de fungos micorrízicos não germinaram. Neste estudo, a especificidade fungo-planta fica claramente observada, uma vez que, apenas o fungo micorrízico isolado da própria espécie foi capaz de promover o desenvolvimento ótimo dos protocormos de *O. flexuosum*. Porém, em determinadas situações, os fungos micorrízicos podem, estabelecer associações patogênicas com as sementes das orquídeas, fato verificado por Wang et al. (2000), citados por Pereira (2005), o que pode explicar a ausência de germinação das sementes de *C. vernum* no presente estudo.

Das dez colônias isoladas do macerado de raízes de *C. vernum*, apenas uma foi utilizada em testes de germinação. O fungo foi selecionado segundo suas características morfológicas por se mostrar o mais similar aos fungos micorrízicos já citados em outras literaturas. Testes de germinação utilizando as demais colônias isoladas poderão ser realizados no intuito de se verificar a especificidade destes isolados com as sementes de orquídea. Não há registro de isolamento de fungos micorrízicos de *Cyrtopodium* sendo este trabalho o primeiro relato de isolamento para orquídeas deste gênero, podendo servir de referência para futuros trabalhos com outras espécies. Assim, novos estudos deverão ser

realizados para a identificação destes isolados, além de novos experimentos de germinação envolvendo outras espécies de orquídeas para testes de especificidade orquídea-micorriza. Poderão ser realizados ainda, a colonização, a partir do substrato de crescimento, fato observado em trabalho realizado por Pereira (2005), que observou que o fungo micorrízico alcança o interior das radículas e atua na estabilidade do protocormo em condições naturais, e pode possibilitar a micorrização de protocormos cultivados assimbioticamente *in vitro*, em condições de laboratório. Estas plantas poderão ser utilizadas em possíveis programas de reintrodução das espécies em seu habitat natural, uma vez que estudos demonstram que sem a presença de micorrizas, o sucesso de adaptação destas plantas na natureza é muito baixo.

5.4 CONCLUSÕES

- Para o cultivo assimbiótico, o meio MS com metade da concentração de macronutrientes mostrou-se superior ao meio Knudson C e ao meio MS completo para o tempo e taxa de germinação *in vitro* de sementes de *C. vernum*.
- O método de pareamento entre as sementes de *C. vernum* e o isolado micorrízico de *Epulorhiza* não induziu à germinação *in vitro* de sementes de *C. vernum*.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, L. G., CARNEIRO, I. F.; PRABHU, A. S. Produção *in vitro* de mudas de *Cattleya walkeriana* e *Cyrtopodium palmifrons* a partir de sementes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 29, n. 2, p. 67-71, 1999.

CARAMASCHI, G. M. C. L.; CALDAS, L. S. Comparação da germinação *in vitro* de sementes provenientes de frutos imaturos de *Cyrtopodium* spp. (Orchidaceae) com idades diferentes. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, p. 175, 1999. Suplemento.

CURRAH, R.S. & ZELMER, C.D. A key and notes for the genera of fungi mycorrhizal with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. **Reports of the Tottori Mycological Institute** 30: 43-59. 1992.

Dahlgren, R. M. T.; Clifford, H. T. & Yeo, P. F. 1985. **The Families of the monocotyledons**. Springer Verlag. Berlin.

DAMIÃO FILHO, C. F. **Micropropagação e sementeira de orquídeas (técnicas básicas)**. Ed. Funep. Jaboticabal, SP. 2006.

DIXON, K. Raising terrestrial orchids from seed. In: HARRIS, W. K. (Ed.). **Modern orchid growing for pleasure and profit**. Adelaide: Orchid Club of South Australia Inc., 1987. v. 1, p. 47-100.

KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchids seeds. **Botanical Gazette**, v.73, p.1-25, 1922.

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

NOGUEIRA, R. E.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; LANNA, M. C. S.; MENDONÇA, M. P. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do quadrilátero ferrífero, MG, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, Porto Alegre, v. 3, n. 19, p. 417-424, 2005.

PAULA, C.C.; SILVA, H.M.P.; **Cultivo prático de orquídeas**. 3 ed. Viçosa: UFV, 2004.

PAUW, M. A. de; REMPHREY, W. R.; PALMER, C. E. The cytokinin preference for *in vitro* germination and growth of *Cypripedium candidum*. **Annals of Botany**, London, v. 75, p. 267-275, 1995.

PEREIRA, M. C. **INDUÇÃO *in vitro* da germinação de sementes de *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides**. 2004. 25f. Dissertação (Monografia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

PEREIRA, O.L.; ROLLEMBERG, C.L.; BORGES, A.C.; MATSUOKA, K. & KASUYA, M.C.M. *Epulorhiza epiphytica* sp.nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. **Mycoscience** **44**. 2003. 153–155 p.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; ROLLEMBERG, C. L.; CHAER, G. M. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (ORCHIDACEAE) por fungos micorrízicos rizoctonióides. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p.199-206, 2005.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.17, n.1, p. 25-33, 2001.

STEWART, S. L.; ZETTLER, L. W. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. Macroceratilis*) from Florida. **Aquatic Botany**, Catalunya, v. 72, p. 25-35, 2002.

WARCUP, J. H. The mycorrhizal relationship of Australian orchids. **New Phytologist**, Cambridge, v. 87, p. 387-392, 1973.

WARCUP, J. H. Symbiotic germination of some Australian terrestrial Orchids. **New Phytologist**, Cambridge, v. 72, p. 371-381, 1981.

ZETTLER, L. W.; HOFER, C. J. Propagation of the little club-spur orchid (*Plantathera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. **Enviroment Experimental Botanic**, Amsterdam, v. 39, p. 189-195, 1998.

