



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ÍTALO VINÍCIUS CANTANHÊDE SANTOS**

**CULTIVO SIMBIÓTICO *IN VITRO* DE *Trichocentrum cebolleta* E *Galeandra blanchetii* (ORCHIDACEAE JUSS.)**

SÃO LUÍS

2019

**ÍTALO VINÍCIUS CANTANHÊDE SANTOS**

**CULTIVO SIMBIÓTICO *IN VITRO* DE *Trichocentrum cebolleta* E *Galeandra blanchetii* (ORCHIDACEAE JUSS.)**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Wagner Coelho Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Juliano dos Santos

SÃO LUÍS

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Santos, Ítalo Vinícius Cantanhêde.

Cultivo simbiótico in vitro de *Trichocentrum cebolleta* e *Galeandra blanchetii* Orchidaceae Juss / Ítalo Vinícius Cantanhêde Santos. - 2019.

52 f.

Coorientador(a): Juliano dos Santos.

Orientador(a): Alessandro Wagner Coelho Ferreira.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. Fungos. 2. Germinação. 3. Orquídeas. I. Coelho Ferreira, Alessandro Wagner. II. dos Santos, Juliano. III. Título.

ÍTALO VINÍCIUS CANTANHÊDE SANTOS

**CULTIVO SIMBIÓTICO *IN VITRO* DE *Trichocentrum cebolleta* E *Galeandra blanchetii* (ORCHIDACEAE JUSS.)**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Alessandro Wagner Coelho Ferreira - Orientador  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Prof. Dra. Ilisandra Zanandrea – 1ª Avaliadora  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Prof. Dra. Alana das Chagas Ferreira Aguiar – 2ª Avaliadora  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Prof. Dr. Hivana Patricia Melo Barbosa Dall’Agnol – 1ª Suplente  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Bsc. Igor Vinícius Pimentel de Brito – 2º Suplente  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

*À minha mãe*

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho é para mim muito mais que uma produção científica, ou um simples trabalho de conclusão de curso, mas sim um reflexo da minha vida e dos momentos que passei para chegar até aqui durante esses cinco anos de graduação. Traz consigo todos os altos e baixos, dificuldades e alegrias, sorrisos e lágrimas que estiveram presentes durante esse tempo. É fruto do esforço que foi necessário para enfrentar obstáculos que nunca pensei que iria viver, muito menos que seria capaz de superar. Entretanto, o mérito disso tudo não é nem de longe apenas meu, mas sim de muitas outras pessoas que passaram pela minha vida e contribuíram para que eu me tornasse quem sou hoje e conseguisse chegar onde cheguei, a essas pessoas sou eternamente grato.

Ao bem mais precioso que tenho nesse mundo, minha mãe Francisca Cantanhêde, a quem dedico tudo que sou e construí até hoje. Talvez nem eu saiba tudo o que a senhora precisou passar para estar aqui hoje vendo seu filho se formar, mas sou grato a cada esforço que a senhora teve que fazer por mim, sou grato por ser filho de uma professora que sempre me mostrou que o caminho para uma vida melhor está na educação. Sou grato por ser filho de uma mulher que teve que trabalhar ainda menina pra poder estudar e ter condições de dar uma vida melhor do que a que teve para seu filho. Sou grato pela mulher forte e corajosa que a senhora é e sempre foi, que me ensinou a ser uma pessoa boa e enfrentar meus medos, sou grato por ter uma mãe que me ama e me aceita do jeito que sou.

Lembro de quando era criança e inventava brincadeiras um pouco malucas, misturando coisas, observando bichos e plantas, criando um “clubinho de experiências” com meus amigos e a senhora falava: - Esse menino ainda vai ser um cientista. Pois não é que eu virei mesmo um! Obrigado por tudo mãezinha, essa vitória é nossa.

Gostaria de agradecer aos que não estão mais aqui, não fisicamente pelo menos, mas se fazem presentes nas memórias felizes e na saudade que deixaram. Ao meu avô, Domingos Cantanhêde (*in memorium*), que mesmo tendo apenas o ensino fundamental completo foi o homem mais sábio que já conheci na vida, sempre curioso e amante do conhecimento tinha o verdadeiro espírito de um cientista e sempre foi uma inspiração pra mim. Ao meu eterno pai que a vida me deu, Manoel dos Anjos Santos (*in memorium*), que sempre sonhou em ver um filho seu formado, que de onde ele estiver possa estar vendo onde o filho dele conseguiu chegar.

À minha família, que sempre foi rocha firme nos momentos mais difíceis da minha existência. Com ela aprendi muito do pouco que sei da vida, aprendi o valor da simplicidade, do trabalho duro, da superação e da gratidão por tudo aquilo que conseguimos conquistar. Em especial a minha avó Maria Cantanhêde, sem a qual essa família nada seria, que, apesar das dificuldades, conseguiu criar 7 filhos e dar origem a essa família da qual tanto me orgulho. As minhas tias, Sebastiana, Edna, Celma, Hélida, Maria de Jesus e Creuza, por serem as mulheres mais incríveis e fortes que tive o prazer de conviver, cada uma, da sua maneira, foi uma mãe pra mim e por isso sempre serei grato.

Ao meu pai, Martinho Frazão, sua presença na minha vida ajudou a me tornar uma pessoa mais forte e segura de mim e por isso sou grato, obrigado por tudo. À minha irmã Kelly Luz, que é uma das minhas maiores inspirações, mulher forte e dedicada, que depois dos 30 anos, sendo mãe, resolveu mudar sua vida e fazer graduação e pós graduação e hoje dá os primeiros passos de seu próprio negócio, tu és meu grande orgulho. Aos meus primos, em especial a Deyse, Felipe, Suellen, Polyanna e Jéssica que cresceram junto comigo e compartilharam muitos momentos felizes ao meu lado, vocês são e sempre serão parte da minha história.

Aos amigos, a família que escolhemos ter, os quais na maioria das vezes são os que mais convivem conosco e nos conhecem mais do que ninguém, vocês são as melhores pessoas que entraram na minha vida e ajudaram imensamente a construir a pessoa que sou hoje. Sem vocês o Ítalo feliz, confiante e cheio de sonhos não existiria, cada um de vocês tem um espaço gigante no meu coração.

Aos amigos que estão comigo há mais tempo, Hugo e Juliana (Pimenta), que durante vários anos conviveram comigo quase que diariamente em alguns dos melhores anos que vivi na vida. As longas tardes de ensaio na escola de música, nas tocatas, nos desfiles, na ordem unida, no caminho pra casa (e nos desvios dele kkk), vocês sempre tiveram ao meu lado e mesmo depois desses anos todos e da distância que a vida nos impôs, toda vez que os vejo de novo é como se eu voltasse no tempo para aquelas tardes de segundas, quartas e sextas em que tudo era feliz. Obrigado por fazerem parte da minha história.

Aos amigos que fiz durante os três anos de ensino médio e que felizmente continuam presentes na minha vida. Aos meus “Inconsequentes”: Kananda, Maurício, Nariane, Mateus, Weber e, em especial, Rosângela, que além de colega de escola se tornou colega de turma na faculdade, a amizade que tenho com vocês é uma das coisas mais especiais e importantes que aconteceram

na minha vida, sou eternamente grato por vocês terem acolhido um penetra como eu no grupinho de vocês.

Aos meus “That’s Mahogany”, Manu, Vinícius e Robson, pelas risadas e piadas internas que só nos entendemos, pelos passeios e vaquinhas nos tempos das vacas magras, pelo companheirismo e liberdade de poder ser exatamente como eu sou quando estou com vocês, por aturarem esse meu jeito meio difícil de ser, enfim, pela nossa amizade, espero leva-los comigo pela vida toda, amo vocês.

À duas amigas muito especiais das quais compartilhei momentos incríveis e que foram minhas confidentes e irmãs. A primeira delas é minha eterna “best” Adriana, por muitos anos esteve ao meu lado todos os dias alegrando minha vida com seu jeito doido de ser e me fazendo um pouco mais doido como ela, tua alegria, teu sorriso foram um alento pra mim em momentos difíceis que tu mesmo nem sabia, obrigado por todos esses anos de amizade e companheirismo, te amo demais. A segunda é minha amiga Fernanda, a quem compartilhei minhas alegrias e segredos durante todo o ensino médio, você sempre esteve ao meu lado ouvindo minhas lamúrias e me fazendo rir, sou muito feliz que nossa amizade tenha perdurado mesmo com a distância por todos esses anos, obrigado por tudo Fernandinha.

Aos amigos e futuros colegas de profissão que a UFMA colocou na minha vida, em especial à Isla e Tainá, minha eterna dupla dinâmica dos trabalhos em grupos (muitas vezes feitos de última hora kkk), obrigado pelo companheirismo nas manhãs, tardes, noites e até madrugadas que passamos juntos, obrigado pelas alegrias e surtos compartilhados durante esses 5 anos, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Ao meu amigo de longas datas que a UFMA trouxe de volta para o meu convívio diário, Carlos Luís, ao longo desses mais de 12 anos que nos conhecemos eu só consigo te admirar cada vez mais, tu é um exemplo de força, coragem e resiliência no qual eu sempre me inspirei, obrigado pela nossa amizade. A minha amiga mais atrasada de todos os tempos, que desde a época da histologia conquistou meu coração com seu jeito meigo e ao mesmo tempo bruto de ser, Ana Caroline, você tem um espaço guardadinho no meu coração e toda vez que estou contigo eu transbordo de alegria.

Aos meus “Chernos” favoritos, meus amigos pra toda hora, minha “fanbase” do coração.

Ao meu mais que amigo, que considero hoje como um irmão que a vida me deu, Meydson, pela amizade mais sincera e leal que adquiri durante a graduação. Desde aquele dia que consegui



puxar papo contigo na fila do RU até hoje tu mudou minha vida de uma maneira que eu nunca esperava. Sempre enxerguei em ti alguém que queria ser e aos poucos fui aprendendo contigo a ser mais livre, espontâneo e a me amar mais, obrigado por ajudar esse menino tímido a enfrentar todos esses desafios.

À minha grande amiga Natália Carine, por estar ao meu lado nessa jornada desde o começo lá na histologia, ao longo desses anos pude ver teu amadurecimento e viver isso junto de ti. Vi tu passar de uma menina ingênua e cheia de inseguranças para uma mulher forte e segura de si. Te amo, não apesar dos teus defeitos, mas por causa deles, tu é uma das pessoas com o coração mais puro e bondoso que eu já conheci e que sempre me fez rir com teu humor ácido que poucos entenderiam. Sou muito grato por ser teu amigo e espero poder continuar presente nessa nova jornada que tu inicia.

As duas pessoas maravilhosas que foram chegando na minha vida aos pouquinhos e que quando vi não conseguia mais viver sem elas. A primeira delas meu cristal lapidado Mairla Colins, obrigado por compartilhar comigo nossas longas tardes sozinhos no laboratório ouvindo tuas playlists que aprendi a gostar. Obrigado pelo companheirismo, pelos conselhos ou mesmo pelos “esmurros emocionais” que tu me dá as vezes, quando necessário, eu agradeço a Deus sempre por ter te colocado na minha vida. A outra pessoa mais que especial que passou a fazer parte da minha vida foi Emily Caroline, que com seu jeito incrível de ser sempre alegre o meu dia, mesmo tu falando alto ou viver reclamando da vida, sempre quando estou perto de ti sinto um quentinho no coração que não consigo explicar, tu é um exemplo de pessoa e pesquisadora e um orgulho pra mim. Obrigada meninas, por fazerem parte da minha vida. Amo vocês demais.

Ao meu mais que amigo, confidente, companheiro, ao meu anjo que Deus colocou nesse mundo ao meu lado, Gustavo Henrique, tu és a pessoa mais leal e com o coração mais puro e bondoso que conheci na vida, por trás desse menino de gênio forte e muitas vezes difícil de lidar, tem alguém sensível e extremamente forte que enfrentou coisas que eu nunca seria capaz de enfrentar. Ao teu lado passei pelos melhores e piores momentos da minha vida e eu só consigo ser grato por ter enfrentado todos eles junto de ti. Tu me ajudou a amadurecer, a ser mais forte, confiante, corajoso, a ser quem eu sou hoje. Obrigado por tudo meu amor, te amo meu baixinho.

Aos demais membros da minha turma 2014.1, Rafaela, Sarah, Alana, Alex, Karina, Cossi, Edna, Igor, Jesse, Nicole, Remy, Karol, Pedro, Brandon e Alisson por estarem juntos nessa jornada da biologia, seja apenas no começo ou até o final, vocês são parte de tudo isso. Ao melhor agregado que a 2014.1 poderia receber, Daniel Filho, obrigado pelos sorrisos estridentes, por

me apresentar ao mundo do *kpop* e por ser sempre carinhoso e atencioso comigo, tu é meu canceriano favorito.

Agradeço aos membros da banca que prontamente aceitaram o convite em avaliar este trabalho, à Prof. Dr. Alana das Chagas Ferreira Aguiar, à Prof. Dr. Hivana Patricia Melo Barbosa Dall'Agnol e ao mestrando Igor Vinícius Pimentel de Brito.

Ao Programa de Educação Tutorial da Biologia, em especial a Prof. Dra. Mayara Ingrid que viu potencial em mim e me aceitou como petiano, possibilitando a realização de um sonho cultivado desde o início da graduação. Aos amigos que lá fiz durante o período que fiz parte do programa: Ana Luíza, Ana Carolina, Léo, Glacyane, Greyck, Gabriela, Eulália, Thauana, Luís, Thalita e Ricardo. Fazer parte do PET foi uma das coisas mais importantes da minha graduação e sou muito grato por poder ter vivido esse período com vocês.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFMA por todo o apoio, tanto técnico quanto de pessoal, que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho. Em especial à Prof. Dra. Ilisandra Zanandrea que abriu as portas do laboratório a mim e sempre se mostrou preocupada com o desenvolvimento desse trabalho. Aos técnicos do laboratório Renata e Enielson, pela ajuda no preparo de soluções e no desenvolvimento dos experimentos. Aos demais alunos do laboratório que tive o prazer de conviver durante o período de estágio bacharelado: Lule, Nagela, Amanda, Karina, Florine, Joyce e Cícero, vocês são pessoas incríveis.

Ao Grupo de Pesquisa em Diversidade e Ecologia Microbiana da UFMA na pessoa do meu coorientador, Prof. Dr. Juliano dos Santos, muito obrigado por acreditar em mim e aceitar fazer parte dessa ideia meio desafiadora que levei para o senhor. Obrigado pelo apoio, tanto científico como pessoal, nos momentos em que duvidei do meu trabalho o senhor estava lá para mostrar o lado positivo das coisas. Aos demais membros do grupo: Raiza, Núrzia e em especial a Lucas por ter compartilhado, junto de mim, os desesperos, medos e alegrias do processo de monografia, tu vai longe cara.

Ao Laboratório de Estudos sobre Orquídeas, na pessoa do meu orientador, Prof. Dr. Alessandro Wagner Coelho Ferreira, por ter me aceitado fazer parte desse grupo de pesquisas desde seu início, por ter sido mais que um orientador, mas um pai científico pra mim, sou muito grato pelos conselhos e puxões de orelha que o senhor me deu ao longo desses 3 anos em que estivemos juntos. Aos meus colegas de laboratório: Letícia, Débora, Wagner, Andressa e em especial Maycon, que muito mais de um colega se tornou um grande amigo com o qual pude

desabafar os medos, angústias e fazer planos para a vida, tanto acadêmica quanto pessoal, muito obrigado pela tua amizade e por estar sempre aqui quando precisei.

Ao Laboratório de Histologia da UFMA, em especial à Prof. Dra. Mellaine Lawal que primeiro acreditou em mim e deu oportunidade de um aluno de segundo período já iniciar na pesquisa, obrigado por essa oportunidade. Ao Msc Tiago Teófilo pela contribuição durante o desenvolvimento do trabalho de iniciação científica e pelas tardes de aprendizado e conversas no laboratório, ali aprendi coisas que irei levar para o resto da minha vida acadêmica. Muito obrigado por tudo.

Ao Laboratório de estudo sobre Abelhas da UFMA, em especial à Prof. Dr. Patrícia Albuquerque por permitir o uso dos equipamentos do laboratório para a captação das imagens das sementes e ao Msc. Denilson Martins por ter me auxiliado nesse processo.

Ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal da Universidade de São Paulo, por ter me acolhido durante o período de estágio que lá fiz, à Prof. Dr. Helenice Mercier por aceitar que eu acompanhasse as pesquisas desenvolvidas em seu laboratório e ter dado todo apoio nesse processo. À Dr. Ana Zangirolame que me ensinou muitas coisas durante o estágio e ao mestrando Marcos Marquesi, pela amizade desenvolvida nesses dois meses que estivemos juntos na USP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA, pela concessão de fomento e bolsas de estágio que possibilitaram a realização desse trabalho.

Enfim, à todos que, de alguma forma, contribuíram com o fato de eu poder estar finalizando essa etapa na minha vida sou eternamente grato e desculpem-me caso tenha esquecido alguém.

*It's always darkest before the dawn*

Shake it out – Florence and the Machine

## SUMÁRIO

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	14
1.1 Família Orchidaceae .....	14
1.2 Fungos Micorrízicos associados às orquídeas .....	17
1.3 Cultivo in vitro de orquídeas .....	20
2. OBJETIVOS .....	22
2.1 Geral .....	22
2.2 Específicos .....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23
Cultivo simbiótico in vitro de <i>Trichocentrum cebolleta</i> e <i>Galeandra blanchetii</i> (Orchidaceae Juss.) .....	29
Resumo .....	29
Introdução .....	30
Material e Métodos .....	31
Resultados .....	33
Discussão .....	35
Agradecimentos .....	39
Referências bibliográficas .....	39
Legendas das figuras e tabelas .....	42
Documentos Suplementares .....	43

# 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 1.1 Família Orchidaceae

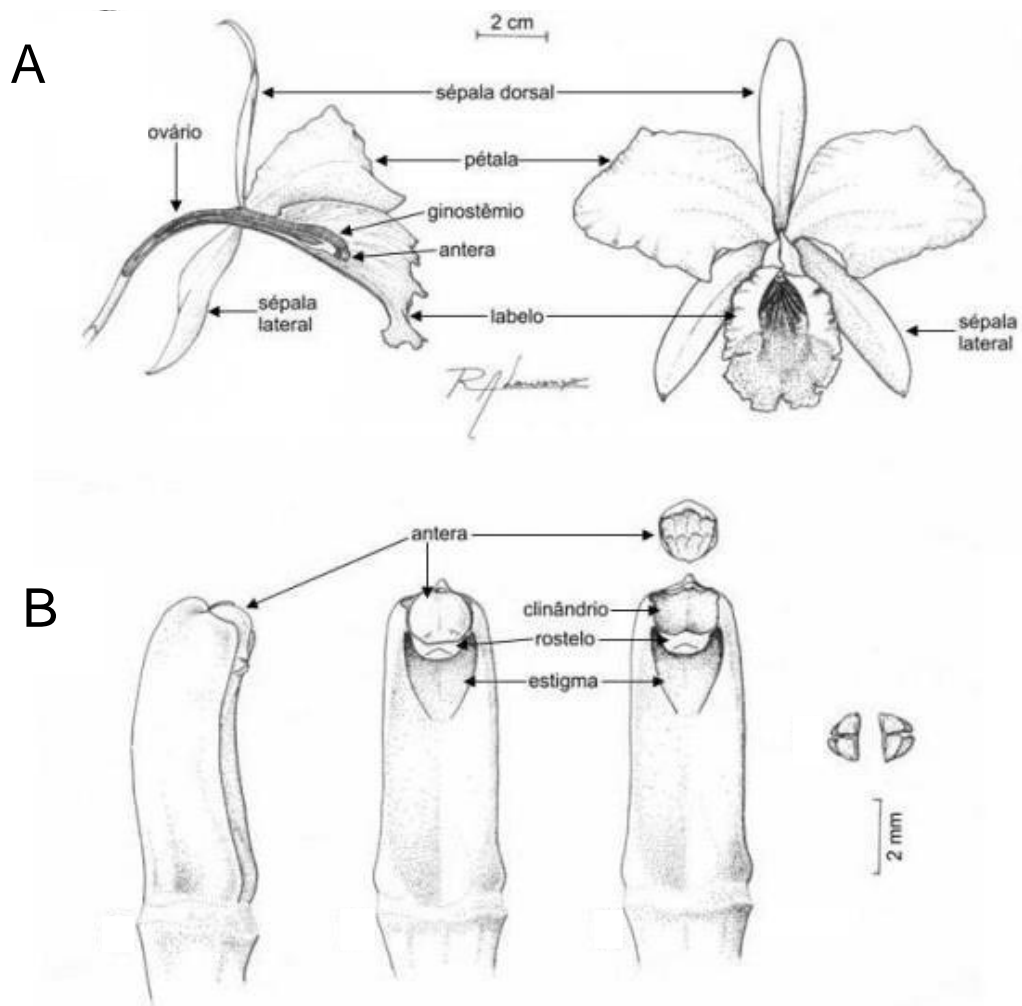
A família Orchidaceae Juss. está compreendida dentro da ordem Asparagales e da classe Liliopsida (APG IV, 2016). Devido à grande quantidade de gêneros e espécies descritas a cada ano é difícil a definição exata do número de representantes dessa família, entretanto, em revisões mais recentes, estima-se que Orchidaceae possua cerca de 28.000 espécies, as quais estão distribuídas em 736 gêneros, sendo considerada a família com maior quantidade de representantes dentro das Angiospermas (CHASE *et al.*, 2015; CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016).

A família Orchidaceae possui uma ampla distribuição pelo globo, podendo ser encontrada em todos os continentes, exceto nos polos, e nos mais diversos habitats, como as florestas tropicais, tundras semiárticas e regiões desérticas, em altitudes variando de 4500m até o nível do mar (PEREIRA; RIBEIRO, 2004). A família apresenta maior diversidade de espécies e gêneros nas regiões tropicais do mundo, especialmente nos trópicos americanos e do Sudeste Asiático, destacando-se as regiões mais úmidas e montanhosas (JUNCÁ, 2005).

Os indivíduos pertencentes à família Orchidaceae apresentam grande diversidade em ambas as características vegetativas e reprodutivas sendo que algumas delas são caracteres diagnósticos para diferenciar as Orchidaceae das demais monocotiledôneas (DRESSLER, 1983). São elas: o posicionamento dos estames em apenas um lado da flor; presença de estames e pistilos fundidos, parcial ou completamente, formando estrutura denominada gimnostêmio ou coluna; presença de forte zigomorfia das flores, seja pela redução ou supressão de estames ou pela presença de pétala diferenciada, conhecida como labelo (Figura 1) (RUDALL; BATEMAN, 2002).

As orquídeas podem apresentar diferentes tipos de hábitos, como epifítico, rupícola (predominantes nos trópicos), terrícola (comum em zonas temperadas) e algumas espécies são micoheterotróficas, as quais não realizam fotossíntese e nutrem-se a partir da degradação de substratos por fungos saprotróficos e/ou micorrízicos a elas associadas (JULOU *et al.*, 2005; TATARENKO, 2007). Apresentam dois padrões de crescimento: monopodial, com crescimento axial em um único eixo e simpodial, com crescimento lateral (CAMPOS, 2008).

Possuem folhas simples, geralmente apicioladas, com venação paralela, filotaxia alterna dística, em raros casos espiralada, podendo variar desde coriáceas a membranosas e carnosas. As inflorescências das orquídeas são geralmente do tipo racemo, as flores são zigomorfas e trímeras (PRIDGEON *et al.*, 1999). Existe uma tendência evolutiva em Orchidaceae de compactação do pólen em estruturas aglutinadas denominadas políneas, sendo que os indivíduos das subfamílias mais derivadas apresentam uma maior complexidade nessas estruturas que possuem papel importante na polinização (DRESSLER, 1990).



**Figura 1.** Estruturas morfológicas da flor de *Cattleya sp.* (Orchidaceae), em A visão lateral e frontal evidenciando as principais estruturas presentes na flor de uma orquídeia, em B detalhes do ginostêmio. Adaptado de (BARBERO, 2007)

As orquídeas possuem raízes fasciculadas secundárias que emergem do caule, na maioria das plantas as raízes apresentam uma camada externa de células mortas com parede celular espessa, denominada velame, que possui função principal de absorção de água e nutrientes (JOCA *et al.*, 2017; ROTH-NEBELSICK; HAUBER; KONRAD, 2017).

O caule das orquídeas possui estrutura semelhante ao das demais monocotiledôneas, com tecido vascular disperso em diversos feixes envoltos por tecido parenquimático. Pode apresentar intumescimento, formando estruturas denominadas pseudobulbos, as quais tem função de reserva, principalmente de água (DRESSLER, 1993).

O Brasil possui uma grande diversidade de orquídeas, cerca de 2.548 espécies, dentre as quais 1.636 são endêmicas, distribuídas em 235 gêneros, correspondendo a 12% da flora orquidológica mundial (BARROS *et al.*, 2015; GIULIETTI *et al.*, 2005; ZAPPI *et al.*, 2015). As espécies da família Orchidaceae podem ser encontrados naturalmente em todos os biomas brasileiros, entretanto a maior diversidade está na Mata Atlântica, onde são encontradas 791 espécies endêmicas (STEHMANN *et al.*, 2009).

Para o estado do Maranhão o principal trabalho de levantamento da família Orchidaceae é o de Silva *et al* (1999) no qual foram identificados 103 diferentes espécies pertencentes a essa família. Entretanto, esse número foi atualizado através da publicação de novos registros para o estado como os de Ferreira *et al* (2017). Atualmente, são registradas 120 espécies de orquídeas no Maranhão, distribuídas em 52 gêneros e encontradas nas diferentes fitofisionomias do estado (FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2019).

Devido ao grande número de espécies e à diversidade a estas associada, a recuperação de hipóteses filogenéticas robustas para a família Orchidaceae têm sido um desafio. A classificação tradicional das orquídeas se baseava no uso de caracteres morfológicos, sendo os mais relevantes a formação do gimnostêmio e o número de anteras (CHASE, 2005). Com base nesses e outros caracteres morfológicos foi possível a distinção de 5 subfamílias pertencentes à Orchidaceae (DRESSLER, 1993). Entretanto, diversas incertezas em relação ao posicionamento de alguns grupos e espécies dentro da família não foram possíveis de serem resolvidas (CHASE, 2005).

O advento do uso de dados moleculares para a resolução de perguntas filogenéticas possibilitou o surgimento de diversos trabalhos que buscaram entender melhor as relações entre as orquídeas (CAMERON, 2004; CAMERON *et al.*, 1999; CHASE *et al.*, 1994, 2003). Esses trabalhos corroboram a hipótese de Orchidaceae como um clado monofilético e subdividido em 5 subfamílias, sendo elas: Apostasioideae, Vanilloideae, Cypripedioideae, Orchidoideae e Epidendroideae (CHASE, 2005; CHASE *et al.*, 2015).

*Galeandra blanchetii* E.S.Rand e *Trichocentrum cebolleta* M.W.Chase & N.H.Williams são espécies de orquídeas nativas do Brasil, sendo a primeira delas endêmica do país. São



encontradas em todas as regiões do país, exceto a Sul, distribuídas em diferentes domínios fitogeográficos, como Amazônia, Caatinga e Cerrado, especialmente em vegetação de floresta estacional decidual em matas de Cerradão (FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2019).

Os indivíduos de *G. blanchetii* são ervas epífitas, com caules em forma de pseudobulbos, inflorescências do tipo racemo composto, as flores possuem sépalas e pétalas verde-amareladas e labelo vistoso, trilobado, branco com bordas vináceas (Imagem 2<sup>a</sup>) (MONTEIRO, 2007). *Trichocentrum cebolleta* é uma espécie de orquídea de hábito epifítico e forma de vida erva, com pseudobulbos reduzidos em largura, alongados e cilíndricos, inflorescências do tipo racemo e flores compostas por sépalas e pétalas de coloração amarela com máculas marrons e com o labelo trilobado (Imagem 2B) (MENEGUZZO, 2019). Essas características contribuem para o uso ornamental dessas orquídeas implicando na importância do estudo do processo de germinação de suas sementes e o processo de desenvolvimento dessas plantas.



**Figura 2.** Flores de *Galeandra blanchetii* (A) e *Trichocentrum cebolleta* (B). Autores das imagens: Fábio de Barros e L.F. Varella. Disponíveis em: <[http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Galeandra\\_blanchetii](http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Galeandra_blanchetii)> e <[http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Trichocentrum\\_ceboletta](http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Trichocentrum_ceboletta)>.

## 1.2 Fungos Micorrízicos associados às orquídeas

A grande maioria das orquídeas produz frutos em formato de cápsulas os quais apresentam sementes muito pequenas (DRESSLER, 1993). Variando no tamanho entre 0,05 à 6,0 mm, devido a essa característica as sementes das orquídeas não possuem endosperma e o embrião encontra-se reduzido a apenas algumas células, além de possuírem uma camada

externa reticular de células delgadas (BARTHLOTT; GROSSE-VELDMANN; KOROTKOVA, 2014).

Uma das estratégias evolutivas encontradas nesse grupo, a qual possibilita uma maior probabilidade de germinação, é o investimento na produção de um grande número de sementes por fruto, variando de centenas a milhões de sementes. Graças ao tamanho reduzido das sementes e a presença de testa reticular que propicia grande superfície de contato com o ar, a dispersão das mesmas é anemocórica na grande maioria dos indivíduos, com alguns casos relatados de zoocoria e hidrocoria (ARDITTI; GHANI, 2013).

Devido à falta de endosperma e outras reservas de nutrientes, a não ser pequenas gotas de lipídeos encontradas associadas ao embrião, as sementes de orquídeas necessitam de uma fonte externa inicial de energia para o desenvolvimento do embrião, a qual é provida através da associação de fungos micorrízicos, os quais degradam a matéria orgânica presente no substrato ao qual está fixado e propiciam nutrição às sementes até que atinjam o estágio de protocórmio no qual fazem fotossíntese (ARDITTI, 1992; OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002).

As espécies pertencentes à família Orchidaceae possuem estritas relações com fungos micorrízicos, principalmente durante os estágios iniciais de seu desenvolvimento, nos quais as orquídeas se utilizam da fonte energética fornecida pela digestão de hifas formadas intracelularmente em estruturas conhecidas como pelotóns, consistindo um estágio micoheterotrófico no seu ciclo de vida (PEREIRA *et al.*, 2005<sup>a</sup>).

A simbiose fungo-orquídea tem início quando a semente da planta entra em contato com um substrato contendo o fungo específico adequado a sua interação. O processo de germinação tem início quando o fungo penetra a testa da semente e alcança o embrião (RASMUSSEN, 1995). As hifas infectam as células corticais formando os pelotóns, que são digeridos pelas células da orquídeas possibilitando a absorção dos carboidratos presentes no fungo (ATHIPUNYAKOM; MANOCH; PILUEK, 2004).

Esse tipo de nutrição também é denominada micoheterotrofismo e pode ser encontrada em outras famílias de monocotiledôneas e dicotiledôneas, tais como: Burmanniaceae, Corsiaceae, Lacandoniaceae, Petrosaviaceae e Triuridaceae, Ericaceae, Polygalaceae e Gentianaceae (LEAKE, 1994; MCKENDRICK *et al.*, 2000).

Entretanto, esse tipo de relação ecológica é notavelmente importante para a família Orchidaceae, na qual todas as espécies necessitam dessas associações para seu desenvolvimento

inicial, sendo que algumas espécies de orquídeas terrícolas são aclorofiladas e continuam parasitando constantemente as micorrizas (RASMUSSEN, 2002). Essas associações tem um impacto direto no desenvolvimento da planta, sendo um fator limitante para sua germinação e crescimento até o estágio de plântula (RASMUSSEN, 2002).

As micorrizas das orquídeas são visualmente semelhantes às micorrizas arbusculares e são caracterizadas histologicamente como endomicorrizas devido ao desenvolvimento dos pelotóns dentro de células parenquimatosas vivas nas raízes e rizomas em estreita ligação com o plasmalema da planta invaginada (RASMUSSEN; RASMUSSEN, 2009).

A diversidade de fungos associados às orquídeas sejam eles saprotróficos, ectomicorrízicos ou parasitas está compreendida no grupo dos basidiomicetos em cinco principais subgrupos: os Heterobasidiomycetes, Hericianae, Hymenocetanae, Thelephoranae e Agaricanae (RASMUSSEN, 2002)

A maior parte desses fungos são identificados como rizoctonióides ou fungos semelhantes a *Rhizoctonia* DC., muito conhecidos por sua importância econômica, pois diversas espécies podem causar fitopatologias em plantas cultiváveis, tanto alimentícias quanto ornamentais. Algumas outras espécies são saprotróficas ou endofíticas, como as que realizam interações com as orquídeas (SNEH *et al.*, 2013).

Os fungos rizoctonióides são caracterizados por possuírem ramificação das hifas em ângulo de 90°, constrição no ponto de ramificação e um septo na hifa ramificada, próximo ao seu ponto de origem (OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002). Frequentemente possuem cadeias de hifas infladas, chamadas de células monilioides. Outra característica importante desses fungos é que é extremamente raro a observação do estágio sexual e a formação de esporos (NONTACHAIYAPOOM; SASIRAT; MANOCH, 2010).

Além disso podem ser caracterizados a partir do número de núcleos presentes em células jovens, sendo observadas células uni, bi e multinucleadas. Outro caráter morfológico que é utilizado na distinção entre os diferentes gêneros são os chamados grupos de anastomose, identificados pelo fato de que dois fungos pertencentes ao mesmo grupo tem suas hifas fundidas quando entram em contato umas com as outras (NONTACHAIYAPOOM; SASIRAT; MANOCH, 2010).

Os fungos rizoctonióides associados a orquídeas pertencem principalmente aos gêneros *Cerathoriza* R.T.Moore, *Epulorhiza* R.T.Moore e *Rhizoctonia* DC (PEREIRA *et al.*, 2011).

Vários dos fungos endofíticos rizoctonióides de orquídeas são saprófitos e crescem em madeira em decomposição (RASMUSSEN, 2002). As rizoctonias associadas a orquídeas produzem uma série de enzimas, tais como as degradadoras de carboidratos e lignina, que permitem a decomposição do substrato ao qual estão aderidos (RASMUSSEN, 1995).

Diversos trabalhos vem demonstrado as associações existentes entre orquídeas e fungos micorrízicos e suas especificidades. Dentre estes, podemos citar os trabalhos de Otero *et al* (2002), Bayman *et al* (1997), Herrera *et al* (2017), Valadares *et al* (2012), entre outros, os quais fazem levantamentos dos fungos micorrízicos presentes em diferentes espécies de orquídeas em vários habitats, sendo que alguns desses fungos apresentam forma de vida conhecida apenas em associações com essas plantas, demonstrando a intrínseca relação entre esses dois grupos de organismos.

Além desses, vale ressaltar os trabalhos que, além de realizarem os levantamentos dos fungos associados a orquídeas, buscam utilizá-los no cultivo simbiótico *in vitro* das mesmas, tais como os de Pereira (2005b), (SWANGMANEECHARERN; SERIVICHYASWAT; NONTACHAIYAPOOM, 2012) e (NONTACHAIYAPOOM; SASIRAT; MANOCH, 2011). Esses estudos avaliaram a eficácia desses fungos na germinação de sementes de orquídeas, principalmente em comparação com formulações de meios de cultura amplamente utilizados para o cultivo assimbiótico dessas plantas e demonstraram a eficácia de diversos desses fungos no desenvolvimento de sementes de orquídeas, apresentando taxas de germinação iguais ou superiores às observadas em meios de cultivo assimbióticos de formulação científica.

### **1.3 Cultivo in vitro de orquídeas**

O hábito de cultivar orquídeas é bastante antigo, com relatos encontrados em inscritos chineses de mais de 2000 anos a.C, sendo que o auge dessa prática teve início a partir do século XIX. Nessa época era realizado o cultivo de orquídeas adultas retiradas de seus habitats, as quais tinham germinado naturalmente, pois métodos para a germinação das sementes dessas plantas eram considerados impraticáveis (HEW, 2001).

A existência de germinação em orquídeas permaneceu desconhecida até o início do século XIX, quando Salisbury (1804) evidenciou a germinação de sementes de três espécies de orquídeas. Entretanto, o mecanismo envolvido na germinação não fora explicado. Apenas quando Noel Bernard, em 1909, publicou o primeiro trabalho científico que demonstrou serem

fungos micorrízicos os responsáveis pela germinação das sementes de Orchidaceae elucidou-se esse mecanismo (ARDITTI, 1992).

Com base no crescente número de estudos relacionando os fungos micorrízicos associados às orquídeas e em seus próprios estudos sobre a influência de carboidratos no desenvolvimento de plantas, o botânico americano Lewis Knudson, em 1922, desenvolveu pela primeira vez um meio de cultura para germinação assimbiótica, constituído unicamente de sais minerais, açúcar e ágar, no qual inoculou sementes oriundas de plantas dos gêneros *Cattleya* Lindl., *Laelia* Lindl. E *Epidendrum* L (ARDITTI, 1967, 2009).

Após os trabalhos de Knudson, surgiram diversas formulações de meios de cultura para orquídeas, dentre elas destacam-se as de Vacin&Went(1949) e Murashige & Skooge (1962). Além desses, diversos outros meios de cultura compostos por formulações mais simples e baratas, utilizando-se fertilizantes químicos e adição de frutas, foram propostos como alternativas para os meios tradicionais, os quais exigem uma grande quantidade de reagentes e custos mais elevados (FARIA *et al.*, 2012).

Embora a propagação *in vitro* das orquídeas esteja sendo feita há muitas décadas, existem grandes diferenças nas exigências de cada espécie (ARDITTI, 1967, 1984; REGO-OLIVEIRA *et al.*, 2003; STANCATO; FARIA, 1996; TAKAHASHI; OGIWARA; HAKODA, 2000; ZETTLER; SUNLEY; DELANEY, 2000). Assim, ainda é necessário estabelecer os melhores meios e condições de cultura para a maior parte delas. Essa carência é especialmente latente quando se trata de espécies sem interesse econômico (ARDITTI, 2009).

A formulação de Murashige e Skooge (MS) (MURASHIGE & SKOOGGE, 1969) continua sendo o meio assimbiótico utilizado para o cultivo *in vitro* da maioria das espécies de orquídeas e diversas outras espécies vegetais. Seu uso é feito tanto para a germinação e crescimento a partir de sementes, quanto para a clonagem de orquídeas a partir de protocómos. Os componentes básicos do meio MS são divididos em macronutrientes, micronutrientes, FEDTA e vitaminas. Entre os macronutrientes estão o nitrato de amônio e nitrato de potássio, os quais tem sua compra e armazenamento controlados pelo exército brasileiro, o que dificulta a utilização desses meios para o cultivo de orquídeas (FARIA *et al.*, 2012).

Existem também os meios de cultivo simbióticos, nos quais utilizam-se culturas de fungos micorrízicos previamente isolados de orquídeas para a germinação de sementes dessas plantas (PEREIRA *et al.*, 2005b, 2005<sup>a</sup>). Diversos trabalhos vêm demonstrando a eficiência desse método no cultivo *in vitro* de orquídeas, principalmente nas espécies que não conseguem

germinar nos meios de cultura convencionais (BUSTAM; DIXON; BUNN, 2014; PEREIRA *et al.*, 2011, 2005b; SWANGMANEECHARERN; SERIVICHYASWAT; NONTACHAIYAPOOM, 2012).

Essa estratégia primeiramente requer o devido isolamento de fungos eficazes para o cultivo e o estudo da especificidade de determinadas espécies de orquídeas em relação aos fungos micorrízicos para o estabelecimento de protocolos para o cultivo simbióticos *in vitro* dessas espécies (PEREIRA *et al.*, 2005b). Dessa forma, o conhecimento dos fungos micorrízicos associados às raízes de orquídeas e a análise do seu potencial uso para a propagação simbiótica dessas espécies é importante para conservação e manejo dessas plantas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

- Isolar e caracterizar fungos micorrízicos rizoctonioides das raízes de duas espécies de orquídeas nativas, *Trichocentrum cebolleta* M.W.Chase & N.H.Williams e *Galeandra blanchetii* E.S. Rand., e analisar a eficiência desses isolados na germinação simbiótica *in vitro* dessas espécies;

### **2.2 Específicos**

- Isolar fungos endofíticos das raízes de *Trichocentrum cebolleta* e *Galeandra blanchetii*;
- Realizar a triagem dos isolados fúngicos isolados;
- Caracterizar morfologicamente os isolados fúngicos rizoctonióides;
- Inocular as sementes das duas espécies de orquídeas em meios assimióticos e simbióticos;
- Avaliar a eficiências dos isolados fúngicos na germinação e desenvolvimento dos protocórmios das duas espécies de orquídeas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APG IV - Angiosperm Phylogeny Group IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1–20, 2016.
- ARDITTI, J. Factors affecting the germination of orchid seeds. **The Botanical Review**, v. 33, n. 1, p. 1–97, 1967.
- ARDITTI, J. Physiology of germinating orchid seeds. **Orchid biology: reviews and perspectives**, v. 3, 1984.
- ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. [s.l.] John Wiley & Sons, 1992.
- ARDITTI, J. **Micropropagation of orchids**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2009.
- ARDITTI, J.; GHANI, A. K. A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications (vol 145, pg 367, 2000). 2013.
- ATHIPUNYAKOM, P.; MANOCH, L.; PILUEK, C. Isolation and identification of mycorrhizal fungi from eleven terrestrial orchids. **Kasetsart J (Nat Sci)**, v. 38, p. 216–228, 2004.
- BARBERO, A. P. P. Flora da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil): Orchidaceae–Subtribo Laeliinae. **Dissertação de Mestrado, Instituto de**, 2007.
- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. **Orchidaceae** in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>.
- BARTHLOTT, W.; GROSSE-VELDMANN, B.; KOROTKOVA, N. Orchid seed diversity. **Englera**, v. 32, p. 1–245, 2014.
- BAYMAN, P.; LEBRON, L. L.; TREMBLAY, R. L.; LODGE, D. J. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). **The New Phytologist**, v. 135, n. 1, p. 143–149, 1997.
- BUSTAM, B. M.; DIXON, K. W.; BUNN, E. In vitro propagation of temperate Australian terrestrial orchids: revisiting asymbiotic compared with symbiotic germination. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 176, n. 4, p. 556–566, 2014.
- CAMERON, K. M.; CHASE, M. W.; WHITTEN, W. M.; KORES, P. J.; JARRELL, D.

- C.;ALBERT, V. A.; GOLDMAN, D. H. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from rbcL nucleotide sequences. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 2, p. 208–224, 1999.
- CAMERON, K. M. Utility of plastid psaB gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 31, n. 3, p. 1157–1180, 2004.
- CAMPOS, F. A. D. B. Considerações sobre a Família Orquidacea: taxonomia, antropismo, valor econômico e tecnologia. **Mundo saúde (Impr.)**, v. 32, n. 3, p. 383–392, 2008.
- CHASE, M., CAMERON; W. K. M.; HILLS, H. G.; JARRELL, D. **DNA sequences and phylogenetics of the Orchidaceae and other lilioid monocots**. Proc. 14th World Orchid Conf. **Anais...1994**
- CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; BARRETT, R. L.; FREUDENSTEIN, J. V. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. **Orchid conservation**, v. 69, p. 89, 2003.
- CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M., Salazar, G., VAN DEN BERG, C., SCHUITEMAN, A. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical journal of the Linnean Society**, v. 177, n. 2, p. 151-174, 2015.
- CHASE, M. W. Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. **Curtis's Botanical Magazine**, v. 22, n. 1, p. 2–7, 2005.
- CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201–217, 2016.
- DA SILVA, M. F. F.; DA SILVA, J. B. F.; FEILER, J. M. Checklist of Orchidaceae from state of Maranhão, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 29, n. 3, p. 381, 1999.
- DRESSLER, R. L. Classification of the Orchidaceae and their probable origin. **Telopea**, 1983.
- DRESSLER, R. L. **The orchids: natural history and classification**. [s.l.: s.n.].
- DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. [s.l.] Cambridge University Press, 1993.
- FARIA, R. T.;ASSIS, A. D.;UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. Produção de orquídeas em laboratório. **Londrina: Mecenas**, 2012.
- FERREIRA, A. W. C.; DE OLIVEIRA, M. S.; SILVA, E. O.; CAMPOS, D. S.; PANSARIN, E. R.; GUARÇONI, E. A. E. *Vanilla bahiana* Hoehne and *Vanilla pompona* Schiede



(Orchidaceae, Vanilloideae): two new records from Maranhão state, Brazil. **Check List**, v. 13, p. 1131, 2017.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, F. 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em:< <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em, 31/05/2019.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; DE QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. D. G. L.; VAN DEN BERG, C. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 632–639, 2005.

HERRERA, H.; VALADARES, R.; CONTRERAS, D.; BASHAN, Y.; ARRIAGADA, C. Mycorrhizal compatibility and symbiotic seed germination of orchids from the Coastal Range and Andes in south central Chile. **Mycorrhiza**, v. 27, n. 3, p. 175–188, 2017.

HEW, C. S. Ancient Chinese orchid cultivation: a fresh look at an age-old practice. **Scientia Horticulturae**, v. 87, n. 1–2, p. 1–10, 2001.

JOCA, T. A. C.; DE OLIVEIRA, D. C.; ZOTZ, G.; WINKLER, U.; MOREIRA, A. S. F. P. The velamen of epiphytic orchids: variation in structure and correlations with nutrient absorption. **Flora**, v. 230, p. 66–74, 2017.

JULOU, T.; BURGHARDT, B.; GEBAUER, G.; BERVEILLER, D.; DAMESIN, C.; SELOSSE, M. A. Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. **New Phytologist**, v. 166, n. 2, p. 639–653, 2005.

JUNCA, F. A. **Biodiversidade e conservação da Chapada Diamantina**. [s.l.] Ministério do Meio Ambiente, 2005.

KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical gazette**, v. 73, n. 1, p. 1-25, 1922.

LEAKE, J. R. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. **New Phytologist**, v. 127, n. 2, p. 171–216, 1994.

MCKENDRICK, S. L.; LEAKE, J. R.; TAYLOR, D. L.; READ, D. J. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. **The New Phytologist**, v. 145, n. 3, p. 523–537, 2000.

Meneguzzo, T.E.C. **Trichocentrum in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB582479>>. Acesso em: 06 Jun. 2019

MONTEIRO, S. H. N. **Revisão taxonômica e filogenia do gênero Galeandra Lindl. (Orchidaceae: Catasetinae)**. 2007. Tese de Doutorado. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 178p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NONTACHAIYAPOOM, S.; SASIRAT, S.; MANOCH, L. Isolation and identification of Rhizoctonia-like fungi from roots of three orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium*, and *Cymbidium*, collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces of Thailand. **Mycorrhiza**, v. 20, n. 7, p. 459–471, 2010.

NONTACHAIYAPOOM, S.; SASIRAT, S.; MANOCH, L. Symbiotic seed germination of *Grammatophyllum speciosum* Blume and *Dendrobium draconis* Rchb. f., native orchids of Thailand. **Scientia horticultrae**, v. 130, n. 1, p. 303–308, 2011.

OTERO, J. T.; ACKERMAN, J. D.; BAYMAN, P. Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 11, p. 1852–1858, 2002.

PEREIRA, M. C.; TORRES, D. P., GUIMARÃES, F. A. R., PEREIRA, O. L., KASUYA, M. C. M. Seed germination and protocorm development of *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) in association with *Epulorhiza* mycorrhizal fungi. **Acta Botanica Brasílica**, v. 25, n. 3, p. 534–541, 2011.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; ROLLEMBERG, C. D. L.; BORGES, G. M. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 2, p. 191–197, 2005a.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; ROLLEMBERG, C. D. L.; BORGES, A. C. Indução in vitro da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 2, p. 199–206, 2005b.

PEREIRA, U. Z.; RIBEIRO, L. F. Caracterização de comunidades de Orchidaceae em fragmentos de Floresta Ombrófila Densa Montana, em diferentes estágios de regeneração em Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**, v. 2, n. 2, p. 52–60, 2004.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. **Genera Orchidacearum Vol. 1 General Introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae**. Oxford University Press, Oxford, , 1999.

RASMUSSEN, H. N. **Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant**. [s.l.] Cambridge University Press, 1995.

RASMUSSEN, H. N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. **Plant and soil**, v. 244, n. 1–2, p. 149–163, 2002.

RASMUSSEN, H. N.; RASMUSSEN, F. N. Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. **Oikos**, v. 118, n. 3, p. 334–345, 2009.

REGO-OLIVEIRA, L. V; FARIA, R. T.; FONSECA, I. C. B.; SACONATO, C. H. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento in vitro de *Oncidium varicosum* Lindl.(Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 2, p. 265–272, 2003.

ROTH-NEBELSICK, A.; HAUBER, F.; KONRAD, W. The Velamen Radicum of Orchids: A Special Porous Structure for Water Absorption and Gas Exchange. In: **Functional Surfaces in Biology III**. [s.l.] Springer, 2017. p. 107–120.

RUDALL, P. J.; BATEMAN, R. M. Roles of synorganisation, zygomorphy and heterotopy in floral evolution: the gynostemium and labellum of orchids and other lilioid monocots. **Biological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 403–441, 2002.

SALISBURY, R. A. II. On the Germination of the Seeds of Orchideæ. **Transactions of the Linnean Society of London**, v. 7, n. 1, p. 29–32, 1804.

SNEH, B; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S. M.; DIJST, G. **Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2013.

STANCATO, G. C.; FARIA, R. T. In vitro growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem.(Orchidaceae) I: Effects of macro and microelements. **LINDLEYANA-WEST PALM BEACH-**, v. 11, p. 41–43, 1996.

STEHMANN, J. R. **Plantas da floresta Atlântica**. [s.l.] Jardim Botânico do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, 2009. v. 1

SWANGMANEECHARERN, P.; SERIVICHYASWAT, P.; NONTACHAIYAPOOM, S. Promoting effect of orchid mycorrhizal fungi Epulorhiza isolates on seed germination of Dendrobium orchids. **Scientia horticultrae**, v. 148, p. 55–58, 2012.

TAKAHASHI, K.; OGIWARA, I.; HAKODA, N. Seed germination of Habenaria (pecteilis) radiata (Orchidaceae: Orchideae) in vitro. **Lindleyana**, v. 15, n. 1, p. 59–63, 2000.

TATARENKO, I. V. Growth habits of temperate terrestrial orchids. **MEMOIRS-NEW YORK BOTANICAL GARDEN**, v. 95, p. 91, 2007.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, n. 4, p. 605–613, 1949.

VALADARES, R. B.; PEREIRA, M. C.; OTERO, J. T.; CARDOSO, E. J. Narrow fungal mycorrhizal diversity in a population of the orchid Coppinsia doniana. **Biotropica**, v. 44, n. 1, p. 114–122, 2012.

ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C.; WALTER, B. M.; PIRANI, J. R.; FORZZA, R. C. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.

ZETTLER, L. W.; SUNLEY, J. A.; DELANEY, T. W. Symbiotic seed germination of an orchid in decline (*Platanthera integra*) from the Green Swamp, North Carolina. **Castanea**, p. 207–212, 2000.

# 1 Cultivo simbiótico in vitro de *Trichocentrum cebolleta* e *Galeandra blanchetii* (Orchidaceae Juss.)

2 Autores: Ítalo Vinícius Cantanhêde Santos<sup>1</sup>, Juliano dos Santos<sup>2</sup> e Alessandro Wagner Coelho Ferreira<sup>1</sup>

3 E-mail para correspondência: italo-vini@hotmail.com

## 4 Resumo

5 Para germinar na natureza, as sementes de orquídeas dependem de fungos micorrízicos para fornecer  
6 carboidratos, vitaminas e fatores de crescimento para a germinação de suas sementes. O uso de fungos para  
7 o a germinação *in vitro* de espécies de orquídeas pode ser uma alternativa aos meios de cultivo assimbiótico  
8 tradicionais. Esse trabalho isolou fungos endofíticos das raízes de duas espécies de orquídeas nativas  
9 brasileiras *Trichocentrum cebolleta* M.W.Chase & N.H.Williams e *Galeandra blanchetii* E.S. Rand., sendo  
10 22 e 24 morfotipos fúngicos respectivamente, dos quais foram identificados dois isolados rizoctonióides  
11 advindos um de cada espécie de orquídea, os quais foram utilizados em ensaios de germinação constituindo  
12 meios simbióticos em comparação com a formulação assimbiótica de Murashige & Skoog (MS). Observou-  
13 se germinação de *T. ceboletta* no meio MS, atingindo o estágio 3 de desenvolvimento, enquanto em ambos  
14 os meios simbióticos as sementes desenvolveram-se até o estágio 1 de germinação, o que pode ser explicado  
15 pela não compatibilidade entre as espécies de orquídeas e os isolados fúngicos utilizados nos ensaios. Não  
16 foi observada germinação de *G. blanchetii* em nenhum dos tratamentos que pode ter acontecido devido  
17 inviabilidade das sementes ou da necessidade da quebra de dormência das mesmas.

18 **Palavras-chave:** Orquídeas, fungos micorrízicos, germinação.

## 19 Abstract

20 The use of fungi for the *in vitro* germination of orchid species may be an alternative to traditional  
21 assymbiotic media. This work isolated endophytic fungi from the roots of two native brazilian orchid  
22 species *Trichocentrum cebolleta* M.W.Chase & N.H. Williams and *Galeandra blanchetii* E.S. Rand, with  
23 22 and 24 fungal morphotypes, respectively, of which two Rhizoctonia-like isolates from the two orchid  
24 species were identified, which were used in germination trials constituting symbiotic medium in  
25 comparison to the Murashige & Skoog (MS). Germination of *T. ceboletta* was observed in the MS medium,  
26 reaching stage 3 of development, while in both symbiotic means the seeds developed until stage 1 of  
27 germination, which can be explained by the non-compatibility between the species of orchids and the fungal  
28 isolates used in the assays. No germination of *G. blanchetii* was observed in any of the treatments that could  
29 have happened because of the non-viability of the seeds or the need of the dormancy breaking of the seeds.

30 **Key words:** Orchids, mycorrhizal fungi, germination

1 – Laboratório de Estudos sobre Orquídeas, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão. Av. dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, São Luís – MA, Brasil

2 – Grupo de Pesquisa em Diversidade e Ecologia Microbiana - Coordenação do Curso de Licenciaturas em Ciências Naturais Pinheiro/CCHNST. Estrada de Pacas, Enseada, Pinheiro – MA, Brasil.

## 31 **Introdução**

32 Orchidaceae Juss., possui uma grande diversidade, com estimativas de 28.000 espécies distribuídas em 736  
33 gêneros, sendo considerada a maior família botânica dentre as angiospermas (Chase *et al.* 2015;  
34 Christenhusz & Byng 2016). O Brasil é responsável por grande parte dessa diversidade, possuindo 2548  
35 espécies distribuídas em 235 gêneros, sendo que 1636 dessas espécies são endêmicas (Barros *et al.* 2015;  
36 Giulietti *et al.* 2005).

37 Como resultado de processo adaptativo para a anemocoria (Arditti & Ghani 2013), as orquídeas produzem  
38 frutos com sementes muito diminutas, variando entre 0,05 e 6,0 mm de comprimento, as quais são  
39 produzidas em taxas de milhares a milhões por fruto (Barthlott; Grosse-Veldmann; Korotkova 2014).

40 Entretanto, essa vantagem observada na dispersão é contrabalanceada no processo de germinação. Devido  
41 ao investimento dessas plantas na produção de muitas sementes por fruto ocorreu, ao longo da evolução  
42 desse grupo, a perda de estruturas de reserva nutritiva associadas. As sementes de orquídeas não possuem  
43 endosperma e são basicamente constituídas por um embrião central, formado por poucas células, envolto  
44 por uma testa reticular delgada e leve que auxilia no processo de dispersão da semente (Dressler 1993).

45 Sendo assim, na natureza as sementes das orquídeas necessitam de associações simbióticas com fungos  
46 micorrízicos para poderem germinar. Esses fungos degradam a matéria orgânica presente no substrato e  
47 provém nutrientes para o desenvolvimento inicial do embrião das sementes, compreendendo um estágio  
48 micoheterotrófico do desenvolvimento dessas plantas (Rasmussen & Rasmussen 2009). A maior parte da  
49 diversidade de fungos micorrízicos associados à germinação de sementes de orquídeas são identificados  
50 como rizoctonióides ou fungos semelhantes a *Rhizoctonia*, geralmente pertencentes aos gêneros  
51 *Cerathoriza* R.T.Moore, *Epulorhiza* R.T.Moore e *Rhizoctonia* DC (Sneh *et al.* 2013).

52 Com o intuito de possibilitar a germinação de sementes de orquídeas sem a presença de fungos micorrízicos,  
53 foram desenvolvidas diversas formulações de meios de cultura assimbióticos, dentre as quais destacam-se  
54 as de Knudson (1922) e Murashige & Skoog (1962). Esses meios de cultura são constituídos pela mistura  
55 de diversos sais compreendendo macro e micronutrientes, além de um aporte de carboidrato, vitaminas e,  
56 em alguns casos, hormônios vegetais (Arditti 2009; Faria *et al.* 2012).

57 Entretanto, orquídeas cultivadas por esse processo possuem taxas de sobrevivência muito pequenas ao  
58 serem transferidas aos seus habitats naturais e requerem um processo de aclimação (Pereira *et al.* 2005).  
59 Algumas espécies de orquídeas apresentam germinação lenta e em baixos percentuais ao serem inoculadas  
60 nesses meios assimbióticos, fazendo com que surja a necessidade do desenvolvimento de alternativas para  
61 o cultivo dessas plantas, principalmente no caso das espécies nativas que não possuem interesse comercial  
62 e/ou sofrem ameaça de extinção (Bustam *et al.* 2014).

63 Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi isolar fungos micorrízicos de raízes de duas espécies de  
64 orquídeas nativas do Maranhão, *Trichocentrum cebolleta* M.W.Chase & N.H.Williams e *Galeandra*  
65 *blanchetii* E.S. Rand., analisando a eficiência na germinação simbiótica *in vitro* das sementes dessas  
66 plantas.

## 67 **Material e Métodos**

68 Os experimentos foram realizados no Laboratório de Estudos sobre Orquídeas e no Laboratório de  
69 Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão no Campus Dom  
70 Delgado entre os meses de janeiro e junho de 2019.

## 71 **Material vegetal**

72 Foram estudadas duas espécies de orquídeas nativas do Maranhão: *Trichocentrum cebolleta* e *Galeandra*  
73 *blanchetii*. Foram coletados cinco indivíduos de cada espécie de orquídea, advindos de duas populações  
74 naturais distintas na Ilha de São Luís, Maranhão: (2°31'44.7"S 44°17'43.5"W – *T. cebolleta*, 2°33'24.1"S  
75 44°18'28.7"W – *G. blanchetii*). Cinco plantas de cada espécie foram cultivadas em casa de vegetação da  
76 Universidade Federal do Maranhão, em vasos plásticos contendo como substrato uma mistura meio a meio  
77 de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart., Arecaceae) e casca de pinus (*Pinus* sp., Pinaceae). Quando  
78 floresceram em cultivo, as flores das duas espécies foram autopolinizadas e os frutos capsulares  
79 monitorados até próximo de seu amadurecimento (fase em que a porção apical do fruto começa a ficar  
80 amarelada). Com base no período de amadurecimento dos 5 frutos de cada espécie, foi calculado o tempo  
81 médio de maturação. Em laboratório, os frutos maduros e indecíduos foram retirados das plantas. Em  
82 seguida, as sementes foram coletadas e armazenadas em envelopes de papel absorvente que ficaram dentro  
83 de potes plásticos em refrigerador, sob temperatura de 4 °C durante 2 meses até a inoculação nos meios de  
84 cultura.

## 85 **Isolamento dos fungos**

86 Para o isolamento dos fungos endofíticos das duas espécies de orquídeas, foram coletados cinco pedaços  
87 de raízes jovens e íntegras de cada um dos cinco vasos de *G. blanchetii* e dos cinco vasos de *T. cebolleta*  
88 em cultivo. Em seguida, esses pedaços de raízes foram lavados em água corrente para retirada de detritos e  
89 partes do substrato ao qual estavam fixados. Em câmara de fluxo laminar, as raízes passaram por processo  
90 de desinfestação superficial que consistiu de lavagem em etanol 70% durante 1 minuto, seguida de  
91 hipoclorito de sódio a 20% (0,5 de cloro ativado) e 5 lavagens consecutivas em água destilada e autoclavada.  
92 Em seguida, ainda no fluxo laminar, as raízes foram cortadas com auxílio de bisturi estéril em fragmentos  
93 de aproximadamente 0,5 cm e distribuídas em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose  
94 Ágar (BDA) Merck Milipore (39g/L) previamente autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Foram  
95 inoculados 5 fragmentos de raiz por placa, sendo 4 placas por espécime totalizando 20 placas por espécie.

96 As placas contendo as raízes foram mantidas em temperatura ambiente (25 °C + ou – 3 °C) na presença de  
97 luz durante uma semana propiciando o crescimento dos fungos no meio de cultura.

### 98 **Caracterização dos isolados fúngicos**

99 Os fungos isolados dos fragmentos foram triados a partir de observação de características morfológicas. Os  
100 morfotipos foram separados em duas categorias: fungos endofíticos e os endofíticos potencialmente  
101 micorrízicos a partir da observação da taxa de crescimento e características morfológicas como coloração  
102 da colônia, tamanho da colônia e principalmente pela presença ou ausência de células conidiogênicas, já os  
103 fungos rizoctonioides, por sua vez, foram separados de acordo com outras características, sendo elas:  
104 coloração das hifas, ramificação das hifas em ângulo de 90°, constrição da hifa na altura do septo, presença  
105 ou ausência de grampos de conexão e células monilíoides (Currah *et al* 1997; Pereira 2001; Pereira *et al*  
106 2005).

### 107 **Inoculação das sementes**

108 Em câmara de fluxo laminar, aproximadamente 200 mg de sementes pesadas com auxílio de balança de  
109 precisão, foram desinfestadas superficialmente através de lavagem em solução de hipoclorito de sódio a  
110 20% (~0,5% de cloro ativo) durante 10 minutos sob agitação constante. Em seguida, foram feitas 3 lavagens  
111 com água destilada autoclavada e as sementes desinfestadas foram mantidas em 10 ml de água destilada.

112 Em seguida, com o auxílio de micropipetador, 400 µL da suspensão de água e sementes foi inoculada em  
113 cada uma das cinco placas de Petri contendo 20 ml dos meios utilizados para os ensaios de germinação por  
114 tratamento, sendo eles: Murashige & Skoog (MS) (1962) modificado (metade das concentração de macro  
115 nutrientes, sem a adição de glicina e pH ~5,6) como descrito em Faria *et al* (2012); e meio simbiótico,  
116 consistindo de meio ágar aveia (60 gL<sup>-1</sup> de aveia em flocos, 15 gL<sup>-1</sup> de ágar) inoculado com um dos fungos  
117 previamente isolados, através da colocação de dois discos de 10 mm, retirados das bordas de colônias  
118 isoladas em meio BDA, nas extremidades das placas contendo o meio ágar-aveia; e o meio ágar-aveiasem  
119 inoculação dos fungos, ambos descritos em Pereira *et al* (2011).

120 O experimento de germinação de sementes de orquídeas foi conduzido em delineamento inteiramente  
121 casualizado em esquema fatorial com duas espécies de orquídeas e dois isolados fúngicos, Tc5.4 e Gb5.2,  
122 isolados das raízes de *T. cebolleta* e *G. blanchetii* respectivamente. Foram realizadas 5 replicatas para cada  
123 um dos tratamentos. O meio Murashige & Skoog foi utilizado como controle positivo e o meio ágar-aveia  
124 sem a inoculação dos fungos foi considerado como controle negativo.

125 As placas foram levadas para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C no escuro por uma semana.  
126 Após esse período, foram expostas à luminosidade de aproximadamente 35µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16  
127 horas de luz em temperatura média de 25 °C durante um período de 2 meses.

### 128 **Avaliação da germinação**



129 Com auxílio de microscópio estereoscópio modelo Zeiss Discovery.V8, pelo menos 100 sementes foram  
130 observadas em cada replicata e a elas atribuídos números de acordo com o estágio de germinação, como  
131 descrito em Bustam *et al* (2014), sendo eles: 0: semente não embebida; 1: semente embebida com testa  
132 fissurada; 2: germinação e desenvolvimento dos tricomas; 3: alargamento do protocórmio; 4: maior  
133 alargamento do protocórmio com primeira folha verde; 5: plântula com folha verde e iniciação de raízes.

134134

### 135 **Análise dos dados**

136 A porcentagem de germinação para cada espécie foi calculada dividindo-se o número de espécies  
137 consideradas germinadas pela quantidade de sementes com embrião em cada replicata. O índice de  
138 germinação a partir dos estágios de desenvolvimento para cada tratamento foi calculada utilizando a  
139 fórmula:

$$140 \quad [(0 \times a) + (1 \times b) + (2 \times c) + (3 \times d) + (4 \times e) + (5 \times f)] / 100,$$

141

142 Onde *a, b, c, d, e e f* correspondem, respectivamente, a porcentagem de sementes ou protocórmios nos  
143 estágios 0, 1, 2, 3, 4 e 5. Os dados foram testados quanto a sua normalidade através do teste de Shapiro-  
144 Wilk no software Past versão 3.25. A comparação entre as médias dos estágios de desenvolvimento para  
145 os diferentes tratamentos será realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA) bilateral seguido por  
146 pós teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas no programa R versão 3.5.3.

147147

### 148 **Resultados**

149 Foram isolados 22 morfotipos fúngicos das raízes de *T. ceboletta*, apresentando um percentual de  
150 crescimento de fungos por fragmento de raiz maior de 90%, com crescimento de fungos em todas as 20  
151 placas preparadas para essa espécie (Figura 1-A). Dos 22 morfotipos de fungos isolados, 15 foram  
152 classificados como endofíticos e 7 como endofíticos potencialmente micorrízicos. Desses, apenas o isolado  
153 identificado como Tc5.4 apresentou características suficientes para ser considerado um fungo rizoctonioide  
154 (Tabela 1).

155 Já em *G. blanchetii* observou-se crescimento de fungos em todos os fragmentos de raízes inoculados, sendo  
156 isolados 24 morfotipos fúngicos, dos quais 18 foram classificados como endofíticos e 6 como  
157 potencialmente micorrízicos, sendo o isolado Gb5.2 considerado rizoctonioide a partir das características  
158 morfológicas observadas (Tabela 1).

159 Ambos os isolados Tc5.4 e Gb5.2 apresentaram hifas com ramificação em ângulo de 90°, constrição da hifa  
160 na altura do septo e presença de células monilíoides (Figura 2). Em crescimento em meio BDA, o isolado

161 Tc5.4 apresentou coloração creme, com micélio aéreo abundante de aspecto aveludado (Figura 1-A). Já o  
162 isolado Gb 5.2 apresentou coloração branco-amarronzada com regiões amareladas, também com micélio  
163 aéreo abundante e de aspecto aveludado (Figura 1-B).

164 Todos os indivíduos de ambas as espécies de orquídeas formaram frutos após a autopolinização das flores,  
165 demorando em média 45 dias para a maturação em *T. ceboletta* e 140 dias em *G. blanchetii*. Os frutos  
166 apresentaram sementes completas com embriões íntegros e bem formados. As sementes de *T. ceboletta*  
167 eram muito diminutas apresentando comprimento médio de 0,08mm, enquanto as de *G. blanchetii* eram  
168 significativamente maiores, com 0,2mm de comprimento.

169 As sementes de *T. ceboletta* apresentaram germinação no meio Murashige & Skoog com metade da  
170 concentração de macronutrientes, alcançando o estágio 3 de germinação, com a presença de protocórmios  
171 de coloração verde, alargados e com tricomas bem formados (Figura 3-B). Para as sementes dessa espécie  
172 inoculadas no meio MS o processo de germinação teve início a partir da segunda semana do ensaio, quando  
173 as primeiras sementes alcançaram o estágio 1 de germinação caracterizado pela absorção de água pelas  
174 sementes e rompimento da testa reticular. Após 1 mês de germinação foram observadas a formação dos  
175 primeiros protocórmios, de coloração verde e formato arredondado, caracterizando a germinação dessas  
176 plantas no estágio 2 (Figura 4-A). Apenas após 6 semanas observou-se a presença de protocórmios no  
177 estágio 3 de germinação (Figura 4-B).

178 As sementes de *T. ceboletta* inoculadas em ambos os meios simbióticos apresentaram desenvolvimento até  
179 o estágio 1 de germinação (Figura 5), sendo que em média mais de 80% das sementes embeberam e houve  
180 alargamento do embrião, entretanto as sementes desse tratamento não prosseguiram o seu  
181 desenvolvimento para outros estágios de germinação. Não houve observação de germinação de sementes  
182 inoculadas no meio aveia sem a presença de fungos micorrízicos.

183 Já para *G. blanchetii* as sementes não apresentaram germinação significativa em nenhum dos tratamentos  
184 nas quais foram inoculadas após os dois meses do ensaio de germinação (Figura 3-A).

185 Com base nos valores dos índices de germinação nos diferentes tratamentos o teste de Shapiro-Wilk indicou  
186 a normalidade dos dados ( $p=0,385$ ). A ANOVA indicou a presença de diferenças significativas entre os  
187 diferentes tratamentos e as duas espécies de orquídeas ( $p<0,05$ ) quanto aos índices de germinação. Para *T.*  
188 *ceboletta*, o pós teste de Tukey evidenciou que houve diferenças significativas nos índices de germinação  
189 entre os diferentes tratamentos, sendo o meio MS mais eficiente no desenvolvimento das sementes dessa  
190 espécie.

191 Ambos os meios simbióticos, com os isolados fúngicos Tc5.4 e Gb5.2, apresentaram índices de germinação  
192 significativamente maiores que o controle negativo e menores que o MS, entretanto não apresentaram  
193 diferenças estatisticamente significativas entre si (Figura 6-A).

194 Em *G. blanchetii* todos os 4 tratamentos apresentaram índices de germinação muito baixos e sem diferenças  
195 estatisticamente significativas entre os mesmos (Figura 6-B).

## 196 **Discussão**

197 Ambas as espécies de orquídeas estudadas são nativas do Brasil e encontradas especialmente em vegetação  
198 de Cerrado (Flora do Brasil 2020 2019). Esse domínio fitogeográfico que vem sofrendo com o aumento da  
199 degradação da cobertura vegetal nativa, principalmente em decorrência das atividades do agronegócio  
200 (Hunke 2015). Por conseguinte as espécies de orquídeas presentes nessas áreas são diretamente afetadas,  
201 devido ao seu ciclo de vida longo e específico dependente de relações específicas com outras espécies,  
202 desde a germinação, no caso dos fungos micorrízicos, até o desenvolvimento completo da planta, pela  
203 dependência de forófitos específicos, no caso das epífitas (Silva 2017). Dessa forma, o conhecimento dos  
204 fungos micorrízicos associados às raízes de orquídeas e seu uso para a propagação simbiótica dessas  
205 espécies é importante para conservação e manejo dessas plantas.

206 Grande parte dos fungos rizoctonióides associados à orquídeas são saprotróficos e observados em madeiras  
207 e folhas em decomposição, esses fungos produzem enzimas tais como as degradadoras de lignina e  
208 carboidratos que possibilitam a decomposição do substrato orgânico (Rasmussen 2002; Sneh *et al.* 2013).  
209 Quando entram em contato com as sementes de orquídeas, esses fungos formam estruturas enoveladas  
210 internas denominadas pelotóns, os quais são degradados pelas orquídeas e fornecem aporte energético  
211 inicial para o desenvolvimento dessas plantas (Athipunyakom; Manoch; Piluek 2004). Dessa forma, a  
212 associação micorrízica com um fungo compatível é um fator que controla a distribuição de orquídeas em  
213 seus habitats naturais (Rasmussen & Rasmussen 2009)

214 A maior parte da diversidade de fungos micorrízicos associados à orquídeas, que participam do processo  
215 de germinação, são Basidiomicetos identificados como rizoctonioides ou fungos semelhantes a  
216 *Rhizoctonia*, geralmente pertencentes aos gêneros *Cerathoriza*, *Epulorhiza* e *Rhizoctonia* (Pereira *et al*  
217 2011). Esses fungos são caracterizados por possuírem ramificação das hifas em ângulo de 90°, constrição  
218 no ponto de ramificação e um septo na hifa ramificada, próximo ao seu ponto de origem. Além disso, os  
219 fungos pertencentes a esse grupo raramente apresentam estágio sexual e conidiogênese na fase assexuada  
220 (McCormick 2016).

221 Os isolados TC5.4 e Gb5.2 utilizados nos ensaios de germinação apresentaram tais estruturas e dessa forma  
222 podem ser considerados como rizoctonióides. Entretanto, não foi possível a identificação dos isolados a  
223 níveis taxonômicos inferiores, os quais requerem análises mais específicas como as da condição nuclear  
224 das hifas, ação de enzimas como a polifenol oxidase e também a análise da formação de anastomose de  
225 hifas com isolados padrões, previamente conhecidos (Pereira *et al* 2011). Entretanto, a caracterização  
226 desses isolados e a comprovação da indução do início da germinação em *T. ceboletta* corroboram a  
227 identificação dos mesmos como rizoctonióides.

228 A diversidade de fungos endofíticos associados à orquídeas não se resume apenas às micorrizas formadas  
229 por basidiomicetos. Uma grande diversidade de espécies de ascomicetos e fungos imperfeitos são  
230 encontrados associadas a essas plantas (Rasmussen 2002). Como observado no presente trabalho que  
231 encontrou 15 morfotipos de endofíticos não micorrízicos em raízes de *T. ceboletta* e 18 em *G. blanchetti*.  
232 Na maioria dos estudos sobre micorrizas de orquídeas os não basidiomicetos não são evidenciados,  
233 entretanto, esses microrganismos estão envolvidos em uma ampla gama de absorção de nutrientes e podem  
234 influenciar positivamente o desenvolvimento das plantas as quais estão associados, apontando para a  
235 necessidade de maiores estudos com esses fungos (Rasmussen & Rasmussen 2009).

236 Tradicionalmente, a maioria dos trabalhos envolvendo o estudo de fungos micorrízicos de orquídeas são  
237 focados em espécies terrícolas especialmente de regiões temperadas, a citar os trabalhos de Zelmer (1996)  
238 e McCormick (2004), os quais isolaram e identificaram fungos de orquídeas terrícolas norte americanas,  
239 nas quais foram encontradas grande diversidade de fungos rizoctnioides, especialmente dos gêneros  
240 *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* e *Moniliopsis* para as orquídeas estadunidenses e do gênero *Tuslanella* em  
241 orquídeas canadenses.

242 Também são encontrados trabalhos relacionados ao estudo da diversidade de fungos micorrízicos de  
243 orquídeas terrícolas tropicais na Ásia e Oceania. Athipunyakom *et al* (2004) relataram a identificação de  
244 dezenas de espécies fúngicas de orquídeas tailandesas, além dos gêneros de fungos rizoctonióides,  
245 usualmente encontrados, foram observados basidiomicetos não rizoctonióides pertencentes ao gêneros  
246 *Waitea* e *Sistotrema*. Bonnardeaux *et al* (2007) estudaram a interação entre fungos isolados de raízes de 12  
247 espécies de orquídeas do sudeste africano e da Austrália a partir de redes de interações evidenciando forte  
248 presença de fungos do gênero *Epulorhiza* nessas espécies.

249 O conhecimento acerca dos fungos endomicorrízicos de orquídeas epífitas tropicais ainda é incipiente,  
250 entretanto alguns trabalhos vem identificando fungos dessa plantas, como o de Pereira (2005) que isolou e  
251 identificou 7 espécies de fungos provenientes de 7 espécies de orquídeas nativas da floresta Atlântica, os  
252 quais pertenceram aos gêneros *Epulorhiza* e *Rhizoctonia* identificados através de características  
253 morfológicas e marcadores moleculares. Em outro trabalho desenvolvido pelos mesmos autores (Pereira *et*  
254 *al* 2005) três isolados de fungos micorrízicos rizoctonióides foram obtidos do sistema radicular de três  
255 espécies de orquídeas neotropicais, *Gomesa crispa*, *Campylocentrum organense* e *Bulbophyllum sp.*,  
256 pertencentes aos gêneros *Ceratorhiza* e *Rhizoctonia*.

257 A partir do conhecimento acerca da diversidade de fungos associados à orquídeas é possível o  
258 desenvolvimento de protocolos de germinação simbiótica *in vitro* e a análise da eficiência de diferentes  
259 isolados e espécies fúngicas nesse processo (Herrera 2017). Uma vez identificado os fungos mais eficientes  
260 na germinação, os mesmos podem ser utilizados em estratégia de conservação e manejo de espécies de

261 orquídeas ameaçadas de extinção, ou mesmo espécies com interesse comercial, utilizando os meios  
262 simbiótico como alternativa as formulações assimióticas de alto custo e acesso restrito (Rafter 2016)

263 Diversos pesquisadores tem avaliado a eficiência de fungos na germinação de sementes de orquídeas, tais  
264 como Nontachaiyapoom *et al* (2010) que avaliaram o efeito de 7 isolados fúngicos na germinação de duas  
265 espécies de orquídeas nativas da Tailândia grande eficiência da germinação das sementes dessas plantas até  
266 mesmo comparado com os níveis observados em meio MS. Nontachaiyapoom *et al* (2011) observou a  
267 eficiência na germinação de espécies de orquídeas com potencial ornamental pertencentes ao gênero  
268 *Dendrobium* frente a inoculação em meio simbiótico com diferentes isolados fúngicos do gênero  
269 *Epulorhiza*.

270 Análises similares também foram realizadas com sementes de orquídeas terrícolas nativas da Austrália que  
271 são ameaçadas de extinção e não apresentam boas taxas de germinação em meios assimióticos. A  
272 inoculação das sementes dessa planta em meio simbiótico com fungos isolados das próprias raízes  
273 possibilitou a germinação e desenvolvimento *in vitro* dessas plantas indicando uma provável nova estratégia  
274 para tentativas de conservação dessa espécie (Bustam *et al* 2014)

275 No Brasil, Pereira *et al* (2011) demonstrou a eficiência de 16 fungos do gênero *Epulorhiza* na germinação  
276 de sementes de *Epidendrum secundum*, orquídea nativa brasileira. Assim como Pereira (2005) avaliou a  
277 eficiência da germinação de *Oncidium flexuosum* com fungos dos gêneros *Epulorhiza*, *Ceratorhiza* e  
278 *Rizoctonia* observando altas taxas de germinação e desenvolvimento de plântulas em um período de tempo  
279 menor do que observado em meios assimióticos.

280 Os índices de germinação das sementes de *Trichocentrum ceboletta* inoculadas em meios assimióticos  
281 foram consideravelmente menores dos encontrados nos trabalhos previamente citados, bem como o  
282 desenvolvimento das sementes, as quais mantiveram-se nos estágios iniciais de germinação em contraste  
283 aos trabalhos nos quais são observados desenvolvimento completo das sementes até o estágio de plântula.  
284 Entretanto, houve significativa diferença quando comparado com o controle negativo do próprio  
285 experimento, demonstrando que os fungos tiveram influência, mesmo que pequena, na germinação dessas  
286 plantas.

287 A interação orquídea-fungo pode apresentar diferentes níveis de especificidade, com orquídeas que  
288 apresentam germinação eficiente em diferentes espécies de fungos enquanto outras dependem de interação  
289 espécie específica para o seu desenvolvimento. Sendo que a maioria das espécies de orquídeas apresentam  
290 especificidade a determinados, grupos, espécies ou isolados fúngicos (Rasmussen *et al* 2015). A infecção  
291 de fungos específicos desencadeia uma série de ciclos de replicação de DNA que culminam com a divisão  
292 do embrião seguido pela absorção da trealose, açúcar presente nas hifas fúngicas, que estimula o  
293 crescimento do protocormio (McCormick *et al* 2018)

294 Quando há incompatibilidade entre a orquídea e o fungo, a planta induz formação de compostos fenólicos  
295 nas células infectadas pelos fungos, dessa maneira, por mais que os fungos colonizem as células do embrião,  
296 os mesmos não são capazes de induzir o desenvolvimento completo da plântula até os estágios de  
297 germinação mais avançados (Roberts 2008). Isso parece ter acontecido com as sementes de *T. ceboletta*  
298 inoculadas nos meios assimbióticos, as quais permaneceram apenas no estágio 1 de germinação em  
299 contraste as germinadas em meio assimbiótico que atingiram o estágio 3.

300 Não foi observada germinação das sementes de *G. blanchetii* em nenhum dos tratamentos, nem mesmo no  
301 meio MS definido como controle positivo para o ensaio. Dessa maneira, supõem-se que a não germinação  
302 é devido a características intrínsecas das sementes, provavelmente relacionadas a dois possíveis fatores: o  
303 primeiro deles seria a necessidade de quebra de dormência e o segundo seria a inviabilidade das sementes.

304 Apesar de o mecanismo de dormência em sementes de orquídeas não ser completamente elucidado, sabe-  
305 se que algumas espécies apresentam dormência química e necessitam de fatores específicos para sua  
306 germinação, como exposição a variação de temperatura causadas por mudanças sazonais no tempo ou  
307 presença de proteínas específicas as quais podem estar presentes no substrato ao qual essas sementes são  
308 fixadas, assim como proteínas presentes nas hifas fúngicas aos quais essas orquídeas se associam (Kathpalia  
309 & Bhatla 2018).

310 O segundo fator que possivelmente influenciou na não germinação de *G. blanchetii* seria a perda da  
311 viabilidade das sementes utilizadas para os ensaios de germinação, possivelmente causada devido ao tempo  
312 entre a maturação dos frutos e a inoculação das sementes nos meios de cultivo. As sementes de orquídeas  
313 costumam manter-se viáveis até 3 meses após a retirada das mesmas dos frutos, quando armazenadas de  
314 maneira adequada, entretanto esse período pode variar de acordo com as espécies (Seaton *et al* 2018). Esse  
315 parece ser o caso de *G. blanchetii*, que mesmo tendo suas sementes armazenadas a temperatura de 4°C por  
316 apenas dois meses não apresentou germinação em nenhum dos meios.

317 A partir do desenvolvimento desse trabalho foi possível o isolamento de diversos morfotipos fúngicos de  
318 duas espécies de orquídeas epífitas nativas do estado do Maranhão, *Trichocentrum ceboletta* e *Galeandra*  
319 *blanchetii*, bem como a caracterização de um isolado fúngico rizoctonioide de cada uma das espécies. Foi  
320 possível a germinação em meio assimbiótico de sementes de *T. ceboletta* em meio assimbiótico MS e  
321 também o desenvolvimento das sementes no estágio inicial de germinação ao serem inoculadas nos meios  
322 assimbióticos. Não se observou germinação das sementes de *G. blanchetii* em nenhum dos meios utilizados  
323 nos ensaios. O presente trabalho contribui para o conhecimento tanto dos fungos micorrízicos associados a  
324 orquídeas epífitas neotropicais quanto para o entendimento do processo de desenvolvimento dessas plantas,  
325 abrindo caminho para novos trabalhos do tipo para outras espécies de orquídeas nativas e fomentando o  
326 desenvolvimento de possíveis estratégias de conservação para essas plantas.

**327 Agradecimentos**

328 A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão –  
329 FAPEMA, pela concessão de fomento e bolsas de estágio (Edital 038/2017). Ao Laboratório de Estudos  
330 sobre Abelhas e ao Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade  
331 Federal do Maranhão pelo apoio técnico ao desenvolvimento deste trabalho.

332332

**333 Referências bibliográficas**

- 334 Arditti, J. (2009). Micropropagation of orchids. John Wiley & Sons.
- 335 Arditti, J., & Ghani, A. K. A. (2013). Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological  
336 implications (vol 145, pg 367, 2000).
- 337 Athipunyakom, P., Manoch, L., & Piluek, C. (2004). Isolation and identification of mycorrhizal fungi from  
338 eleven terrestrial orchids. *Kasetsart J (Nat Sci)*, 38, 216-228..
- 339 Barros, F. D., Vinhos, F., Rodrigues, V. T., Barberena, F. F. V. A., Fraga, C. N., Pessoa, E. M., ... &  
340 Azevedo, C. O. (2015). Orchidaceae in Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de  
341 Janeiro, Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>.  
342 Acessado em, 14, 2015.
- 343 Barthlott, W., Große-Veldmann, B., & Korotkova, N. (2014). Orchid seed diversity. A scanning electron  
344 microscopy survey. Turland NJ y Rodewald M, editores. Berlin: Botanic Garden and Botanical Museum  
345 Berlin-Englera.
- 346 Bonnardeaux, Y., Brundrett, M., Batty, A., Dixon, K., Koch, J., & Sivasithamparam, K. (2007). Diversity  
347 of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and  
348 alien invasions. *Mycological Research*, 111(1), 51-61.
- 349 Bustam, B. M., Dixon, K. W., & Bunn, E. (2014). In vitro propagation of temperate Australian terrestrial  
350 orchids: revisiting asymbiotic compared with symbiotic germination. *Botanical journal of the Linnean  
351 Society*, 176(4), 556-566.
- 352 Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., Van den Berg, C., &  
353 Schuiteman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Botanical journal of the Linnean Society*,  
354 177(2), 151-174.
- 355 Christenhusz, M. J., & Byng, J. W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual  
356 increase. *Phytotaxa*, 261(3), 201-217..
- 357 Currah, R. S., Zelmer, C. D., Hambleton, S., & Richardson, K. A. (1996). Fungi from orchid mycorrhizas.  
358 In 'Orchid biology: reviews and perspectives. VII'. (Eds J Arditti, A Pridgeon) pp. 117–170.

- 359 Dressler, R. L. (1993). Phylogeny and classification of the orchid family. Cambridge University Press.
- 360 FARIA, R. D., ASSIS, A. D., Unemoto, L. K., & Carvalho, J. F. R. P. (2012). Produção de orquídeas em  
361 laboratório. Londrina: Mecenass.
- 362 Do Brasil, F. (2019). 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:<  
363 <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em, 23.
- 364 Giuliatti, A. M., Harley, R. M., De Queiroz, L. P., Wanderley, M. D. G. L., & Van Den Berg, C. (2005).  
365 Biodiversity and conservation of plants in Brazil. *Conservation Biology*, 19(3), 632-639.
- 366 Herrera, H., Valadares, R., Contreras, D., Bashan, Y., & Arriagada, C. (2017). Mycorrhizal compatibility  
367 and symbiotic seed germination of orchids from the Coastal Range and Andes in south central  
368 Chile. *Mycorrhiza*, 27(3), 175-188.
- 369 Hunke, P., Mueller, E. N., Schröder, B., & Zeilhofer, P. (2015). The Brazilian Cerrado: assessment of water  
370 and soil degradation in catchments under intensive agricultural use. *Ecohydrology*, 8(6), 1154-1180.
- 371 Kathalia, R., & Bhatla, S. C. (2018). Seed Dormancy and Germination. In *Plant Physiology, Development  
372 and Metabolism* (pp. 885-906). Springer, Singapore..
- 373 Knudson, L. (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical gazette*, 73(1), 1-25.
- 374 McCormick, M. K., Taylor, D. L., Whigham, D. F., & Burnett, R. K. (2016). Germination patterns in three  
375 terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology*, 104(3), 744-754.
- 376 McCormick, M. K., Whigham, D. F., & Canchani-Viruet, A. (2018). Mycorrhizal fungi affect orchid  
377 distribution and population dynamics. *New Phytologist*, 219(4), 1207-1215.
- 378 McCormick, M. K., Whigham, D. F., & O'Neill, J. (2004). Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial  
379 orchids. *New Phytologist*, 163(2), 425-438.
- 380 Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue  
381 cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- 382 Pereira, M. C., Torres, D. P., Guimarães, F. A. R., Pereira, O. L., & Kasuya, M. C. M. (2011). Seed  
383 germination and protocorm development of *Epidendrum secundum* Jacq.(Orchidaceae) in association with  
384 *Epulorhiza* mycorrhizal fungi. *Acta Botanica Brasilica*, 25(3), 534-541.
- 385 Pereira, O. L., Kasuya, M. C. M., Rollemberg, C. D. L., & Borges, G. M. (2005). Isolamento e identificação  
386 de fungos micorrízicos rizotonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no  
387 Brasil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29(2), 191-197.
- 388 Pereira, O. L., Kasuya, M. C. M., Rollemberg, C. D. L., & Borges, A. C. (2005). Indução in vitro da  
389 germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizotonióides.



- 390 Revista Brasileira de Ciência do Solo, 29(2), 199-206.
- 391 Pereira, O. L., Kasuya, M. C. M., Borges, A. C., & Araújo, E. F. D. (2005). Morphological and molecular  
392 characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Canadian Journal of*  
393 *Botany*, 83(1), 54-65.
- 394 Rafter, M., Yokoya, K., Schofield, E. J., Zettler, L. W., & Sarasan, V. (2016). Non-specific symbiotic  
395 germination of *Cynorkis purpurea* (Thouars) Kraezl., a habitat-specific terrestrial orchid from the Central  
396 Highlands of Madagascar. *Mycorrhiza*, 26(6), 541-552.
- 397 Rasmussen, H. N., & Rasmussen, F. N. (2009). Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life  
398 style. *Oikos*, 118(3), 334-345.
- 399 Rasmussen, H. N., Dixon, K. W., Jersáková, J., & Těšitelová, T. (2015). Germination and seedling  
400 establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of Botany*, 116(3), 391-402.
- 401 Roberts, D. L., & Dixon, K. W. (2008). Orchids. *Current Biology*, 18(8), R325-R329.
- 402 Seaton, P. T., Hosomi, S. T., Custódio, C. C., Marks, T. R., Machado-Neto, N. B., & Pritchard, H. W.  
403 (2018). Orchid Seed and Pollen: A Toolkit for Long-Term Storage, Viability Assessment and Conservation.  
404 In *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols* (pp. 71-98). Humana  
405 Press, New York, NY.
- 406 Silva, C. S., Araújo, L. G., Sousa, K. C. I., Silva, D. M., Sibov, S. T., & Faria, P. R. (2017). In vitro  
407 germination and development of the Cerrado epiphytic orchid. *Ornamental Horticulture*, 23(1), 96-100.
- 408 Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. M., & Dijst, G. (Eds.). (2013). *Rhizoctonia species: taxonomy,*  
409 *molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Springer Science & Business Media.
- 410 Zelmer, C. D., Cuthbertson, L., & Currah, R. S. (1996). Fungi associated with terrestrial orchid  
411 mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience*, 37(4), 439.

## Legendas das figuras e tabelas

**Figura 1.** A- Diversidade de morfotipos fúngicos isolados das raízes de *Trichocentrum cebolleta* M.W.Chase & N.H.Williams; B – Aspecto da colônia do isolado Tc5.4 extraído de *T. cebolleta* inoculado em meio BDA após 5 dias; C – Aspecto da colônia do isolado Gb 5.2 extraído de *Galeandra blanchetii* E.S. Rand. em meio BDA após 5 dias da inoculação.

**Figura 2.** Características microscópicas dos isolados Tc5.4 e Gb5.2. A e B – Ramificação das hifas em ângulo de 90°. C – Formação de células moniloides. D – Constrições das hifas na altura do septo.

**Figura 3.** A – Sementes de *G. blanchetii* em meio MS após dois meses de inoculação; B – Sementes e protocórmios de *T. ceboletta* em meio MS após dois meses de inoculação.

**Figura 4.** A - Sementes e protocórmios de *T. ceboletta* inoculados em meio MS após 2 meses de inoculação; B – Detalhe do protocórmio no estágio 3 de germinação.

**Figura 5.** Sementes em meios simbióticos. A – Hifas do isolados Tc5.4 infectando as sementes de *T. ceboletta*; B – Sementes de *T. ceboletta* em meios simbióticos inoculados com o isolado Gb5.2, em estágio 1 de germinação com embriões alargados (setas).

**Figura 6.** Comparação entre as médias dos índices de germinação entre os diferentes tratamentos para: A – *T. ceboletta* e B – *G. blanchetti*. Tratamentos com letras minúsculas distintas entre eles indicam diferença estatisticamente significativas de acordo com o pós teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1.** Características morfológicas dos isolados Tc5.4 e Gb5.2. BDA – Batata Dextrose Ágar; AA – Ágar-Água; MAL – Ágar Extrato de Malte; FUB – Ágar-fubá

Documentos Suplementares

Figura 1

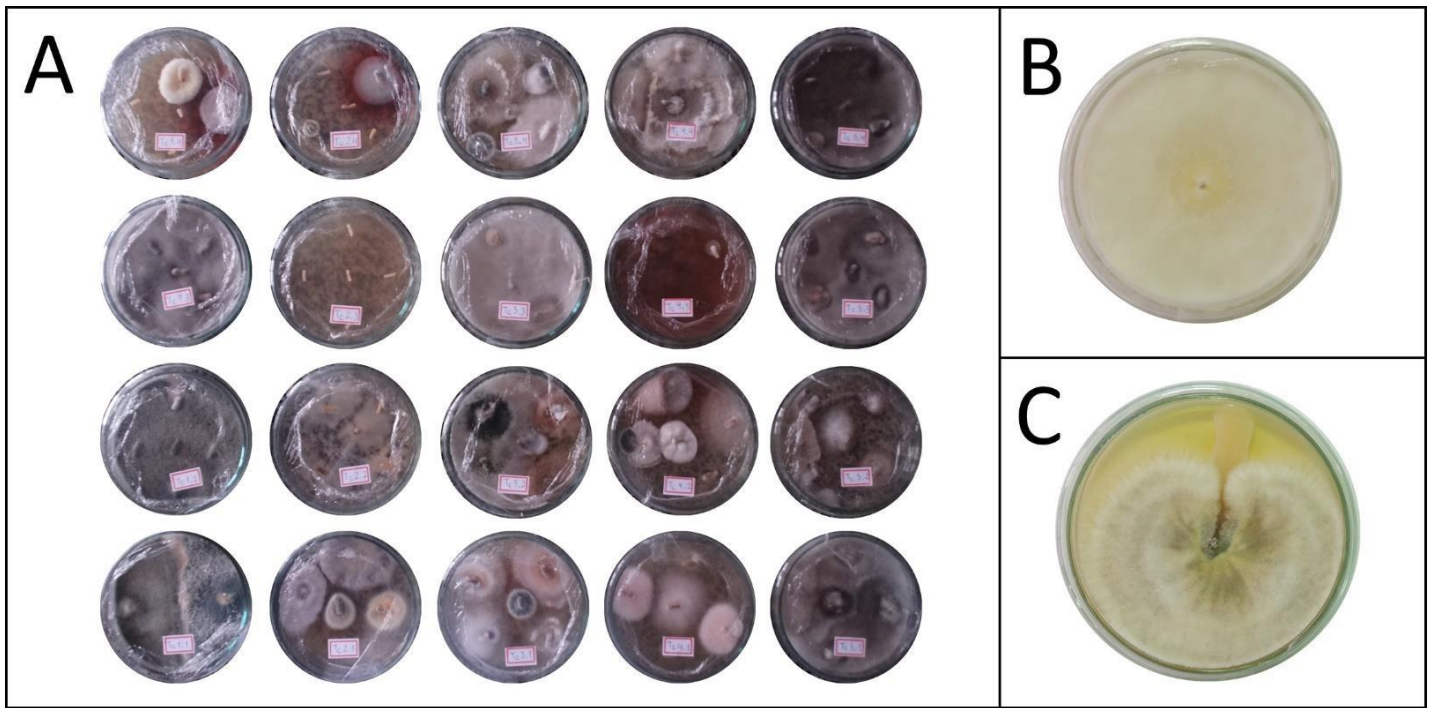
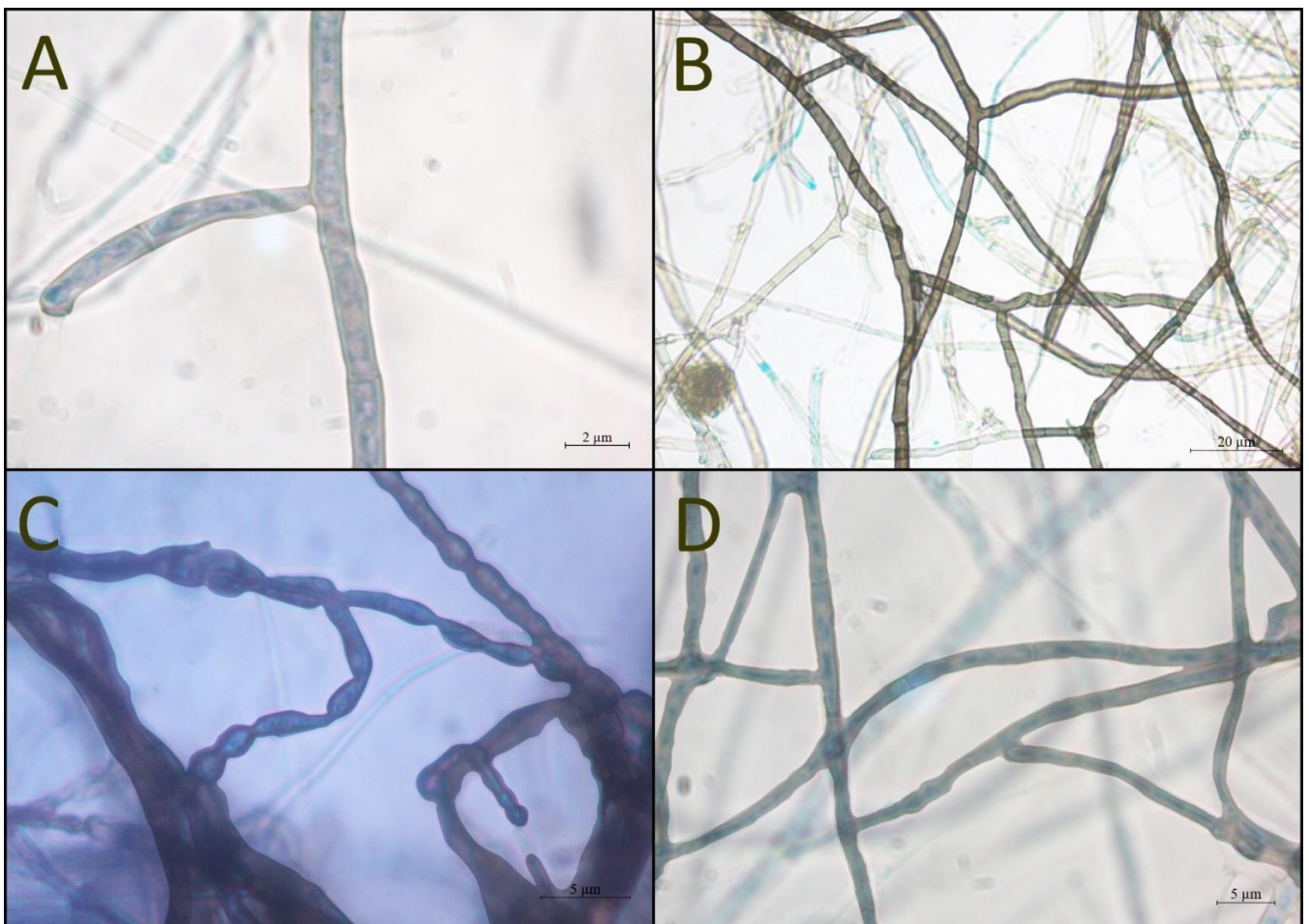
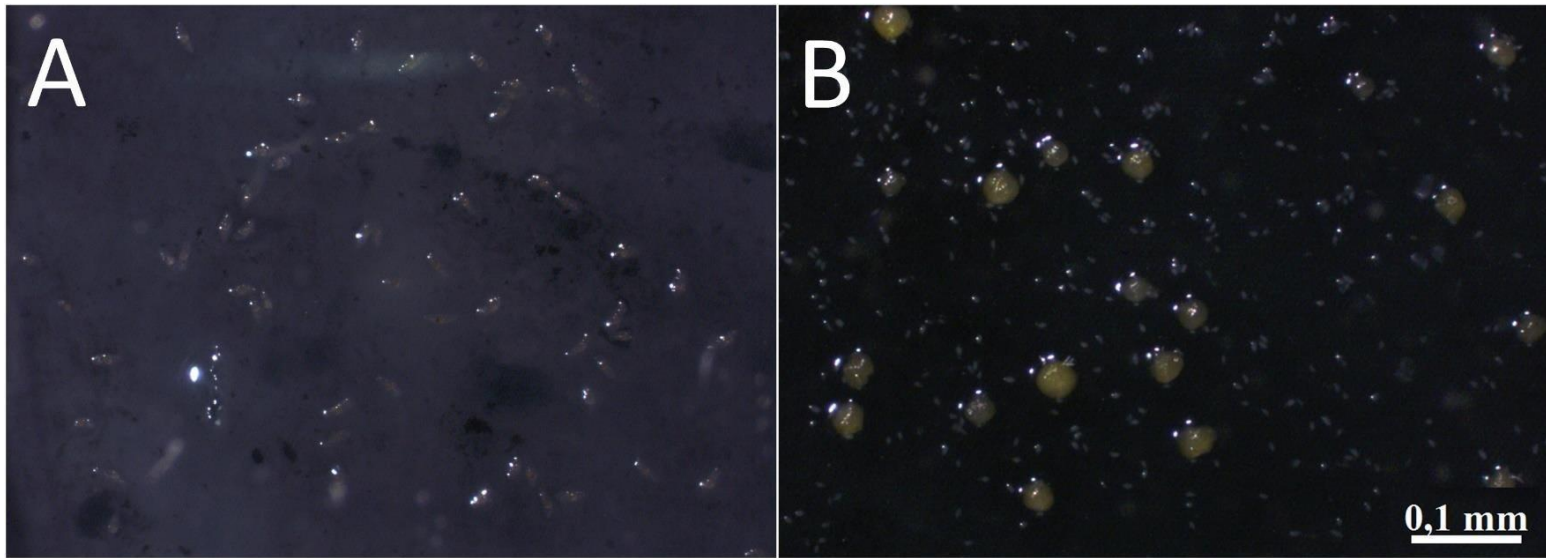


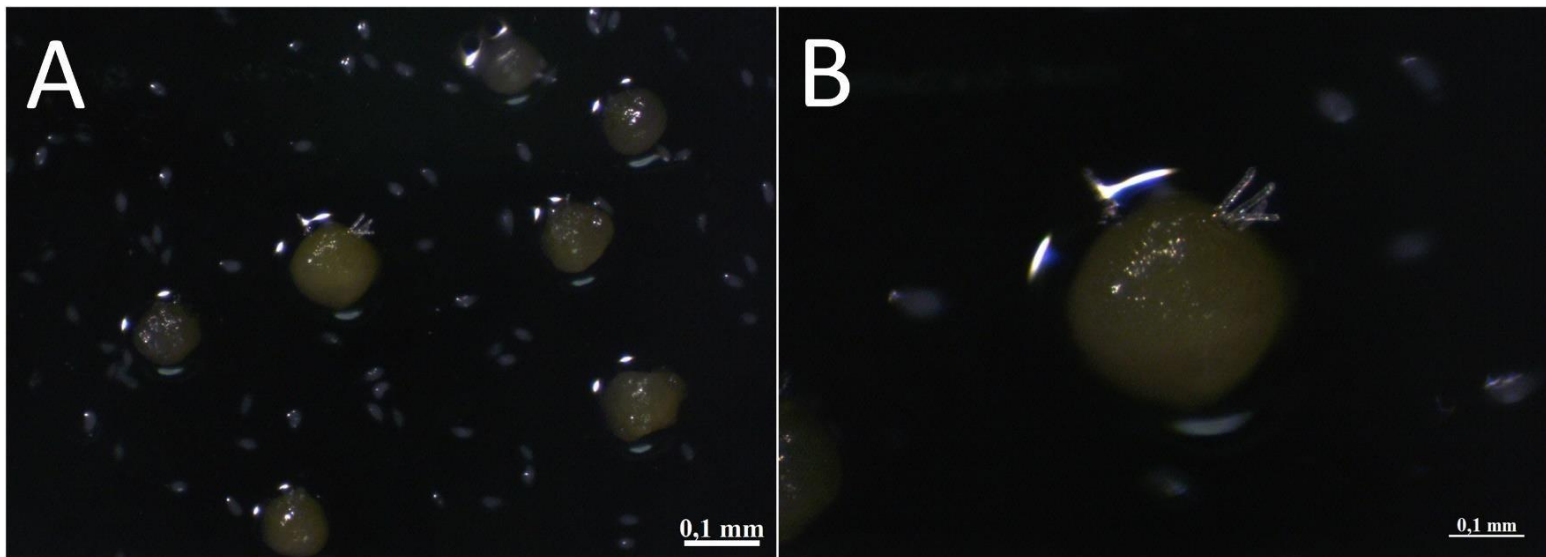
Figura 2



**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**

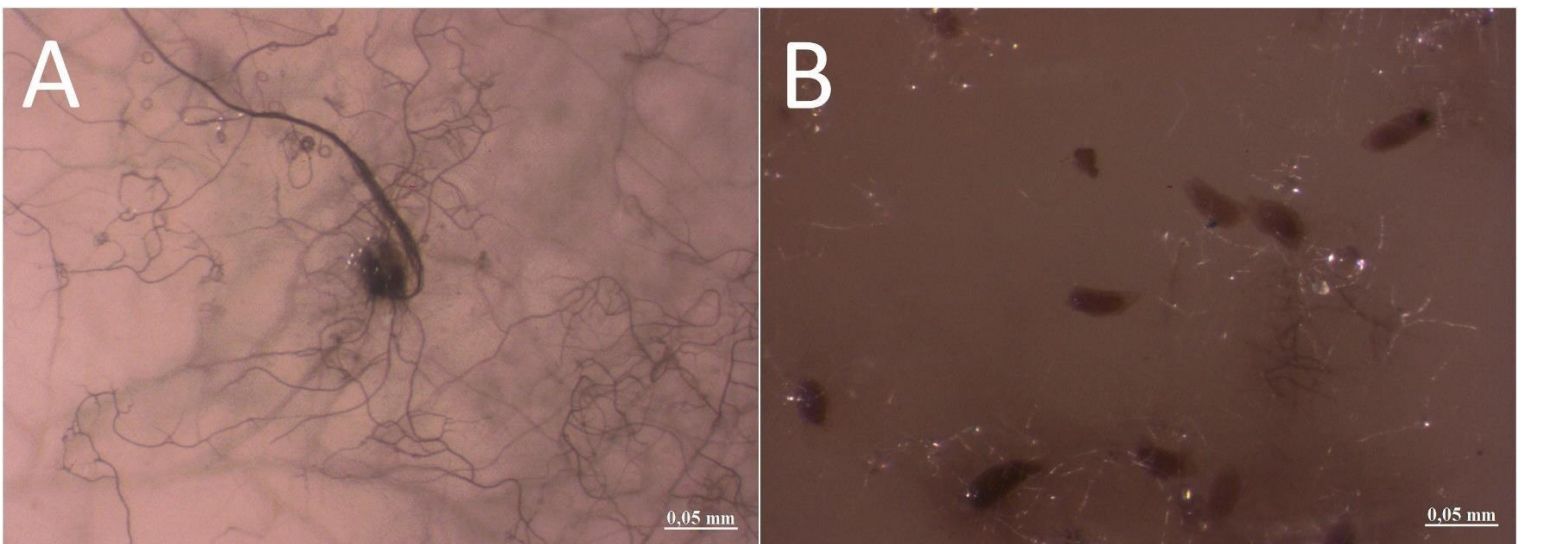
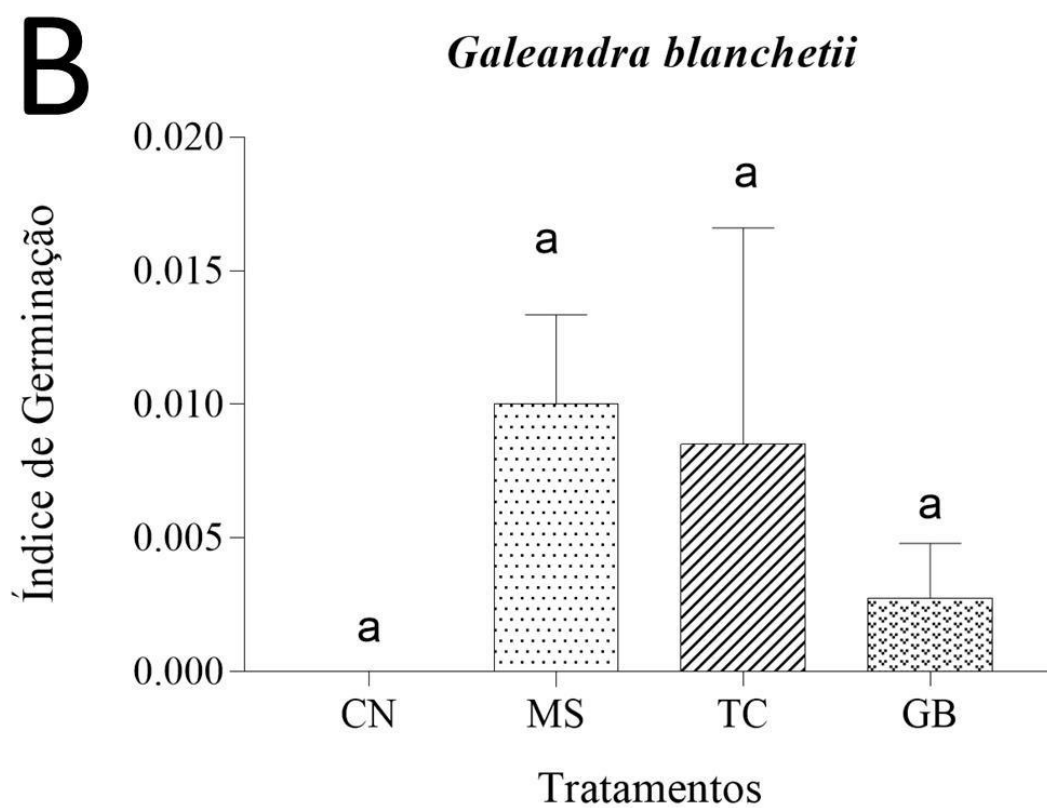
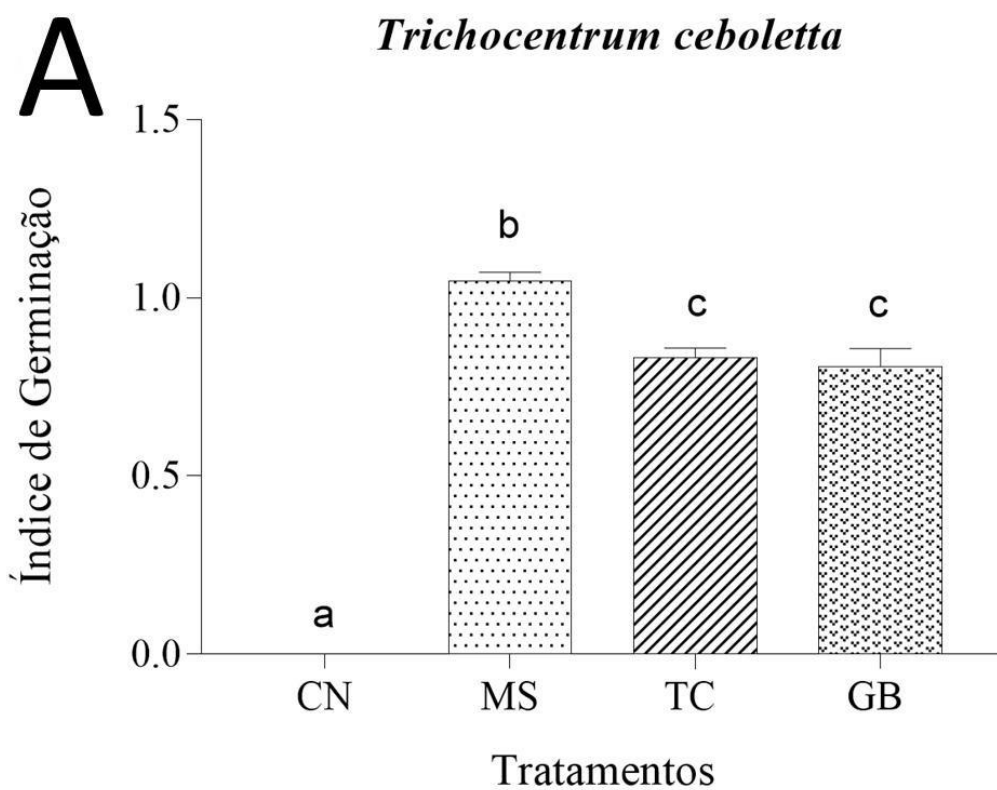


Figura 6



**Tabela 1**

<b>Isolado</b>	<b>Taxa de crescimento (cm/dia)</b>				<b>Cor da colônia</b>	<b>Micélio aéreo</b>	<b>Margem</b>	<b>Aspecto</b>
	<b>BDA</b>	<b>MAL</b>	<b>AA</b>	<b>FUB</b>				
Tc5.4	1,4	1,4	0,8	1,4	creme	abundante	aérea	aveludado
Gb5.2	0,9	0,9	0,3	0,8	branco-amarronzada	abundante	aérea	aveludado

# ACTA BOTANICA BRASILICA



## NORMAS SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS

A *Acta Botanica Brasilica* (*Acta bot. bras.*) publica artigos originais e comunicações curtas. A convite do Corpo Editorial, pesquisadores seniores poderão publicar artigos de revisão sobre temas específicos. Todos os textos são publicados em língua inglesa.

A *Acta Botanica Brasilica* publica estudos que foquem nos diversos aspectos da biologia das Angiospermas, Gimnospermas, Pteridófitas, Briófitas, Algas e dos Fungos. Os artigos submetidos à *Acta bot. bras.* devem ser inéditos, sendo vedada a apresentação simultânea em outro periódico.

### SUMÁRIO DO PROCESSO DE SUBMISSÃO.

Manuscrtos deverão ser submetidos por um dos autores no sistema online. O autor da submissão será o responsável pelo manuscrito no envio eletrônico e por todo o acompanhamento do processo de avaliação. Ao preencher os dados dos demais autores, o autor responsável pela submissão deverá colocar todos os dados de seus colegas – especialmente Instituição e email. Recomendamos que o autor da submissão mencione telefone (se possível celular) e um email não institucional para contato.

Figuras (fotografias, mapas, desenhos, gráficos, esquemas, etc.) e tabelas deverão ser organizadas em arquivos separadamente, os quais serão colocados também separadamente no sistema online.

Para submissão online pela primeira vez é necessário o cadastramento no sistema online, para que um “login” seja gerado com sua respectiva senha. Caso já seja cadastrado, mas tenha esquecido sua senha, clique em ‘Esqueceu sua senha’.

O artigo terá publicação gratuita, se pelo menos um dos autores do manuscrito for **associado da Sociedade Botânica do Brasil, quite com o exercício correspondente ao ano de publicação**, e desde que o número total de páginas impressas (editadas em programa de editoração eletrônica) não ultrapasse o limite máximo de 14 páginas. Para cada página excedente assim impressa, será um valor especificado anualmente. No caso de submissão de figuras coloridas, **as despesas de impressão a cores serão repassadas aos autores (associados ou não-associados)**. Para solicitar informação da revista, sobre os valores vigentes no ano, escreva pelo e-mail [acta@botanica.org.br](mailto:acta@botanica.org.br).

Seguindo a política do Open Access do Public Knowledge Project, assim que publicados, os autores receberão a URL que dará acesso ao arquivo em formato Adobe® PDF (Portable Document Format).

### PUBLICAÇÃO E PROCESSO DE AVALIAÇÃO

Durante o processo de submissão, os autores deverão enviar uma carta de submissão (como um documento suplementar), explicando o motivo de publicar na *Acta Botanica Brasilica*, a importância do seu trabalho para o contexto de sua área e a relevância científica do mesmo.

Os manuscritos submetidos serão avaliados quanto à sua aderência às normas da revista, depois seguiram para um editor que será o responsável pela avaliação do mesmo. Esse editor, após sua análise, poderá recusar a publicação do manuscrito ou encaminhá-lo para apreciação de avaliadores *ad hoc* por ele selecionado, podendo ou não seguir as sugestões dos autores.

### PREPARANDO OS ARQUIVOS

Os textos do manuscrito deverão ser formatados usando a fonte **Times New Roman**, tamanho **12**, com espaçamento entre linhas **1,5** e **numeração contínua de linhas**, desde a primeira página. Todas as margens deverão ser ajustadas para 1,5 cm, com tamanho de página de papel A4. O arquivo referente à parte textual do manuscrito deverá estar em formato DOCX, DOC ou RTF (Microsoft® Word). Não serão aceitos arquivos em formato Adobe® PDF.

O documento principal **não deverá** incluir qualquer tipo de figura ou tabela. Estas deverão ser submetidas como arquivos separados nos **documentos suplementares**.

O manuscrito submetido (documento principal, acrescido de documentos suplementares, como figuras e tabelas) poderá conter até 25 páginas impressas. Assim, recomendamos que os autores atentem para isso e vejam se todo o seu manuscrito está nesse limite de 25 laudas totais. Os manuscritos poderão ser submetidos sob a forma de **artigo** ou de **nota científica**.

Para o caso de nota científica, queira ver as normas mais detalhadas mais à frente. Para **artigos** queira seguir as normas abaixo.

### 1. DOCUMENTO PRINCIPAL

1.1. O texto deverá ser apresentado de forma corrida, **sem quebra de página**, e deverá apresentar as partes citadas abaixo:

- Titulo** do manuscrito, conciso e informativo, com a primeira letra em maiúsculo, sem abreviações. Nomes próprios em maiúsculo. Citar nome científico completo, e nome da família quando for o caso.
- Nome(s) do(s) autor(es)** com iniciais em maiúsculos, com números sobrescritos que indicarão, em rodapé, a afiliação

Institucional – **não abreviar nenhum dos nomes. Créditos de financiamentos deverão vir em Agradecimentos**, assim como vinculações do manuscrito a programas de pesquisa mais amplos (não colocar no rodapé). Autores deverão fornecer os endereços completos, evitando abreviações.

c) E-mail do autor para correspondência. Apenas **um autor** para contato deve ser indicado, ele deverá sempre aquele ser o que submeteu o manuscrito.

d) **ABSTRACT**. O texto deverá ser corrido, **sem** referências bibliográficas, em um único parágrafo. Até **200 palavras**, não mais que isto, e deverá conter as partes essenciais do manuscrito, especialmente os resultados e discussão.

e) **Key words**. Citar até **5 (cinco) palavras-chave** à escolha do(s) autor(es), em ordem alfabética. Não repetir palavras que já constem no título do manuscrito.

f) **Introdução**. O texto deverá conter abordagem e contextualização do problema estudado; problemas científicos que levaram o(s) autor(es) a desenvolver o trabalho; conhecimentos atuais no campo específico do assunto tratado; e, ao final, os objetivos da pesquisa.

g) **Material e métodos**. O texto deverá conter descrições breves, suficientes à repetição do trabalho. Técnicas já publicadas deverão ser apenas citadas e não descritas. Indicar o nome da(s) espécie(s) completo, inclusive com o autor. Mapas poderão ser incluídos (como figuras na forma de documentos suplementares) se forem de extrema relevância e deverão apresentar qualidade adequada para impressão (ver recomendações para figuras). Todo e qualquer comentário de um procedimento utilizado para a análise de dados em **Resultados** deverá, obrigatoriamente, estar descrito no item **Material e métodos**.

h) **Resultados e discussão**. Dependendo da estrutura do trabalho, essas duas partes do texto poderão ser apresentadas em um mesmo item ou em itens separados. Tabelas e figuras (fotografias, mapas, desenhos, gráficos, esquemas, etc.), se citados, deverão ser estritamente necessários à compreensão do texto. **Não** insira figuras ou tabelas diretamente no texto.

i) **Agradecimentos**. O texto deverá ser sucinto. Nomes de pessoas e Instituições deverão ser escritos por extenso, explicitando o motivo dos agradecimentos.

j) **Referências bibliográficas**. Se a referência bibliográfica for citada ao longo do texto, seguir o esquema autor, ano (entre parênteses). Por exemplo: Silva (1997), Silva & Santos (1997), Silva *et al.* (1997) ou Silva (1993; 1995), Santos (1995; 1997; 2002) ou (Silva 1975; Santos 1996; Oliveira 1997). Note que quando as citações ficam dentro dos parênteses **não há vírgula separando o autor do ano**. Na seção Referências bibliográficas, seguir a ordem alfabética e cronológica de autor(es). **Nomes dos periódicos e títulos de livros deverão ser grafados por extenso e em negrito**.

Exemplos:

#### ARTIGOS DE REVISTA

Delgado, S.M. & Souza, M.G.M. 2007. Diatomoflórula periférica do rio Descoberto – DF e GO, Brasil, Naviculales

(Bacillariophyceae): Diploneidinae e Sellaphorineae. **Acta Botanica Brasilica** 21(4): 767-776.

McCrea, K.D.; Abrahamson, W.G. & Weis, A.E. 1985. Goldenrod ball gall effects on *Solidago altissima*: 14C translocation and growth. **Ecology** 66(6): 1902-1907.

Pipoly, J.J. 1981. Contributions toward a monograph of *Cybianthus* (Myrsinaceae): I. subgenus *Iteoides* and the identity of *Conomorpha loretensis*. *Brittonia* 33: 493-497.

#### LIVRO

Erdtman, G. 1969. **Handbook of Palynology**. An introduction to the study of pollen grains and spores. New York, Hafner Publishing Co.

Marques, O.A.V. & Duleba, W. (Eds.). **Estação Ecológica Juréia-Itatins Ambiente Físico, Flora e Fauna**. São Paulo, Editora Holos.

Schäffer, W.B. & Prochnow, M. 2002. **A Mata Atlântica e você: como preservar, recuperar e se beneficiar da mais ameaçada floresta brasileira**. Brasília, APREMAVI.

#### CAPÍTULO

Pangua, E. & Vega, B. 1996. Comparative study of gametophyte development in *Cosentinia* and *Anogramma* (Hemionitidaceae) and *Cheilanthes* (Sinopteridaceae). Pp. 497-508. In: Camus, J.M.; Gibby, M. & R. J. Johns (Eds.). **Pteridology in Perspective**. Kew, Royal Botanic Gardens.

ter Braak, C.J.F. 1995. Ordination. Pp. 91-173. In: Jongman, R.H.G.; ter Braak, C.J.F. & van Tongeren, O.F.R. (Eds.). **Data analysis in community and landscape ecology**. Cambridge, Cambridge University Press.

Tryon, R.M. 1990. Pteridaceae. Pp. 230-256. In: Kramer, K.U. & Green, P.S. (Eds.). **The families and genera of vascular plants**. Pteridophytes and Gymnosperms, v. 1. Berlin, Springer.

#### ARTIGO DE SITES

Bungartz, F. 2001. **Analysis of lichen substances**. Disponível em: [http://ces.asu.edu/ASULichens/plb\\_400/laboratory/chemistry/tlc.html](http://ces.asu.edu/ASULichens/plb_400/laboratory/chemistry/tlc.html). Acessado em 15 out. 2004.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2006. **Produção da extração vegetal e da silvicultura**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em 20 jan. 2009.

Raad, T.J. 2008. **Produtos derivados da produção de carvão vegetal: uma nova visão**. Disponível em <http://revistaopinioes.com.br/cp/materia.php?id=254>. Acessado em 20 jan. 2009.

**Não serão aceitas** referências bibliográficas de monografias de conclusão de curso de graduação, de citações de resumos de Congressos, Simpósios, Workshops e assemelhados. Citações de Dissertações e Teses deverão ser evitadas ao máximo

k) **Legendas das figuras e tabelas**. As legendas deverão



estar incluídas no fim do documento principal, imediatamente após as Referências bibliográficas. Para cada figura, deverão ser fornecidas as seguintes informações, em ordem numérica crescente: número da figura, usando algarismos arábicos (Figura 1, por exemplo; não abrevie). As legendas das figuras necessitam conter nomes dos táxons com respectivos autores, informações da área de estudo ou do grupo taxonômico. Itens da tabela, que estejam abreviados, deverão ser escritos por extenso na legenda. Todos os nomes dos gêneros precisam estar por extenso nas legendas das tabelas.

**1.2. Normas gerais para todo o texto.** Palavras em latim no título ou no texto, como *in vivo*, *in vitro*, *in loco*, *et al.*, deverão estar grafadas em *itálico*. Os nomes científicos, incluindo os gêneros e categorias infragenéricas, deverão estar em *itálico*. Citar nomes das espécies por extenso, na primeira menção do parágrafo, acompanhados de autor, na primeira menção no texto. Se houver uma tabela geral das espécies citadas, o nome dos autores deverá aparecer somente na tabela. Evitar notas de rodapé.

As siglas e abreviaturas, quando utilizadas pela primeira vez, deverão ser precedidas do seu significado por extenso. Ex.: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Usar abreviaturas das unidades de medida de acordo com o Sistema Internacional de Medidas (por exemplo, 11 cm, 2,4 µm). O número deverá ser separado da unidade, com exceção de porcentagem, graus, minutos e segundos de coordenadas geográficas (90%, 17°46'17" S, por exemplo).

Para unidades compostas, usar o símbolo de cada unidade individualmente, separado por um espaço apenas. Ex.: MG kg<sup>-1</sup>, µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, mg L<sup>-1</sup>. O Litro e em suas subunidades deverão ser grafados em maiúsculo. Ex.: L, mL, µL.

Quando vários números forem citados em seqüência, grafar a unidade da medida apenas no último (Ex.: 20, 25, 30 e 35°C). Escrever por extenso os números de zero a nove (não os maiores), a menos que sejam acompanhados de unidade de medida. Exemplo: quatro árvores; 10 árvores; 6,0 mm; 1,0-4,0 mm; 125 exsiccatas.

Em trabalhos taxonômicos, o material botânico examinado deverá ser selecionado de maneira a citarem-se apenas aqueles representativos do táxon em questão, na seguinte ordem e obedecendo ao tipo de fonte das letras: **PAÍS. Estado:** Município, data, fenologia, coletor(es) número do(s) coletor(es) (sigla do Herbário). Exemplo:

**BRASIL. São Paulo:** Santo André, 3/XI/1997, fl. fr., Milanez 435 (SP).

Nocaso de mais de três coletores, citar o primeiro seguido de *et al.* Ex.: Silva *et al.*

**Chaves de identificação** deverão ser indentadas. Nomes de autores de táxons não deverão aparecer. Os táxons da chave, se tratados no texto, deverão ser numerados seguindo a ordem alfabética. Exemplo:

1. Plantas terrestres
  2. Folhas orbiculares, mais de 10 cm diâm. .... 2. *S. orbicularis*
  2. Folhas sagitadas, menos de 8 cm compr. .... 4. *S. sagittalis*
1. Plantas aquáticas
  3. Flores brancas ..... 1. *S. albicans*
  3. Flores vermelhas ..... 3. *S. purpurea*

O tratamento taxonômico no texto deverá reservar o *itálico* e o *negrito* simultâneos apenas para os nomes de táxons válidos. Basiônimo e sinonímia aparecerão apenas em *itálico*. Autores de nomes científicos deverão ser citados de forma abreviada, de acordo com o índice taxonômico do grupo em pauta (Brummit & Powell 1992 para Fanerógamas).

Exemplo:

1. *Sepulveda albicans* L., Sp. pl. 2: 25. 1753.

*Pertencia albicans* Sw., Fl. bras. 4: 37, t. 23, f. 5. 1870.

Fig. 1-12

Subdivisões dentro de Material e métodos ou de Resultados e/ou Discussão deverão ser grafadas com a primeira letra em maiúsculo, seguida de um traço (-) e do texto na mesma linha.

Exemplo: Área de estudo - localiza-se ...

## 2. DOCUMENTOS SUPLEMENTARES

**2.1. Carta de submissão.** Deverá ser enviada como um arquivo separado. Use a carta de submissão para explicitar o motivo da escolha da *Acta Botanica Brasilica*, a importância do seu trabalho para o contexto de sua área e a relevância científica do mesmo.

**2.2. Figuras.** Todas as figuras apresentadas deverão, obrigatoriamente, ter chamada no texto. Todas as imagens (fotografias, mapas, desenhos, gráficos, esquemas, etc.) são consideradas como 'figuras'.

Não envie figuras com legendas na base das mesmas.

**As legendas deverão ser enviadas no final do documento principal.**

As figuras deverão ser referidas no texto com a primeira letra em maiúsculo, de forma abreviada e sem plural (Fig. 1, por exemplo).

Imagens isoladas ou agrupadas deverão ocupar as seguintes dimensões máximas (largura x altura): 170 x 240 mm ou 85 x 240 mm. A largura deverá ser 170 ou 85 mm, não sendo admitidos outros valores. O comprimento poderá variar até o limite máximo acima descrito.

Como na editoração final dos trabalhos, o tamanho útil destinado a uma figura de largura de página (duas colunas) é de 170 mm, para uma resolução de 300 dpi, a largura da figura deverá ter, no mínimo, **2000 pixels**. Para figuras para publicação em uma coluna (82 mm de largura), a largura mínima é **970 pixels**. **Assim figuras com larguras (em pixels) menores que 970 pixels não poderão ser publicadas. Portanto, se um autor, ao fazer**

**a submissão de uma figura, desejar que a mesma seja publicada com largura de página, essa deverá ter largura mínima de 2000 pixels.**

Os números ou letras que identificam cada imagem devem ser, necessariamente, inseridos dentro de círculos brancos (10 mm de diâmetro); estes círculos deverão ter moldura preta (0,2 mm de espessura) e ficarão dispostos a 2 mm das margens, no canto inferior direito. Após inserir o caractere no centro do círculo, agrupe as imagens.

Figuras não relacionadas entre si, isoladas, serão identificadas com algarismos arábicos, sequencialmente, na ordem de chamada no texto (1, 2, 3... – fonte Arial, tamanho 18). Esta identificação será disposta como no caso anterior

As imagens que compõem as figuras (pranchas) serão identificadas por letras, sequencialmente, na ordem de chamada no texto (A, B, C... – fonte Arial, tamanho 18). O algarismo de identificação da prancha (Ex; prancha 2) não será inserido nela, sendo referido apenas na legenda e texto.

Os arquivos de imagens deverão ser salvos no formato TIFF, com resolução de, no mínimo, 300 dpi.

Cada figura será ser editada para minimizar as áreas com espaços em branco, otimizando o tamanho final da ilustração.

As barras de escala, quando necessárias, ficarão a 2 mm das margens, no canto inferior esquerdo. Cada barra terá 1,8 mm de espessura, sempre na cor branca ou preta, com bordas de 0,2 mm de cor oposta. O valor de cada barra de escala deverá ser referido no final da legenda, ou inserido acima da mesma no caso de a figura ter várias imagens com escalas diferentes. Nesse caso, deve-se usar caracteres na fonte Arial, tamanho 14, negrito. Os caracteres terão cor branca ou preta, com bordas de 0,1 mm na cor oposta. A escolha da cor ficará a critério dos autores, de modo a obter o maior destaque possível.

A indicação de detalhes nas imagens será feita por meio de setas, letras (Arial, tamanho 14, negrito), ou símbolos, conforme a necessidade. Linhas indicativas deverão ter 0,25 mm de espessura, sem bordas e na cor branca ou preta. Os caracteres terão cor branca ou preta, com bordas de 0,1 mm na cor oposta. A escolha da cor ficará a critério dos autores, de modo a obter o maior destaque possível.

Nas imagens agrupadas deverão ser inseridas barras de separação, esta com 1 mm de espessura e na cor branca ou preta, sem moldura na barra.

Acesse prancha modelo com todos os caracteres e barras necessárias e veja modelos de pranchas em ([link](#)).

**2.3. Tabelas.** As tabelas deverão ser referidas no texto com a primeira letra em maiúsculo, de forma abreviada e sem plural (Tab. 1, por exemplo). **Todas as tabelas apresentadas deverão, obrigatoriamente, ter chamada no texto.** As tabelas deverão ser sequencialmente numeradas, em arábico (Tabela 1, 2, 3, etc; não abrevie), com numeração independente das figuras. O título das tabelas deverá estar acima das mesmas. Tabelas deverão ser formatadas usando as ferramentas de criação de tabelas ('Tabela') do Microsoft® Word. Colunas e linhas da tabela deverão ser visíveis, optando-se por **não usar linhas pretas** para separar as linhas e colunas, estas são utilizadas apenas na linha título e na última linha da tabela. Não utilize padrões, tons de cinza, nem qualquer tipo de cor nas tabelas.

Quando a tabela for demais grande para ocupar mais que uma página, **não a divida em várias páginas**, deixa que a divisão seja feita pelo próprio programa de editoração da tabela.

Dados mais extensos poderão ser enviados como documentos suplementares, os quais estarão disponíveis como links para consulta pelo público.

## NORMAS PARA MANUSCRITOS DE *SHORT COMMUNICATION*

Os autores podem enviar os seus trabalhos em forma de nota científica desde que texto enviado não ultrapasse **seis (6)** laudas, contendo abstract, um texto em corpo único (“texto corrido”, i.e., sem itens como introdução, material e métodos, resultados e discussão), agradecimentos e referências bibliográficas. Podem ser incluídas figuras e/ou tabelas, incluídas no total das seis laudas permitidas (e não ultrapassando o total de uma página com estes elementos).

Publicação de espécies novas **não** é considerada para submissão como nota científica e devem ser publicadas como artigos.

O manuscrito de **Short Communication** deverá seguir as seguintes normas:

- a) **Título** do manuscrito, conciso e informativo, com a primeira letra em maiúsculo, sem abreviações. Nomes próprios em maiúsculo. Citar nome científico completo, e nome da família quando for o caso.
- b) **Nome(s) do(s) autor(es)** com iniciais em maiúsculos, com números sobrescritos que indicarão, em rodapé, a afiliação Institucional – **não abreviar nenhum dos nomes. Créditos de financiamentos deverão vir em Agradecimentos**, assim como vinculações do manuscrito a programas de pesquisa mais amplos (não colocar no rodapé). Autores deverão fornecer os endereços completos, evitando abreviações.

c) E-mail do autor para correspondência. Apenas **um autor** para contato deve ser indicado, ele deverá sempre aquele ser o que submeteu o manuscrito.

d) **ABSTRACT**. O texto deverá ser corrido, **sem** referências bibliográficas, em um único parágrafo. Até **200 palavras**, não mais que isto, e deverá conter as partes essenciais do manuscrito, especialmente os resultados e discussão. Não utilizar palavras já presentes no título do manuscrito.

e) **Key words**. Citar até **5 (cinco) palavras-chave** à escolha do(s) autor(es), em ordem alfabética. Não repetir palavras que já constem no título do manuscrito.

f) **Texto**. Escrito de forma sequenciada e lógica, **sem** subdivisão.

g) **Agradecimentos**. O texto deverá ser sucinto. Nomes de pessoas e Instituições deverão ser escritos por extenso, explicitando o motivo dos agradecimentos.

h) **Referências bibliográficas**. Seguir as normas citadas antes para artigos.

j) No geral a diferença básica no referente ao texto entre “artigo” e “nota científica” é a falta de subdivisão e o menor espaço gráfico da última. Assim todas as demais normas editoriais aplicadas aos “artigos” também valem para as “notas científicas”.