

Isolamento de fungos micorrízicos de *Cyrtopodium vernum*, orquídea terrestre de campos rupestres do Estado de Goiás.

GONÇALVES, Fábio José¹; NUNES, Camila Marillac Costa¹, FILIPPI, Marta Cristina²; SIBOV, Sérgio Tadeu³

¹ Programa de Pós-Graduação em Agronomia – PPGA/UFG

² Embrapa Arroz e Feijão

³ Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UFG

e-mail: biofabio_botanico@yahoo.com.br.

Palavras-chave: simbiose, Cerrado, pelotons

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae, considerada a mais evoluída das plantas, é a que apresenta maior diversidade entre as espécies, com distribuição em quase todo o planeta, com cerca de 18.500 espécies distribuídas em 788 gêneros e mais de 100.000 híbridos. Até o momento, das 3.500 espécies de orquídeas encontradas no Brasil, cerca de 500 a 600, ocorrem nos cerrados (Colombo et al., 2004)

Há registros desde 1889 de que, na natureza, as orquídeas estão associadas com fungos micorrízicos (Clements, 1988). As espécies possuem sementes diminutas, com pouca reserva nutricional e devem ser colonizadas pelo fungo simbiote, como regra, para que ocorra a germinação na natureza (Rasmussen 1995; Peterson et al. 1998; Pereira et al. 2003). Após a infecção, ocorre a formação de uma estrutura intracelular denominada *pelotons*. Os produtos advindos da digestão enzimática desta estrutura são utilizados pelo embrião para o rompimento do tegumento da semente e, a partir daí, para o surgimento de uma estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, denominada protocormo (Kraus et al., 2006).

Esses eventos caracterizam o micotrofismo nesta família, ou seja, o protocormo é totalmente dependente de um fungo simbiote para o seu desenvolvimento até tornar-se plântula autotrófica (Pereira et al. 2003). O micotrofismo, não é exclusivo da família Orchidaceae, sendo também relatado em outras famílias de monocotiledôneas e dicotiledôneas (Taylor et al., 2002).

Os floricultores rotineiramente propagam orquídeas germinando sementes em um meio de cultura asséptico, seguindo procedimentos inicialmente desenvolvidos por Lewis Knudson na década de 1920 (Arditti et al. 1990). Como resultado, a simbiose micorrízica em Orchidaceae mantém-se pobremente compreendida, quando comparada a outros aspectos fundamentais da biologia de Orchidaceae, a exemplo da sua taxonomia (Rasmunssen 1995). Registros que descrevem os fungos endofíticos de orquídeas do Novo Mundo são raros, particularmente para táxons epífitos ou epilíticos (Richardson et al. 1993; Richardson & Currah 1995; Pereira et al. 2003, 2005).

Estudar e explorar o processo de simbiose entre fungos micorrízicos e as espécies de orquídeas possibilita o esclarecimento das etapas que envolvem esta relação, além da utilização deste processo no cultivo comercial de orquídeas. O objetivo deste trabalho foi isolar fungos associados a raízes de uma espécie de

orquídea terrestre do gênero *Cyrtopodium* visando o melhor desenvolvimento de protocormos na propagação *in vitro* desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento de fungos

Para o isolamento dos fungos micorrízicos, raízes de *Cyrtopodium vernum* foram coletadas em campos rupestres da Reserva Ecológica Prof. José Ângelo Rizzo, localizada na Serra Dourada, município de Mossâmedes - GO (S 16 04 36.4 W 50 11 16.9 – 1006 m de altitude). As raízes foram trazidas até o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (ICB/UFG), maceradas e colocadas em meio BDA (Riker & Riker, 1936) para promover o crescimento de micélios fúngicos (Nogueira et al, 2005). As espécies fúngicas que cresceram no meio de cultura BDA foram isoladas e transferidas para meio de cultura Melin-Norkran's modificado (MNM - Marx, 1969).

Cortes histológicos

Com a intenção de se detectar a presença de *pelotons* no material coletado, foram realizados cortes histológicos, a mão livre, das raízes desta espécie de orquídeas. Inicialmente, as raízes foram fixadas em FAA 50 % por 72 horas e transferidas para álcool 70 % e então, submetidas aos cortes. Os cortes foram corados com azul de astra e fuccina, para viabilizar a observação em microscópio óptico.

Germinação

Os testes de germinação foram conduzidos em quatro tratamentos:

- 1) O cultivo simbiótico (Pereira et al, 2005), consistiu do pareamento entre sementes da espécie *C. vernum* com o isolado fúngico obtido desta espécie. O experimento foi mantido em 12 placas de Petri contendo meio Ágar-aveia modificado (Dixon, 1987);
- 2) No cultivo assimbiótico, sementes da espécie *Cyrtopodium vernum* foram semeadas em frascos contendo os meios de cultura indicados abaixo, 12 frascos cada meio.
 - a. MS (Murashige & Skoog, 1962);
 - b. MS com metade da concentração de macronutrientes;
 - c. KC (Knudson, 1922)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre todas as colônias de fungos isoladas associadas às raízes da espécie *C. vernum*, apenas um único isolado foi identificado como possível micorriza (Pereira et al, 2005). Como parte do estudo, este isolado foi utilizado em testes de germinação simbiótica (Figura 1).

Observou-se a presença de *pelotons*, ráfides e células lignificadas no parênquima cortical dos cortes histológicos das raízes de *C. vernun* (Figura 2). Este é mais um resultado indicando a presença de fungos micorrízicos associados a esta espécie e, as estruturas visualizadas, poderão facilitar a identificação deste fungo.

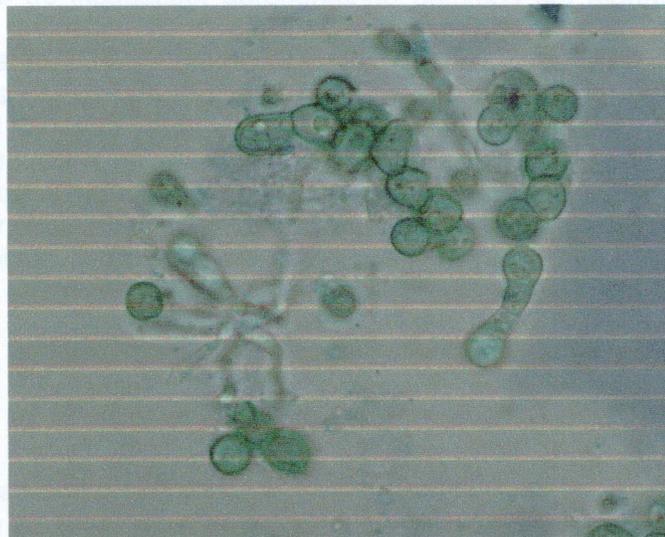


Figura 1 – Micélio micorrízico isolado de raízes de *C. vernun* visualizado por microscópio óptico.

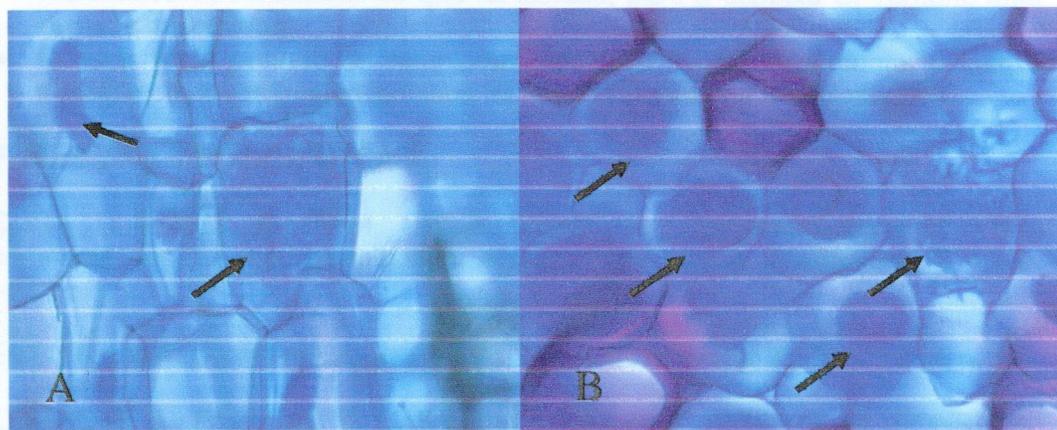


Figura 2 – Cortes histológicos de raízes de *C. vernun* mostrando *pelotons* (setas). Corte longitudinal (A), corte transversal (B)

A germinação simbiótica das sementes de *C. vernun* foi mais eficiente em comparação com a germinação assimbiótica. No processo de germinação simbiótica, houve rompimento do tegumento das sementes aos 21 dias após a semeadura, enquanto que na germinação em condições assimbióticas, os embriões iniciaram o rompimento do tegumento das sementes somente 60 dias após a semeadura.

A germinação de sementes e o desenvolvimento de protocormos de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) induzidos simbioticamente foram descritos pela primeira vez por Pereira et al. (2004). Segundo os autores, sementes de *O. flexuosum* foram inoculadas com dez fungos micorrízicos rizoctonióides, previamente isolados de

micorrizas de dez espécies de orquídeas neotropicais do Brasil. Sementes inoculadas com o isolado de *Ceratorhiza* sp., originalmente isolado do sistema radicular de *O. flexuosum* em habitat natural, promoveu a germinação das sementes em sete dias e em, aproximadamente, 30 % das plântulas, houve formação de folhas após 50 dias de incubação, apresentando *pelotons* em algumas células do protocormo e das radículas. Os demais isolados promoveram a germinação das sementes, entretanto, não promoveram um desenvolvimento ótimo dos protocórmios. Seus estudos mostraram que sementes incubadas na ausência de fungos micorrízicos não germinaram.

Este é o primeiro relato de germinação simbiótica em orquídeas do gênero *Cyrtopodium*. Também, até o momento, não há registro de isolamento de fungos micorrízicos a partir de orquídeas terrestres brasileiras. Assim, o próximo passo será a identificação destes isolados, além de novos experimentos de germinação envolvendo outras espécies de orquídeas para testes de especificidade orquídea-micorriza.

CONCLUSÕES

- Foram constatados a presença de *pelotons* nos cortes histológicos de raízes coletadas no campo, indicando a existência de associação micorrízica para *C. vernum*.
- De acordo com características morfológicas e resultados de crescimento em meio seletivo, consideramos que foi isolado, para a espécie *C. vernum*, uma espécie micorrízica;
- Considerando período de rompimento do tegumento da semente, o cultivo simbiótico com os fungos isolados foi mais eficiente que o assimiótico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDITTI, J.; ERNST, R.; YAM, T.W. & GLABE, C. The contributions of orchid mycorrhizae fungi to seed germination: a speculative review. *Lindleyana* 5. 1990. 249-255 p.
- CLEMENTS, M.A. Orchid micorrhizal associations. *Lindleyana* 3. 1988. 73-86 p.
- COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. R. F. P.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.6, n.2, p. 253-258, 2004.
- KRAUS, J. E.; KERBAUY, G. B.; MONTEIRO, W. R. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. *Hoehnea*, v. 33, n.2, p. 177-184, 2006.
- MARX, D.H. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic and soil bacteria. *Phytopatology* 59. 1969. 153-163 p.

NOGUEIRA, R.E.; PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M.; LANNA, M.C.S.; MENDONÇA, M.P. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. **Acta Bot. Bras.** v.19 n.3 São Paulo jul./set. 2005

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

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

PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M.; BORGES, A.C. & ARAÚJO, E.F. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. **Canadian Journal of Botany** 83. 2005. 54-65 p.

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

PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M.; ROLLEMBERG, C.L. & BORGES, A.C. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides. **Rev. Bras. Ciênc. Solo** v.29 n.2 Viçosa maio/abr. 2005

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

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

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

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

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

FONTE DE FINANCIAMENTO – FAPEG
