

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CAMPUS DE CHAPADÃO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

OTIERES CIRINO DE CARVALHO

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E INOCULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS
EM ORQUÍDEAS DA SUBTRIBO CATASETINAE NATIVAS DO MATO GROSSO
DO SUL**

CHAPADÃO DO SUL – MS
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CAMPUS DE CHAPADÃO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

OTIERES CIRINO DE CARVALHO

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E INOCULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS
EM ORQUÍDEAS DA SUBTRIBO CATASETINAE NATIVAS DO MATO GROSSO
DO SUL**

Orientador: Prof.º Dr.º Vespasiano Borges de Paiva Neto

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, para
obtenção do título de Mestre em Agronomia,
área de concentração: Produção Vegetal.

CHAPADÃO DO SUL – MS
2015



Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Câmpus de Chapadão do Sul

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

DISCENTE: Otieres Cirino de Carvalho
ORIENTADOR: Prof. Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E INOCULAÇÃO DE FUNGOS
MICORRÍZICOS EM ORQUÍDEAS DA SUBTRIBO CATASETINAE
NATIVAS DO MATO GROSSO DO SUL**

Prof.(a) Dr.(a) Presidente Vespasiano Borges de Paiva Neto

Prof.(a) Dr.(a) Sebastiao Ferreira de Lima
Prof.(a) Dr.(a) Edson Luiz Souchie

Chapadão do Sul, 22 de Abril de 2015.

Dedico este trabalho à minha família e amigos, junto aos quais tenho trilhado este árduo caminho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal pela oportunidade e pela disponibilização de sua estrutura para o desenvolvimento deste trabalho;

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – Fundect pelo auxílio financeiro imprescindível ao desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores do curso de Pós-graduação em Agronomia do CPCS, pelo conhecimento compartilhado;

Ao meu orientador Vespasiano, por ter acreditado que eu seria capaz, por vezes, mais que eu próprio acreditei;

À Professora Meire Cordeiro (UFMS) pela co-orientação;

À Professora Maria Catarina Megumi Kasuya (UFV) e a todos os membros de seu laboratório, em especial ao Tomás e Melissa, por terem me recebido e por terem compartilhado de seu conhecimento;

À família, Dita, Dani, Jove, Mané (*in memorian*), Neves, Zezito (*in memorian*), Edith, Adão, Tuane, Jefferson, Leila, Maria Alice, Jairo (*in memorian*), Gerri, Jair, Gabriela e Bruna, meus grandes apoiadores em todos os sentidos;

Ao amigo Willian Pereira, que esteve sempre presente, mesmo estando bem distante fisicamente;

Às amigas que fiz e que cultivei, ao longo desses dois anos, em especial à “Luzia”;

Ao amigo Derso e sua família pelo apoio;

Aos Colegas do Laboratório, Deanna, Vitória e Mateus e em especial, a Daly Maria;

A todos os servidores da UFMS, que de uma forma ou de outra, colaboraram para a realização deste projeto.

“ É erro vulgar confundir o desejar com o querer. O desejo mede os obstáculos; a vontade vence-os.

Alexandre Herculano.

RESUMO

CARVALHO, Otieres Cirino de. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Isolamento, identificação e inoculação de fungos micorrízicos em orquídeas da subtribo Catasetinae nativas do Mato Grosso do Sul
Professor Orientador: Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto

A simbiose entre as sementes de orquídeas e micorrizas tem sido relatada como fator determinante no sucesso germinativo e desenvolvimento dos protocormos *in situ*. O entendimento da natureza dessa relação, em termos de especificidade e/ou compatibilidade, faz-se necessário para o desenvolvimento de programas eficientes de propagação simbiótica de orquídeas, com vistas à reintrodução de espécies ameaçadas de extinção em seus habitats naturais ou mesmo para produção de mudas de interesse comercial. Cada vez mais se tem observado uma maior eficiência em termos de germinação e conversão em protocormos no cultivo simbiótico, se comparado ao assimbiótico, normalmente empregado para a propagação de espécies da família Orchidaceae. Assim, este trabalho objetivou isolar e identificar fungos micorrízicos associados a duas espécies pertencentes ao gênero *Cyrtopodium* e utilizá-los na germinação de suas sementes. O projeto foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da UFMS – Campus Chapadão do Sul (CPCS). Cada experimento constituiu-se de 6 tratamentos, sendo estes a combinação de: duas variações de meio de cultura aveia-ágar (com e sem carvão; dois isolados de fungos micorrízicos e um tratamento assimbiótico (controle). Os fungos utilizados foram o CH01 isolado de *C. paludicolum* e o CS01 isolado de *C. saintlegerianum*, ambos isolados das espécies estudadas. Para a verificação de uma possível relação de especificidade entre as espécies e seus próprios isolados, utilizou-se também o fungo denominado M65, cedido pelo Laboratório de Associações Micorrízicas da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO/UFV). Ambos os experimentos foram testados sob dois ambientes, B.O.D e sala de crescimento, e foram avaliados 30 dias após a inoculação. Os resultados obtidos permitiram concluir que não existe uma relação de especificidade entre os isolados e as espécies estudadas, sendo portanto, caracterizada como uma associação de compatibilidade, uma vez que as orquídeas estabeleceram associação também com o isolado M65 pertencente a outra espécie.

PALAVRAS-CHAVE: *Cyrtopodium*. Germinação. Simbiose

ABSTRACT

CARVALHO, Otieres Cirino de. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Isolation, identification and inoculation of mycorrhizal fungi in Catasetinae subtribe of native orchids of Mato Grosso do Sul State
Author: Otieres Cirino de Carvalho.
Adviser: Vespasiano Borges de Paiva Neto.

The symbiosis between the orchid seeds and mycorrhizal fungi has been reported as a determining factor in the protocorm success and development on in situ conditions. To understand this relationship nature in terms of specificity and / or compatibility, it is necessary to develop efficient programs to orchid symbiotic propagation, aiming to reintroduce endangered species in their natural habitats or even to produce commercial interest seedlings. Increasingly, we have observed greater efficiency in terms of germination and protocorm conversion in the symbiotic cultivation as compared to asymbiotic cultivation, normally used for the propagation of Orchidaceae species. This work aimed to isolate and identify mycorrhizal fungi associated with two species of the *Cyrtopodium* genus and use isolated fungi in the seed germination. The experiments were conducted at the Biotechnology Laboratory of UFMS - Campus Chapadão do Sul (CPCS). Each experiment consisted of 6 treatments, which are combinations of: two variations of medium oatmeal agar culture (with and without activated charcoal, two isolates of mycorrhizal fungi and asymbiotic treatment (control)). Fungi used were the CH01, isolated from *C. Paludicolum*, and CS01, isolated from *C. saintlegerianum*. In order to verify possible specificity relationship between species and their own isolation, we also use the M65 fungus, donated by mycorrhizal associations Laboratory of the Universidade Federal of Viçosa (BIOAGRO / UFV). Both experiments were tested in two environments, BOD and growth room, and were evaluated 30 days after inoculation. The results showed that there is no specific relationship between the studied species and his isolated fungus, and therefore, both relationship were characterized as a compatibility association, since orchids also established an association with the isolated M65 belonging to another species.

KEY-WORDS: *Cyrtopodium*. Symbiosis. Germination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura típica de fungos micorrizicos. De Bernard (1909)	18
---	----

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Área de coleta do material botânico, plantas saudas e cápsulas maduras, de <i>C. paludicolum</i>	28
Figura 2 - A – Corte transversal da raiz de <i>C. paludicolum</i> caracterizando a colonização; B - Isolado CH01 em meio de cultura BDA com hifas (seta) bem desenvolvidas; C – Hifas fúngicas, com setas evidenciando presença de células monilióides (1); ângulo de 90° (2); septos (3); D – Estádio 2 de desenvolvimento das sementes <i>C. paludicolum</i> , obtidos em meio simbiótico com isolado CH01; E e F – Imagens de microscopia óptica (E) e eletrônica de varredura (F) de células corticais de protocormos (setas) de <i>C. paludicolum</i> em estágio de desenvolvimento 2, obtidos em meio simbiótico com isolado CH01 evidenciando presença de enovelado de hifas fúngicas (<i>pelotons</i>) viáveis em E e parcialmente degradado em F	34

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Área de coleta do material botânico, plantas saudas e cápsulas maduras, de <i>C. paludicolum</i>	48
Figura 2 - A – Corte transversal da raiz de <i>C. saintlegerianum</i> caracterizando a colonização; B - Isolado CS01 em meio de cultura BDA; C – Hifas fúngicas, setas evidenciando presença de células monilióides (1), ângulo de 90° (2), septo (3); D - Estádios de desenvolvimento das sementes <i>C. saintlegerianum</i> , obtidos em meio simbiótico com isolado CS01; E e F – Imagens de microscopia óptica (E) e eletrônica de varredura (F) de células corticais de protocormos (setas) de <i>C. saintlegerianum</i> em estágio de desenvolvimento 2, obtidos em meio simbiótico com isolado CS01 evidenciando presença de enovelado de hifas fúngicas (<i>pelotons</i>) viáveis em E e parcialmente degradado em F	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sinopse taxonômica do gênero-forma <i>Rhizoctonia</i> , com separação dos gêneros, anamórfico e teleomórfico, reconhecidos atualmente	17
--	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Afiliação Filogenética de unidade taxonômica operacional (OTU) no filo dos Basidiomiceto	33
---	----

Tabela 2 - Taxa de germinação e Índice de crescimento de sementes de <i>C. paludicolum</i> , referentes ao fator fungo, obtidos 30 dias após a inoculação <i>in vitro</i> para o experimento mantido sob fotoperíodo, em Chapadão do Sul, MS.....	35
---	----

Tabela 3 - Taxa de germinação e Índice de crescimento de sementes de <i>C. paludicolum</i> , referentes ao fator Fungo, obtidos 30 dias após a inoculação <i>in vitro</i> para o experimento incubado em B.O.D, em Chapadão do Sul, MS.....	36
---	----

Tabela 4 - Taxa de germinação e Índice de crescimento de sementes de <i>C. paludicolum</i> referentes ao fator meio de cultura, obtidos 30 dias após a inoculação <i>in vitro</i> para o experimento incubado em B.O.D, em Chapadão do Sul, MS	36
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Taxa de germinação e valores de Índice de crescimento das sementes de <i>C. saintlegerianum</i> , obtidos 30 dias após a inoculação <i>in vitro</i> e incubação sob fotoperíodo em sala de crescimento, Chapadão do Sul, MS	56
--	----

Tabela 2 - Taxa de germinação e valores de Índice de crescimento das sementes de <i>C. saintlegerianum</i> , obtidos 30 dias após a inoculação <i>in vitro</i> , em Chapadão do Sul, MS.....	57
--	----

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	
LISTA DE TABELAS	
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Subtribo Catasetinae	14
2.2 O gênero <i>Cyrtopodium</i> spp	14
2.3 <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne	15
2.4 <i>Cyrtopodium saintlegerianum</i> Richb.f.	15
2.5 Relação simbiótica planta – fungo	15
2.6 Fungos micorrízicos	16
2.7 Nutrição do embrião a planta adulta	18
2.8 A importância da germinação simbiótica	19
3 REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 1 Isolamento, identificação e inoculação de fungos micorrízicos rizoctenóides associados à <i>Cyrtopodium paludicolum</i> Hoehne (Orchidaceae – Catasetinae)	23
RESUMO	23
ABSTRACT	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
Coleta do material vegetal	27
Isolamento	28
Identificação	29
Inoculação dos fungos micorrízicos	30
Caracterização da associação micorrízica	31
Avaliação	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
CONCLUSÕES	38
AGRADECIMENTOS	39
REFERÊNCIAS	39
ANEXO	42

CAPÍTULO 2 Isolamento, identificação e inoculação de fungos micorrízicos rizoctenóides associados à <i>Cyrtopodium saintlegerianum</i> Richb.f. (Orchidaceae – Catasetinae)	44
RESUMO	44
ABSTRACT	45
INTRODUÇÃO	46
MATERIAL E MÉTODOS	48
Coleta do material vegetal	48
Isolamento	49
Identificação	50
Inoculação dos fungos micorrízicos	50
Caracterização da associação micorrízica	51
Avaliação	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
CONCLUSÕES	58
AGRADECIMENTOS	59
REFERÊNCIAS	59
ANEXO	62

1 INTRODUÇÃO

As orquídeas são plantas da classe das monocotiledôneas, ordem Asparagales e família Orchidaceae, consistindo-se na maior e mais diversificada dentre todas as famílias do reino vegetal (PEREIRA et al., 2010), sendo composta por plantas herbáceas perenes (ervas, lianas, trepadeiras), que variam em tamanho e formato de caule e folhas, além do tamanho e da coloração das flores. Quanto aos tipos de habitats, estas podem ser aquáticas, epífitas, hemiepífitas, rupícolas, saprofíticas ou terrícolas (BARROS et al., 2015). Estima-se que no mundo existam entre 20.000 e 35.000 espécies de orquídeas, divididas entre cinco subfamílias monofiléticas, sendo elas: Apostasioideae, Cyripedioideae, Vanillioideae, Orchidioideae e Epidendrioideae, sendo esta última a maior e mais evoluída (SMITH; READ, 2008).

O Brasil é o país de maior diversidade de espécies pertencentes a esta família no mundo (SOUZA; LORENZI, 2008). Segundo Barros et al. (2015), nos diversos biomas brasileiros (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal), existem 2.530 espécies (1.615 endêmicas), subdivididas em 236 gêneros, sendo o Cerrado o terceiro bioma em termos de diversidade de orquídeas.

Com aproximadamente 200 milhões de hectares, o Cerrado localiza-se na região central do país, e pode ser definido como uma formação do tipo savana tropical, na qual se observa, em diferentes proporções, a presença de formações herbáceas, arbustivas e arbóreas, com uma dinâmica acentuada em termos de sazonalidade e antropismo (RIBEIRO; WALTER, 1998; BRASIL, 2015). Mato Grosso do Sul abriga aproximadamente 11% do Cerrado brasileiro, o que representa 61% de toda a cobertura vegetal do Estado, dos quais apenas 32% são compostos por remanescentes de áreas de cobertura vegetal nativa (BRASIL, 2015).

O Cerrado é considerado o bioma de savana mais rico em termos de biodiversidade do mundo (BRASIL, 2015), e no Brasil abriga aproximadamente 700 espécies de orquídeas, na maioria espécies de hábito terrícola e epífítico, sendo essa uma das famílias de maior diversidade nesse Bioma (BARROS et al., 2015). Para Cerrado sul-mato-grossense, em *checklist* realizado por Barros et al. (2012), foram levantadas 119 espécies distribuídas em 65 gêneros. No entanto, as orquídeas têm atraído a atenção de colecionadores e do mercado de plantas ornamentais, tornando-as alvo do extrativismo, que aliado ao desmatamento

excessivo do Bioma, ao baixo sucesso reprodutivo comum a Família e ao habitat restrito, podem levar diversas espécies à extinção (PEREIRA, KASUYA, 2010)

Portanto, trabalhos que tenham por objetivo, aprimorar técnicas de propagação sejam de forma simbiótica ou assimbótica, de espécies pertencentes à família Orchidaceae, com vistas a reintrodução em áreas de preservação, ou mesmo produção de mudas para a comercialização, reduzindo a demanda por plantas extraídas da natureza, possuem alta relevância para a preservação das espécies. Assim, com este trabalho objetivou-se isolar fungos micorrízicos associados às raízes de duas espécies, pertencentes à subtribo Catasetinea, e utilizá-los na germinação simbiótica das sementes de tais espécies.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Subtribo Catasetinae

Segundo Pridgeon et al. (2009), Catasetinae pertence à subfamília Epidendroideae e é composta por sete gêneros, que crescem desde o nível do mar até áreas de mais de 1.000 metros de altura. As espécies que compõem esta subtribo apresentam crescimento simpodial, pseudobulbos desenvolvidos (especializados na reserva de água) e suas folhas caem após maturação (Dodson, 1975). As raízes são revestidas por um velame, que é responsável pelas funções de fotossíntese, trocas gasosas, fixação e absorção de nutrientes que vem de substâncias orgânicas ou de líquidos. Em alguns gêneros podem ser observadas nas raízes, ramificações bifurcadas e eretas, de geotropismo negativo, as quais apresentam funções análogas a pneumatóforos (Hoehne 1949).

2.2 O gênero *Cyrtopodium* spp.

Um dos principais gêneros de Orchidaceae presentes no Cerrado brasileiro é o *Cyrtopodium* spp., sendo composto por espécies de habitats epifítico, terrícola e rupícola. O gênero foi descrito por Robert Brown, em 1813, na obra Hortus Kewensis (MENEZES, 2000) e segundo a classificação morfológica de Dressler (1993), pertenceria à subfamília Epidendroideae, tribo Cymbidieae e subtribo Cyrtopodiinae. Porém, em trabalho de classificação filogenética, com base em estudos de filogenia molecular, Pridgeon e Chase (1998), demonstraram que Cyrtopodiinae é grupo parafilético em relação à Catasetinae, levando Chase et al. (2003), a desconsiderarem o grupo e a redistribuírem seus membros entre as subtribos Cymbidiinae, Eulophinae e Catasetinae. Assim, o gênero *Cyrtopodium* passou a compor a subtribo Catasetinae.

Embora sejam encontradas espécies pertencentes a este gênero em boa parte do continente americano, sua maior concentração ocorre no Centro-Oeste brasileiro, área de predomínio do Bioma Cerrado (MENEZES, 2000). Romero-González et al. (2008), afirmam que são aceitas para o gênero 50 espécies, das quais, 39 ocorrem no Brasil, sendo 26 endêmicas e que, para o Cerrado, são descritas 33 espécies.

2.3 *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne

Trata-se de uma espécie encontrada principalmente em áreas de brejo nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. Apresenta pseudobulbos alongados, chegando a medir 40 cm de comprimento. As flores, de coloração amarela, podem medir cerca de 3,8 cm de diâmetro, e estão dispostas em inflorescências simples ou pouco ramificadas, as quais podem atingir até 2 m de altura. A floração ocorre entre os meses de dezembro e abril (MENEZES, 2000).

2.4 *Cyrtopodium saintlegerianum* Richb.f.

Espécie epífita, típica da região Centro-Oeste, *C. saintlegerianum* apresenta pseudobulbos fusiformes longos, que podem medir até 70 cm de comprimento. As inflorescências são paniculadas, com flores amarelas, manchadas com tons de marrom, que medem cerca de 2,8 cm de diâmetro. A floração ocorre entre os meses de julho e agosto (Menezes 2000).

2.5 Relação simbiótica planta – fungo

A relação simbiótica entre orquídeas e fungos foi inicialmente relatada por Bernard em 1909 (SELOSSE et al., 2011). Para a maioria dos membros da família Orchidaceae, as sementes são diminutas, medindo entre 0,4 a 1,25 mm de comprimento, 0,08 a 0,27 mm de largura e massa de 3 a 14 µg, e apresentam muito pouco tecido de reserva de nutrientes, como endosperma ou cotilédone, fragilizando o processo germinativo (ARDITTI, 1992; RASMUSSEM, 1995; PETERSON, et al., 1998; OTERO, et al., 2005). O embrião é minúsculo, simples e indiferenciado. Formado por poucas células parenquimatosas de reserva de compostos, principalmente lipídicos, constituindo um pequeno corpo elipsoidal. Não apresenta regiões meristemáticas apicais. Encontra-se suspenso dentro de uma testa, reticulada ou rendada, cercado por um grande volume de ar (ARDITTI, 1992).

O desenvolvimento do embrião origina uma estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, denominada protocormo, cujo tamanho pode variar de 2 a 24 mm de comprimento por 2 a 10 mm de largura, o qual é constituído por um conjunto de células parenquimáticas, recobertas por uma epiderme uni-estratificada. Apresentam regiões apical e basal, não possuem tecidos vasculares e seu desenvolvimento dará origem à plântula. Além disso, na superfície da epiderme do protocormo de muitas espécies de orquídeas, observa-se, nas porções basal e apical, estruturas

semelhantes a pêlos denominadas de rizóides ou tricomas, as quais podem estar associadas à fixação inicial de espécies epifíticas ao substrato, assim como, com a absorção de nutrientes (ARDITTI, 1992; PETERSON et al., 1998).

Em suma, o protocormo pode ser definido como uma estrutura (tubérculo) efêmera, oriunda do processo germinativo da semente, o qual dá origem aos meristemas caulinar e foliar, após sua associação com fungos micorrízicos apropriados, originando posteriormente a plântula (PRIDGEON et al., 1998; CRIBB, 1999 apud KRAUS et al., 2006). Porém, o momento exato do início e do fim do estágio de protocormo não está ainda bem claro entre os pesquisadores da área (KRAUS et al., 2006).

O processo germinativo das sementes apresenta um padrão, no qual o passo inicial é o intumescimento da semente, com posterior ruptura da testa, liberação do embrião e formação do protocormo (ARDITTI, 1992).

Sob condições naturais, a semente permanecerá no estágio de protocormo, até que ocorra a infecção e colonização deste por microrganismos ali presentes, os chamados fungos micorrízicos, que se associam simbioticamente ao protocormo, promovendo a formação da gema vegetativa e seus primórdios foliares (HARRISON, 1977 apud. KRAUS, 2006) e posteriormente das raízes, após a formação de várias folhas (ARDITTI, 1992). Assim, a simbiose pode ser caracterizada como um importante fator na distribuição geográfica das orquídeas (MCKENDRICK et al., 2002; PETERSON et al., 2004).

Para a germinação *in vitro* (assimbiótica), o processo irá ocorrer de forma semelhante ao natural, desde que seja adicionada ao meio uma fonte de carboidrato. No entanto, em condições adequadas (luminosidade, umidade, temperatura), tal processo irá demandar um tempo menor (HARRISON, 1977 apud. KRAUS, 2006; ARDITTI, 1992).

2.6 Fungos micorrízicos

Os principais fungos orquidóides descritos pertencem, usualmente ao gênero-forma polifilético *Rhizoctonia* (Filo Basidiomycota), que inclui fungos patogênicos, endofíticos, saprofíticos e micorrízicos (RASMUSSEN, 1995; OTERO et al., 2002; VALADARES et al., 2011). *Rhizoctonia* foi descrito por De Candolle em 1815 (OGOSHI, 1996 apud PEREIRA; KASUYA, 2010), sendo fungos filamentosos, com fases anamórfica (assexual, não produtora de esporos) e teleomórfica (sexual), as

quais podem ser subdivididas entre sete ou oito gêneros, dependendo do autor (ROBERTS, 1999 apud. VALADARES, 2011), como observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Sinopse taxonômica do gênero-forma *Rhizoctonia*, com separação dos gêneros, anamórfico e teleomórfico, reconhecidos atualmente

Anamorfo	Teleomorfo
<i>Ascorhizoctonia</i> Yang e Korf	<i>Tricharina</i> Eckblad
<i>Ceratorhiza</i> R.T. Moore	<i>Ceratobasidium</i> D.P. Rogers
<i>Chrysorhiza</i> Andersen e Stalpers	<i>Waitea</i> Warcup e Talbot
<i>Epulorhiza</i> R.T. Moore emend Andersen e R.T. Moore	<i>Tulasnella</i> Shoröeter
<i>Opadorhiza</i> Andersen e R.T. Moore	<i>Sebacina</i>
<i>Moniliopsis</i> Ruhland. (Sin. = <i>Rhizoctonia</i> D.C.)	<i>Thanatephorus</i> Donk
<i>Tanatophytum</i> Nees.	<i>Helicobasidium</i> Pat.

Adaptado de González García et al. (2006)

O gênero-forma *Rhizoctonia*, em sua fase anamórfica (assexual), apresenta as seguintes características morfológicas: micélio estéril incolor, que escurece de acordo com seu envelhecimento; células longas e retas formando ângulo de 90° com a hifa principal podendo apresentar constrições na região dos septos. Ainda, em condições favoráveis, o fungo poderá produzir células curtas e largas, de formato oval ou triangular, as chamadas células monilióides, as quais podem desenvolver pequenos escleródios, sendo esses, estruturas de resistência (AGRIOS, 2005; PEREIRA; KASUYA, 2010).

A infecção da planta pelo fungo pode se dar, pelo contato direto da hifa com as células suspensoras, radículas ou células basais (ZELMER *et al.*, 1996). Sendo a associação micorrízica caracterizada principalmente pela formação de estruturas fúngicas adensadas no interior das células parenquimáticas, denominadas *pelotons* ou *novelos* (HADLEY; WILLIAMSON, 1972; SMITH; READ, 2008; ZETTLER, 1997; PETERSON *et al.*, 2004).

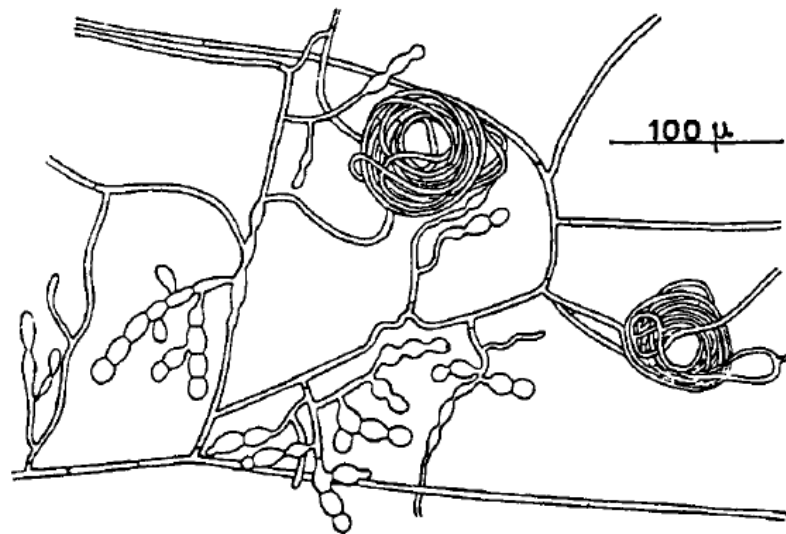


Figura 1 - Estrutura típica de fungos micorrízicos (Bernard, 1909)

2.7 Nutrição: do embrião à planta adulta

Segundo Cameron et al. (2006), a relação simbiótica entre o fungo e a orquídea, caracteriza-se como uma relação mutualística, na qual ocorre transferência de carbono em sentido bidirecional, sendo as micorrizas responsáveis pela provisão contínua de açúcares solúveis simples como a glicose, vitaminas, minerais e de outros fatores imprescindíveis ao processo germinativo (ARDITTI, 1992; HADLEY, WILLIAMSON, 1972; PETERSON et al., 2004; DEARNALEY, 2007). A micorriza também irá atuar na provisão de níveis adequados de água para a germinação e o desenvolvimento do protocormo, garantindo maior resistência à dessecação (YODER et al., 2000 apud VALADARES et al., 2011). A presença do fungo expande a superfície de troca de nutrientes melhorando o acesso à água e aos sais minerais (OSORIO-GIL et al., 2008; DEARNALEY et al., 2012; NURFADILAH et al., 2013).

Em condições naturais ou para o cultivo simbiótico *in vitro*, a nutrição do protocormo se dá de forma mico-heterotrófica pela utilização de produtos oriundos da digestão enzimática dos *pelotons*, a qual irá ocorrer até o estabelecimento da fase autotrófica (fase fotossintetizante). Para algumas espécies, a mico-heterotrofia poderá perdurar por toda a vida da planta (orquídeas aclorofiladas) ou estar associada à condição de autotrofia, sendo assim denominada de mixo-heterotrofia (ARDITTI, 1992; RASMUSSEM, 1995; DEARNALEY, 2007; OTERO et al., 2005). As condições de heterotrofia e mixo-heterotrofia são caracterizadas como um estado de

dependência do hospedeiro ao microrganismo (HADLEY, 1982; MCKENDRICK et al., 2000; MARCEL et al., 2003).

Contudo, para a maioria das espécies, nem todos os enovelados fúngicos são degradados. Os *pelotons* presentes na região mais externa do córtex mantêm-se intactos, e servirão de inóculo para a recolonização da região cortical mais interna, podendo tal fenômeno estar relacionado à persistência da associação simbiótica (ZELMER et al., 1996). Já em condições de cultivo assimbiótico, os nutrientes necessários ao desenvolvimento do protocormo, deverão ser fornecidos pelo meio de cultura adequado, sendo importante a participação dos rizóides nesse processo, porém não essencial (ARDITTI, 1992).

A relação planta-fungo pode ser definida como a amplitude filogenética de fungos a que uma espécie em particular de orquídea seria capaz de se associar (THOMPSON, 1994 apud PEREIRA; KASUYA, 2010). Tal relação pode ser de compatibilidade ou especificidade, sendo em sua maioria, de compatibilidade (HADLEY; PEGG, 1989 apud PEREIRA; KASUYA, 2010). O fator especificidade, associado à variação genética interespecífica da orquídea e da micorriza e a fatores abióticos (como o habitat, temperatura, substrato, altitude, região geográfica) podem influenciar diretamente no estabelecimento da simbiose (RASMUSSEN, 1995).

2.8 A importância da germinação simbiótica

O entendimento da natureza dessa relação, quanto à especificidade ou compatibilidade, faz-se necessário para o desenvolvimento de programas eficientes de propagação simbiótica de orquídeas, com vistas à reintrodução de espécies ameaçadas de extinção em seus habitats naturais (ZETTLER, 1997,1998) ou mesmo para produção de mudas de interesse comercial (VALADARES et al., 2011; PEREIRA et al., 2011).

3 REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005. 922 p.
- ARDITTI, J. **Fundamentals of Orchid Biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 691p.
- BARROS, F. et al. **Checklist das Orchidaceae do Estado do Mato Grosso do Sul**. In: Reunião Anual do Instituto de Botânica, 19., 2012, São Paulo. Anais... São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, 2012. 1 CD-ROM.
- BARROS, F. de. et al. *Orchidaceae*. in: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 09 abr. 2015.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Mapeamento de Cobertura Vegetal do Bioma Cerrado**. Disponível em: <http://mapas.mma.gov.br/geodados/brasil/vegetacao/vegetacao2002/cerrado/documentos/relatorio_final.pdf>. Acesso em: 09 abr. 2015.
- CAMERON, D. D.; LEAKE, J. R.; READ, D. J. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **New Phytologist**, v.171, n.2, p. 405-416, 2006.
- CHASE, M. W. et al. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In Dixon, K. W. et al. (Org.). **Orchid conservation**. Borneo: Natural History Publications, 2003. p. 69-89.
- DEARNALEY, J. D. W. Further advances in orchid mycorrhizal research. **Mycorrhiza**, v.17, n. 6, p. 475–486, 2007.
- DEARNALEY, J. D. W.; MARTOS, F.; SELOSSE, M.-A. Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. In: Hock, B. (Org.). **The Mycota**, vol. IX. Berlin: Springer. 2012.
- DODSON, C. H. *Dressleria* and *Clowesia*: a new genus and an old one revived in the Catasetinae. **Selbyana**, v.1, n. 2, p. 130-137, 1975.
- DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. 330p.
- GARCÍA, V. G.; ONCO, M. A. P.; SUSAN, V. R. Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 1, p. 55-79, 2006.
- HADLEY, G.; WILLAMSON, B. Features of mycorrhizal infections in some Malayan orchids. **New Phytologist**, v. 71, n. 6, p. 1111-1118, 1972.
- HADLEY, G. Orchid Mycorrhiza. In: Arditti, J. (Ed.). **Orchid Biology: Reviews and perspectives II**. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1982. p. 83 -118.

- HOEHNE, F. C. **Iconografia de Orchidaceae do Brasil**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1949. 601 p.
- 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.
- MARCEL, G. A. et al. Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plant. **New Phytologist**, v. 157, n. 3, p. 569–578, 2003.
- MCKENDRICK, S. L. et al. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.145, n. 3, p. 523-537, 2000.
- MCKENDRICK, S. L. et al. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. **New Phytologist**, v. 154, n. 1, p. 233-247, 2002.
- MENEZES, L. C. **Orquídeas genus *Cyrtopodium***: espécies brasileiras, brasilian species. Brasília: Ed. IBAMA, 2000. 208p.
- NURFADILAH, S. et al. Variation in nutrient-acquisition patterns by mycorrhizal fungi of rare and common orchid explains diversification in a global biodiversity hotspot. **Annals of Botany**, v. 111, n. 6, p. 1233-1241, 2013.
- OSORIO-GIL, E. M.; FORERO-MONTANA, J.; OTERO, J. T. Variation in mycorrhizal infection of the epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae) on different substrata. **Caribbean Journal of Science**, v. 44, n. 1, p. 130-132, 2008.
- 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.
- OTERO, J. T.; BAYMAN, P.; ACKERMAN, J. D. Variation in mycorrhizal performance en the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* in vitro: the potential for natural selection. **Evolutionary Ecology**, v. 19, n. 1, p. 29-43, 2005.
- PEREIRA, M. C. et al. Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*. **Acta Botanica Brasilica**, v.25, n.3, p. 534-541, 2011.
- PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M. Micorrizas em orquídeas. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Ed.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, 2010. p. 583-613.
- PETERSON, R. L.; UETAKE, Y.; ZELMER, C. Fungal symbiosis with orchid protocorms. **Symbiosis**, v. 25, p. 29-55, 1998.

PETERSON, R. L.; MASSICOTTE, H. B.; MELVILLE, L. H. **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. Ottawa: NRC Research Press, 2004. 173 p.

PRIDGEON, A. M.; CHASE, M. W. Phylogenetics of subtribe Catasetinae (Orchidaceae) from nuclear and chloroplast DNA sequences. In: PEREIRA, C. E. B. (Org.). **Proceedings of the 15th World Orchid Conference, Rio de Janeiro, 1996**. Turriers, France: Naturalia Publications, 1998. p. 275-281.

PRIDGEON, A. M. et al. (Ed.). **Genera Orchidacearum. v. 5: Epidendroideae (Part II)**. Oxford: Oxford University Press., 2009. 585 p.

RASMUSSEN, H. N. **Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant**. New York: Cambridge University Press, 1995. 444p.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 89-166.

ROMERO-GONZÁLEZ, G. A.; BATISTA, J. A. N.; BIANCHETTI, L. B. A Synopsis of the Genus *Cyrtopodium* (Catasetinae: Orchidaceae). **Harvard Papers in Botany**, v. 13, n. 1, p. 189-206, 2008.

SELOSSE, M.-A.; BOULLARD, B.; RICHARDSON, D. Noël Bernard (1874–1911): orchids to symbiosis in a dozen years, one century ago. **Symbiosis**, v. 54, n. 2, p. 61-68, 2011.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. San Diego: Academic Press, 2008. 605p.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, 768p.

VALADARES, R. B. et al. Narrow Fungal Mycorrhizal Diversity in a Population of the Orchid *Coppensia doniana*. **Biotropica**, v. 44, n.1, p. 114-122, 2011.

ZELMER, C. D.; CURTHBERTSON, L.; CURRAH, R. S. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. **Mycoscience**, v. 37, n. 4, p. 439-448, 1996.

ZETTLER, L. W. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. **Selbyana**, v. 18, n. 2, p. 188–194, 1997.

ZETTLER, L. W.; HOFER, C. J. Propagation of the little club-spurorchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. **Environmental and Experimental Botany**, v. 39, n. 3, p. 189-195, 1998.

CAPÍTULO 1

Isolamento, identificação e inoculação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados à *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne (Orchidaceae – Catasetinae)

RESUMO

A simbiose entre as sementes de orquídeas e micorrizas tem sido relatada como fator determinante no sucesso germinativo e no desenvolvimento dos protocormos *in situ*. Porém, existem poucas informações acerca da natureza da relação planta-fungo, para espécies pertencentes à subtribo Catasetinea. Assim, com este trabalho objetivou-se isolar e identificar fungos micorrízicos associados à *Cyrtopodium paludicolum* e utilizá-los na germinação das sementes dessa espécie. O isolado foi obtido por meio da inoculação de secções de córtex da raiz, em meio Batata Dextrose Agar (BDA) e posteriormente denominado de CH01. A identificação foi por meio da análise molecular da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr (DNA ribossômico) do fungo, e mostrou tratar-se de espécie pertencente ao gênero *Tulasnella*. Para a avaliação do desempenho do isolado na indução do processo germinativo das sementes de *C. paludicolum*, dois experimentos foram instalados, um incubado na presença e outro incubado na ausência de luz. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3, definido por dois fatores: meio de cultura aveia-ágar (com presença e ausência de carvão ativado) e fungo (CH01, M65 e assimbiótico). As variáveis avaliadas foram o percentual de germinação e o índice de crescimento (IC), baseados nos diferentes estádios de desenvolvimento do embrião. A metodologia utilizada para o isolamento do fungo foi eficiente. Não foi detectada relação especificidade entre a *C. paludicolum* e o isolado CH01. Os isolados apresentaram variações em sua eficiência em função do ambiente no qual foram incubados. A inoculação dos fungos micorrízicos beneficiou o processo germinativo e o IC das sementes. Na presença da luz, o CH01 mostrou-se mais eficiente, já na ausência da

luz, isso ocorreu para o M65. A presença do carvão ativado no meio influenciou positivamente as taxas germinativas e de IC, no escuro.

PALAVRAS-CHAVE: orquídea, micorrizas, germinação simbiótica, ITS-DNAr.

ABSTRACT

The symbiosis between orchid seeds of mycorrhizal fungi has been reported as a determining factor in the successful germination and protocorm development on *in situ* conditions. However, little information about the nature of plant-fungus relationship, for species belonging to the subtribe Catasetinae has been found in the literature. Thus, this work aimed to isolate and to identify mycorrhizal fungi associated with *Cyrtopodium paludicolum* and use them on the symbiotic seeds germination of this species. The fungus isolation was obtained by inoculation of orchid root cortex sections on Potato Dextrose Agar medium (PDA), and the isolated fungi was named CH01. The fungus identification was through molecular analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region (ribosomal DNA) of the fungus, and showed that this is a species belonging to the *Tulasnella* genus. For the performance evaluation of the isolated fungus on symbiotic germination of *C. paludicolum* seeds, two experiments were conducted, one incubated in light presence and other incubated in the dark. The experiment design was the completely randomized in a 2x3 factorial design, defined by two factors: half of oatmeal agar culture (with and without activated charcoal) and fungi (CH01, M65 and asymbiotic). The variables evaluated were the germination percentage and growth index (CI), based on different embryonic developmental stages. The methodology used for isolation of the fungus was efficient. No specificity relationship was detected between the *C. paludicolum* and the isolated fungus CH01. The CH01 showed variations in the germination efficiency in relation to the environment in which they were incubated. Inoculation of mycorrhizal fungi benefited the germination process and the IC seeds. In the light presence, the CH01 was more efficient, since that in the absence of light, the M65 was more efficient. The activated

charcoal presence in the culture medium positively influenced the seed germination and IC rates on dark culture conditions.

.KEY WORDS: orchid, mycorrhiza, symbiotic germination, ITS-DNAr

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae caracteriza-se por apresentar sementes diminutas e que possuem pouca ou nenhuma reserva nutricional, o que fragiliza a germinação. Porém, em seu habitat natural existem fungos micorrízicos, microrganismos que se associam simbioticamente às sementes, otimizando o processo germinativo (Arditti 1992, Rasmussen 1995, Peterson et al. 1998). Trata-se de uma relação mutualística, não parasitária, na qual ocorre transferência de carbono em sentido bidirecional (Cameron et al. 2006). A infecção da semente pelo fungo, é caracterizada principalmente pela formação de estruturas fúngicas adensadas no interior das células parenquimáticas, denominadas *pelotons* ou *novelos* (Smith e Read 2008, Zettler 1997, Peterson et al. 2004). No entanto, fatores como variações na temperatura, variações genéticas interespecíficas da orquídea e da micorriza e a relação de especificidade fungo-planta, podem influenciar diretamente o estabelecimento da simbiose (Otero et al. 2005).

As micorrizas são responsáveis pela provisão contínua de açúcares solúveis simples (como a glicose), de vitaminas, de minerais, de água e de outros fatores imprescindíveis à germinação da semente (Peterson et al. 2004, Dearnaley 2007). No estágio posterior à germinação, denominado de protocormo, a nutrição ainda ocorre de forma mico-heterotrófica, agora pela utilização de produtos oriundos da digestão enzimática dos *pelotons*, a qual irá ocorrer até o estabelecimento da fase autotrófica (fotossintetizante). Entretanto, para algumas espécies, a mico-heterotrofia poderá perdurar por toda a vida da planta (Rasmussen 1995), o

que segundo Hadley (1982), é caracterizado como um estado de dependência do hospedeiro ao microrganismo.

Na cultura de tecidos tem-se observado que algumas espécies possuem barreiras para sua multiplicação por via assimbiótica, sugerindo assim, a necessidade da associação com fungos micorrízicos, como ocorre na natureza (Pereira e Kasuya 2010). Os meios de cultura usualmente empregados na germinação assimbiótica de orquídeas, *in vitro*, constituem-se basicamente de macro e micronutrientes, vitaminas e açúcares, podendo ser acrescidos de reguladores de crescimento vegetal, tais como auxinas, citocininas, giberelinas, etc. Enquanto que na germinação simbiótica os meios são constituídos de ágar e de algum outro ingrediente que seja fonte de açúcares simples para a nutrição dos fungos, como aveia, celulose, canjica de milho e outros. Cada vez mais se tem observado uma maior eficiência em termos de germinação e conversão em protocormos no cultivo simbiótico, se comparado ao assimbiótico, normalmente empregado para a propagação de espécies da família Orchidaceae.

O entendimento da natureza dessa relação, em termos de especificidade ou compatibilidade, faz-se necessário para o desenvolvimento de programas eficientes de propagação simbiótica de orquídeas, com vistas à reintrodução de espécies ameaçadas de extinção em seus habitats naturais (Zettler 1997, Zetler e Hofer 1998) ou mesmo para produção de mudas de interesse comercial (Valadares et al. 2011, Pereira et al. 2011).

A obtenção do fungo micorrízico, com vistas a utilização em experimentos de germinação simbiótica, resulta do isolamento de *pelotons* viáveis, retirados do interior de células parenquemáticas, da região cortical das raízes das orquídeas. Sendo sua identificação feita tanto pela avaliação da estrutura morfológicos, quanto, por técnicas de biologia molecular.

A espécie escolhida para este trabalho foi a *Cyrtopodium paludicolum* a qual pertence à subfamília Epidendroideae, tribo Cymbidieae e subtribo Catasetinae (Chase et al. 2003).

Trata-se de uma espécie terrícola encontrada principalmente em áreas de brejo nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. Seus pseudobulbos são longos podendo medir até 40 cm de comprimento. As inflorescências, de até 2 m de altura, são simples (raramente ramificadas), apresentam flores de coloração amarela com manchas amarronzadas, que medem cerca de 3,8 cm de diâmetro (Menezes 2000). Em função da beleza de suas inflorescências vistosas, *C. paludicolum* tem atraído a atenção de colecionadores e do mercado de plantas ornamentais, tornando-a alvo do extrativismo, o que aliado a fatores como o desmatamento excessivo do Cerrado, o baixo sucesso reprodutivo e o habitat restrito, pode levar a espécie à extinção.

Assim, com este trabalho objetivo-se isolar fungo micorrízico associado à espécie *C. paludicolum*, identificá-lo e testá-lo na germinação de sementes desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal

Plantas adultas e cápsulas maduras de *C. paludicolum* foram coletadas de população encontrada na Fazenda Cachoeira (Latitude 18°35'10.64"S; Longitude 53°02'11.78"O; Elevação 719 m), no município de Chapadão do Sul (Figura 1), área de Domínio do Cerrado. As amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas e levadas ao Laboratório de Biotecnologia (LABTEC) do Campus Chapadão do Sul da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS.

Em ambiente esterilizado (fluxo laminar) as cápsulas foram abertas e as sementes depositadas em tubos de ensaio contendo sílica gel e em seguida, armazenadas em refrigerador à temperatura de 4°C.



Figura 1. Área de coleta do material botânico, plantas saudias e cápsulas maduras, de *C. paludicolum*

Isolamento

Amostras de raízes foram extraídas das plantas coletadas, lavadas em água corrente e segmentadas em fragmentos de aproximadamente 3 cm. Para a detecção da presença de *pelotons*, cortes transversais foram obtidos manualmente, com auxílio de lâmina de barbear e observados ao microscópio óptico. Detectada a presença de *pelotons*, os segmentos radiculares passaram por desinfestação superficial através de imersão em etanol 70% (v/v), durante 1 minuto e, posteriormente, em solução de hipoclorito de sódio comercial (2% de cloro ativo), por 6 minutos. Em seguida, procedeu-se lavagem em água destilada esterilizada, por três vezes, sob agitação manual.

Em ambiente esterilizado (fluxo laminar) os segmentos colonizados das raízes foram seccionados transversalmente e, com o auxílio de agulhas hipodérmicas, 5 fragmentos do parênquima cortical, com presença de *pelotons*, foram transferidos para placas de Petri contendo 50 mL de meio Batata Dextrose Ágar – BDA (adaptado de Riker e Riker 1936), obtido do caldo do cozimento de 200 g L⁻¹ de batata, acrescido de 15 g L⁻¹ de glicose e 7 g L⁻¹ de Ágar. O pH foi ajustado para 5,6. Dez placas foram incubadas em B.O.D no escuro, à

temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e observadas diariamente em microscópio estereoscópico para a verificação do crescimento do micélio fúngico, a partir dos *pelotons*. O isolado obtido foi repicado para meio BDA e mantido sob as mesmas condições acima descritas.

Identificação

O isolado fúngico obtido de *C. paludicolum* foi enviado ao Laboratório de Associações Micorrízicas da Universidade Federal de Viçosa, para realização de procedimentos de identificação molecular. Inicialmente, o micélio fúngico foi liofilizado e a extração total de DNA realizada com o Kit NucleoSpin® Soil (MachereyNagel) de acordo com as instruções do fabricante. Para a avaliação da integridade do DNA, utilizou-se gel de agarose (0,8%) e a quantificação efetuada por espectrofotometria. O DNA extraído foi submetido ao PCR utilizando-se os *primers* ITS1 e ITS4 (White et al. 1990) para a amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr (DNA ribossômico) do fungo. Para cada reação utilizou-se 25 ng de DNA, de acordo com especificações do fabricante. O anelamento de *primers* foi a 95°C durante 2 min, seguidos de 39 ciclos a 95°C durante 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min e a extensão final foi a 72°C durante 10 min. Foram utilizados dois controles: um controle negativo, utilizando-se uma mistura de PCR sem molde de DNA e outro positivo, utilizando-se uma mistura de PCR com um DNA testado. O sucesso das amplificações de PCR foi testado em gel de agarose (1,5%), corado com solução de brometo de etídio $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram enviadas para o sequenciamento à MacroGen Inc., na Coreia do Sul. Os *reads* oriundos do sequenciamento foram montados utilizando o software *Sequencher* 4.1.4 e a sequência resultante foi comparada com outras sequências depositadas no banco de dados do GenBank através da ferramenta BLAST.

Inoculação dos fungos micorrízicos

Dois experimentos foram realizados, um incubado no escuro, em B.O.D, à temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e o outro submetido a fotoperíodo de 16 horas de escuro e à temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em sala de crescimento. Ambos os experimentos foram instalados utilizando-se um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3 (meio de cultura com e sem carvão ativado e dois inoculantes de fungos micorrízicos + tratamento assimbiótico), perfazendo um total de 6 tratamentos, constituídos de cinco repetições. O meio utilizado foi o aveia ágar (4 g L⁻¹ de aveia, 10 g L⁻¹ de ágar, pH 5,6, modificado de Dixon, 1987), em duas variações: meio puro e acrescido de 2 g L⁻¹ de carvão ativado.

Para a desinfestação, as sementes previamente armazenadas, foram imersas em solução de hipoclorito 20% (0,5% de cloro ativo), durante 10 minutos, seguida de tríplice lavagem, utilizando-se água destilada esterilizada. As sementes foram mantidas em suspensão em 50 mL de água destilada e esterilizada, e 400 µL foram inoculados sobre um disco de papel Germitest[®] de 6 cm, previamente esterilizado, disposto centralmente, nas placas contendo 20 mL do meio de cultura. Os discos de papel serviram para delimitar o perímetro a ser avaliado. Para os tratamentos de germinação simbiótica, foi adicionado, a cerca de 6 cm do disco de papel, um disco, de aproximadamente 5 mm de diâmetro, dos isolados contendo micélio fúngico, retirado da margem da cultura. As placas foram seladas com filme PVC.

Os isolados utilizados foram o CH01, obtido da própria espécie e o M65 (Pereira et al. 2009), isolado pertencente ao gênero *Epulorhiza* sp. da coleção de fungos micorrízicos de orquídeas do Laboratório de Associações Micorrízicas (BIOAGRO/UFV).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, definido por dois fatores: meio de cultura aveia-ágar (com presença e ausência de carvão ativado) e fungo micorrízico (CH01, M65 e assimbiótico).

Caracterização da associação micorrízica

Cortes transversais de protocormos dos dois tratamentos simbióticos, no estágio de desenvolvimento 2 (semente germinada, podendo ou não apresentar rizóides), foram utilizados para a caracterização da associação micorrízica, por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a microscopia óptica, foram realizados cortes do material a fresco, montados cuidadosamente em lâmina e lamínula, com água destilada e fotografados por câmera digital acoplada a um microscópio óptico. Já para a MEV os protocormos foram submetidos a um processo de desidratação etanólica crescente (de 5 a 95% v/v, por 1 hora cada). Posteriormente, foram feitos corte transversais manuais com auxílio de lâmina de barbear, os quais foram levados à estufa para secagem (35°C, durante 24 horas). Os cortes obtidos foram montados em porta amostras (condutores de eletricidade), recobertos por uma camada fina de ouro pelo método de Sputtering. As imagens foram capturadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Campus Campo Grande.

Avaliação

O experimento foi avaliado, com o auxílio de estereomicroscópio, 30 dias após a inoculação. Avaliou-se a área de 6 cm, previamente definida. Foram considerados 3 estádios distintos para caracterização do processo de germinação e desenvolvimento de protocormos: sementes com embrião viável, não intumescido, não germinadas (estádio 0); sementes com embrião desenvolvido ainda no interior da testa, não germinadas (estádio 1); sementes germinadas, cujo embrião rompeu a testa, podendo ou não apresentar rizóides (estádio 2), adaptado de Bektas et al. (2013).

Os dados coletados foram utilizados para geração dos seguintes parâmetros: percentual total de sementes germinadas e o índice de crescimento – IC. Os valores para percentual total

foram obtidos a partir do estágio 2. Para a execução da análise de variância (ANOVA), foi utilizado o Software Assistat (7,7 beta) as médias foram comparadas pelo teste Tukey (5%). O IC baseou-se nos estádios 0, 1 e 2 e foi calculado a partir da seguinte fórmula: $IC = (N1 + N2 \times 2) / (N0 + N1 + N2)$, sendo N o número de sementes em cada um dos 3 estádios (Otero et al. 2002, 2004, 2005). Os dados, quanto a germinação, referentes aos tratamentos mantidos no escuro foram transformados a partir da seguinte fórmula: $1/\sqrt{x}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A observação de cortes transversais demonstrou a presença de enovelados fúngicos no interior das células corticais das raízes de *Cyrtopodium paludicolum*. Os *pelotons* observados localizavam-se na região central do córtex, e apresentavam-se intactos ou parcialmente degradados (Figura 2A). Não foram encontrados, na literatura, relatos de estudos científicos da associação micorrízica para *C. paludicolum*, sendo a presente caracterização a segunda realizada para o gênero *Cyrtopodium* spp.

Das dez placas inoculadas, seis contaminaram. Esse alto índice está relacionado à baixa eficiência da desinfestação superficial das raízes, além disso, fatores como a idade da raiz e o posicionamento dos *pelotons* dentro do tecido cortical, podem ter influenciado negativamente no crescimento das hifas fúngicas (Zhu et al. 2008).

O isolamento resultou na obtenção do fungo denominado de CH01 (Figura 2B). Por meio de microscopia óptica foram observadas diversas características morfológicas, as quais são intrínsecas à maioria dos fungos micorrízicos de orquídeas, como: micélio estéril incolor, células longas, ramificações em ângulos de 90° em relação à hifa principal, presença de septos e de células monilióides (Figura 2C).

O resultado da análise molecular, da sequência do DNAr (DNA ribossômico) da região ITS, mostrou que CH01 pertence ao gênero *Tulasnella* (Tabela 1), porém o mesmo não

pode ser identificado em nível de espécie. Segundo Pereira et al. (2014), o gênero é composto por fungos filamentosos e binucleados. Sendo descritas espécies saprofíticas, além das micorrizas de orquídeas. *Tulasnella* é uma das fases telemórficas do gênero-forma *Rhizoctonia* e está entre os principais gêneros simbiotes das orquídeas (Mosquera-Espinosa et al. 2010).

Tabela 1. Afiliação Filogenética de Unidade Taxonômica Operacional (OTU) no filo dos Basidiomicetos

OTU	Comprimento da sequência (pb)	Relações Filogenéticas		
		Família	Correspondência mais próxima no GenBank (n° de adesão)	Identidade de sequência (%)
CH01	575	Tulasnellaceae	KP973894	94%

Em trabalhos anteriores, o gênero foi isolado das espécies *Stelis hallii*, *S. Superbiens*, *S. concinna* e *Pleurothallis lilijae* (Suárez et al. 2006), *Spathoglottis affinis* e *Eulophia spectabilis* (Chutima et al. 2011), *Dendrobium nobile* (Chen 2012), bem como em espécies pertencentes aos gêneros *Vanilla* (Otero et al. 2013) e *Epidendrum* (Pereira et al. 2014). Porém, muitos dos fungos isolados de espécies de orquídeas, no Brasil, pertencem a seu respectivo anamórfico, o gênero *Epulorhiza* (Pereira et al. 2005, Nogueira et al. 2005, Pereira et al. 2009, Gonçalves et al. 2014).

Aos 30 após a inoculação as sementes encontravam-se, para todos os tratamentos, em três estádios distintos (Figura 2D), 0, 1 e 2, sendo apenas o estádio 2 caracterizado como germinado propriamente dito. A observação por microscopia óptica e eletrônica de varredura, de cortes de protocormos germinados simbioticamente no estádio 2, comprovou a colonização das células corticais pelas hifas dos fungos micorrízicos. Os *pelotons* observados se encontravam em estádios que iam desde intactos (Figura 2E), até parcialmente degradados (Figura 2 F).

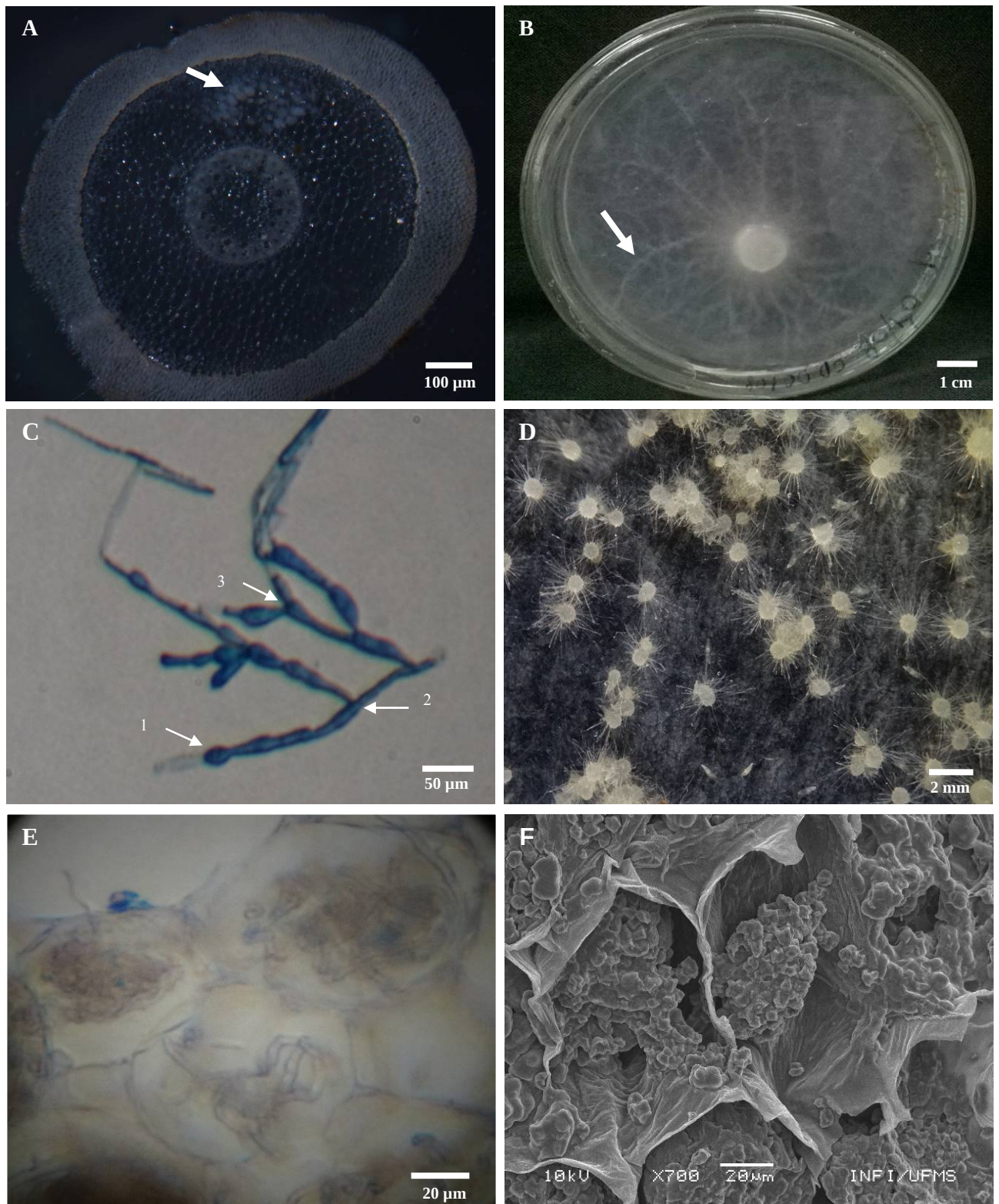


Figura 2. A – Corte transversal da raiz de *C. paludicolum* caracterizando a colonização; B - Isolado CH01 em meio de cultura BDA com hifas (seta) bem desenvolvidas; C – Hifas fúngicas, com setas evidenciando presença de células monilióides (1); ângulo de 90° (2); septos (3); D – Estádio 2 de desenvolvimento das sementes de *C. paludicolum*, obtidos em meio simbiótico com isolado CH01; E e F – Imagens de microscopia óptica (E) e eletrônica de varredura (F) de células corticais de protocormos de *C. paludicolum* em estágio de desenvolvimento 2, obtidos em meio simbiótico com isolado CH01 evidenciando presença de enovelado de hifas fúngicas (*pelotons*) viáveis em E e parcialmente degradado em F.

A análise dos dados obtidos no experimento mantido sob fotoperíodo demonstrou ausência de interação entre os fatores fungo (presença ou ausência) e meio de cultura (presença ou ausência de carvão). Porém, houve significância para o fator fungo quando analisado isoladamente. Onde, percentuais superiores de germinação foram observados para os tratamentos simbióticos (CH01 e M65), os quais, no entanto, não apresentaram diferenças entre si (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa de germinação e Índice de crescimento de sementes de *C. paludicolum*, referentes ao fator fungo, obtidos 30 dias após a inoculação *in vitro* para o experimento mantido sob fotoperíodo, em Chapadão do Sul, MS.

Fungo	Germinação (%)	Índice de crescimento
Assimbiótico	34,44 b	34,44 b
CH01	52,89 a	52,89 a
M65	48,04 a	48,04 a

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%)

Embora observadas diferenças significativas para o percentual germinativo entre os tratamentos simbióticos e o assimbiótico, para o índice de crescimento das sementes de *C. paludicolum* submetidas à luz, os valores observados na Tabela 2, mostram não haver diferenças significativas para nenhum dos tratamentos, demonstrando assim, influência positiva dos isolados, nesta condição, apenas durante o processo germinativo. Esses resultados indicam que na presença de luz, a inoculação do fungo beneficia a germinação, sem no entanto, influir no índice de crescimento.

Na condição de ausência de luz, não se observou interação entre os fatores. Porém, se analisados separadamente ambos, fungo e meio de cultura, apresentaram significância. Pela análise isolada do fator fungo, observaram-se médias superiores, de germinação total para os tratamentos simbióticos, as quais no entanto, não diferiram entre si, caracterizando assim, uma relação de compatibilidade entre a espécie e os isolados utilizados (Tabela 3).

Tabela 3. Taxa de germinação e Índice de crescimento de sementes de *C. paludicolum*, referentes ao fator Fungo, obtidos 30 dias após a inoculação *in vitro* para o experimento incubado em B.O.D, em Chapadão do Sul, MS.

Fungo	Germinação (%)	Índice de Crescimento
Assimbiótico	52,49 b	1,22 a
CH01	65,51 a	1,28 a
M65	67,37 a	1,20 a

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%)

Para os valores de IC, mostrados na Tabela 5, não houve diferenças significativas, evidenciando a existência de barreiras à ação do fungo durante o processo de desenvolvimento do protocormo. Resultados semelhantes foram observados por Pereira et al. (2005), em experimento com *Oncidium flexuosum*.

No que se refere ao fator meio de cultura, observa-se que a presença do carvão ativado beneficiou o processo germinativo, sem no entanto, afetar significativamente o IC (Tabela 4).

Tabela 4. Taxa de germinação e Índice de crescimento de sementes de *C. paludicolum* referentes ao fator meio de cultura, obtidos 30 dias após a inoculação *in vitro* para o experimento incubado em B.O.D, em Chapadão do Sul, MS.

Meio	Germinação (%)	Índice de Crescimento
Sem carvão	58,97 b	1,23 a
Com carvão	64,60 a	1,24 a

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%)

O alto percentual observado para o tratamento assimbiótico, para ambos os ambientes, demonstra não haver uma relação de dependência entre a espécie estudada e as micorrizas, durante o processo germinativo. Resultado semelhante foi obtido por Chutima et al. (2011), em experimento de germinação de sementes de *Pecteilis susannae*. Fracchia et al. (2013) para *Aa achalensis*, Pereira et al. (2011) para *Epidendrum secundum* e Pereira et al. (2005) para *Oncidium flexuosum*, não observaram germinação para o tratamento assimbiótico.

A inexistência de diferenças entre as médias germinativas dos tratamentos simbióticos, em ambos os experimentos, nos permite inferir que não existe uma relação de especificidade

entre *C. paludicolum* e seus simbiossiontes. Resultados semelhantes de não especificidade foram obtidos por Chutima et al. (2011). Entretanto, experimentos de indução de germinação simbiótica de diversas espécies têm demonstrado a existência de diferentes níveis de compatibilidade fungo-orquídeas, mesmo quando os isolados utilizados pertencem à espécie estudada. Para sementes de *Tolumnia variegata* (Sw.) Braem, obtidas de diversas populações e inoculadas com fungos isolados da própria espécie, foram observadas diferenças no índice germinativo e de crescimento (Otero et al. 2005). Isto também foi observado por Pereira et al. (2011), em experimento com sementes de *Epidendrum secundum* inoculados com fungos de mesmo gênero isolados da própria espécie, e por Fracchia et al. (2013), para *Aa achalensis*, utilizando isolados de diversos gêneros obtidos da espécie estudada.

Contrariamente aos resultados obtidos neste estudo, Pereira et al. (2005), em experimento de germinação simbiótica de sementes de *Oncidium flexuosum*, obtiveram maior percentual germinativo e de desenvolvimento de protocormos, para as sementes germinadas com os fungos isolados da própria espécie, embora tenha havido germinação nos demais tratamentos.

A maior eficiência no desenvolvimento dos protocormos obtidos para os tratamentos inoculados com o fungo obtido da própria espécie pode ser caracterizada como uma relação de especificidade entre a planta e a micorriza, pois é nessa fase que, segundo Bidartondo e Read (2008), o processo requer um simbiante específico. Assim como em casos de compatibilidade, diversos estudos têm demonstrado a existência de diferentes níveis de especificidade fungo-planta, os quais podem variar em função da espécie e da fase de desenvolvimento do indivíduo.

O estudo da germinação simbiótica de sementes de *Gastrodia elata*, demonstrou a existência de um processo sucessional de espécies fúngicas ao longo de seu ciclo de vida. Inicialmente, para a germinação, a espécie irá depender de apenas um fungo. No entanto, para

o desenvolvimento do protocormo é necessário que ocorra uma colonização secundária (Chen 2012), o que poderia explicar as altas taxas de insucesso, em experimentos que utilizam isolados oriundos das raízes das orquídeas (Sharma et al. 2003, Stewart e Kane 2006).

A natureza da relação simbiótica entre orquídeas e fungos é ainda controversa no mundo científico. Enquanto diversos autores defendem a existência de especificidade nesta relação, outros afirmam que esta deve ser caracterizada como compatibilidade. Tal impasse é ainda agravado por dois fatores: o primeiro é a falta de uma padronização no processo de obtenção dos isolados e o segundo é a dificuldade em identificar-se o isolado obtido (Pereira et al. 2005).

CONCLUSÕES

A metodologia empregada para o isolamento permitiu a obtenção de um único isolado de fungo micorrízico (CH01) pertencente ao gênero *Tulasnella* spp.;

Não foi detectada relação de especificidade, mas de compatibilidade entre *C. paludicolum* e seu simbiote micorrízico (CH01) durante o processo germinativo;

A presença dos isolados fúngicos (CH01 e M65) beneficiou o processo germinativo das sementes, em ambos os ambientes (claro e escuro), sem contudo afetar o Índice de Crescimento;

Na presença de luz, o isolado CH01 é mais eficiente na promoção da germinação. Já na ausência de luz isso ocorre para o isolado M65. O IC não foi afetado significativamente por nenhum dos isolados.

A presença do carvão ativado beneficiou a germinação, apenas das sementes incubadas na ausência de luz.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro imprescindível ao desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Arditti J (1992) **Fundamentals of Orchid Biology**. Jonh Wiley & Sons, New York, 691 p.
- Bektas E, Cüce M e Sökmen A (2013) *In vitro* germination, protocorm formation, and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey. **Turkish Journal of Botany** 37: 336-342.
- Bidartondo MI e Read DJ (2008) Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. **Molecular ecology** 17: 3707-3716.
- Cameron DD, Leake JR e Read DJ (2006) Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **New Phytologist** 171: 405-416.
- Chase MW, Cameron KM, Barrett RL e Freudenstein JV (2003) DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In Dixon KW, Kell SP, Barrett RL and Cribb PJ (eds.). **Orchid conservation**. Borneo: Natural History Classification, Kota Kinabalu, Sabah. p. 69-89.
- Chen J, Wang H e Guo S (2012) Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae). **Mycorrhiza** 22: 297–307.
- Chutima R, Dell B e Lumyong S (2011) Effects of mycorrhizal fungi on symbiotic seed germination of *Pecteilis susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a terrestrial orchid in Thailand. **Symbiosis** 53: 149–156.
- Dearnaley JDW (2007) Further advances in orchid mycorrhizal research. **Mycorrhiza** 17: 475–486.
- Dixon K (1987) Raising terrestrial orchids from seed. In: Harris W K (ed.) **Modern orchid growing for pleasure and profit**. Orchid Club of South Australia, Adelaide, p. 47-100.
- Fracchia S, Silvani V, Flachslund E, Terada G e Sede S (2013) Symbiotic seed germination and protocorm development of *Aa achalensis* Schltr., a terrestrial orchid endemic from Argentina. **Mycorrhiza** 24: 35-43.
- Gonçalves FJ, Nunes CMC, Filippi MC, Araújo LG, Gonçalves LA e Sibov ST (2014) Isolation and characterization of mycorrhizal fungi in *Cyrtopodium verum* Rchb. F. & Warm (Orchidaceae). **Revista de Ciências Agrárias** 57: 244-249.

Hadley G (1982) Orchid Mycorrhiza. In: Arditti J (ed.) **Orchid Biology – Reviews and Perspectives II**. Cornell University Press, Ithaca, p. 84-118.

McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL e Read DJ (2002) Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. **New Phytologist** **154**: 233-247.

Menezes LC (2000) **Orquídeas/orchids genus *Cyrtopodium*: espécies brasileiras, brasilian species**. Ed. IBAMA, Brasília, 208 p.

Mosquera-Espinosa AT, Bayman P e Otero JT. (2010) *Ceratobasidium* como hongo micorrizico de orquídeas em Colombia. **Acta Agronomica** **59**: 316-326.

Nogueira RE, Pereira OL, Kasuya MCM, Lanna MC e Mendonça M (2005) Fungos micorrízicos associados e orquídeas em campos rupestres na Região do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** **3**: 417-424.

Otero JT, Ackerman JD e Bayman P (2002) Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. **American Journal of Botany** **89**: 1852-1858.

Otero JT, Bayman P e Ackerman JD (2004) Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. **Molecular Ecology** **13**: 2393-2404.

Otero JT, Bayman P e Ackerman JD (2005) Variation in mycorrhizal performance en the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* in vitro: the potential for natural selection. **Evolutionary Ecology** **19**: 29-43.

Otero JT, Flanagan NS (2006) Orchid diversity: beyond deception. **Trends in Ecology & Evolution** **21**: 64–65.

Otero JT, Mosquera AT e Flanagan NS (2013) Tropical orchid mycorrhizae: potential applications in orchid conservation, commercialization, and beyond. **Lankesteriana** **13**: 57-63.

Pereira MC, Coelho, IS, Valadares RBS, Oliveira SF, Bocayuva M, Pereira OL, Araújo EF e Kasuya MCM (2014) Morphological and molecular characterization of *Tulasnella* spp. fungi isolated from the roots of *Epidendrum secundum*, a widespread Brazilian orchid. **Symbiosis** **62**: 111-121.

Pereira MC, Kasuya MCM, Pereira OL, Costa MD e Rocha RB (2009) Diversidade de fungos micorrizicos Epulorhiza spp. isolados de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **33**: 1187-1197.

Pereira MC, Torres DP, Guimarães FAR, Pereira OL e Kasuya MCM (2011) Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero Epulorhiza. **Acta Botanica Brasilica** **25**: 534-541.

Pereira OL e Kasuya MCM (2010) Micorrizas em orquídeas. In: Siqueira et al. (ed.) **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Editora UFLA, Lavras, p. 583-613.

Pereira OL, Kasuya MCM, Rollemberg CL e Borges AC (2005) Indução in vitro da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizotonióides. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 29: 199-206.

Peterson RL, Massicotte HB e Melville LH (2004) **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. NRC Research Press, Ottawa, 173p.

Peterson RL, Uetake Y e Zelmer C (1998) Fungal symbiosis with orchid protocorms. **Symbiosis** 25: 29-55.

Rasmussen HN (1995) **Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant**. Cambridge University Press, New York, 444p.

Riker AJ e Riker RS (1936) Isolation, culture, and inoculation. In: RIKER AJ e RIKER RS (Orgs.). **Introduction to research on plant diseases; a guide to principles and practice for studying various plant-disease problems**. Madison, University of Wisconsin, p. 44-58.

Sharma J, Zettler LW, Van Sambeek JW, Ellerieck MR e Starbuck CJ (2003) Symbiotic seed germination and mycorrhizae of the federally threatened *Platanthera praeclara* (Orchidaceae). **The American Midland Naturalist Journal** 149: 104-120.

Smith SE e Read DJ (2008) **Mycorrhizal Symbiosis**. Academic Press, San Diego, 605p.

Stewart SL e Kane ME (2006) Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 86: 159-167.

Suárez JP, Weiß M, Abele A, Garnica S, Oberwinkler F e Kottke I (2006) Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. **Mycological Research** 110: 1257-1270.

Valadares RB, Pereira MC, Otero JT e Cardoso EJ (2011) Narrow Fungal Mycorrhizal Diversity in a Population of the Orchid *Coppensia doniana*. **Biotropica** 44: 114-122.

White TJ, Bruns T, Lee S e Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ e White TJ, (eds.) **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, New York, p. 315-322.

Zettler LW (1997) Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. **Selbyana** 18: 188-194.

Zettler LW e Hofer CJ (1998) Propagation of the little club-spurorchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. **Environmental and Experimental Botany** 39: 189-195.

Zhu GS, Yu ZN, Gu, Y e Liu ZY (2008) A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi. **Fungal Diversity** 33: 123-137.

ANEXO

INSTRUÇÕES AOS AUTORES: CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY

Política geral e escopo da revista

A CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY (ISSN 1518-7853, versão impressa, ISSN 1984-7033, versão on line) - é a revista trimestral oficial da Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas (<http://www.sbmp.org.br>). O nome internacional abreviado é CROP BREED APPL BIOTECHNOL. A revista está indexada na ISI Thomson Reuters, Scopus, AGRIS, CAB International Abstracts, Biosys, Latindex, Periódica, Chemical Abstracts Service, Agricola, Agrobase, Wilson, Ebsco, DOAJ, Acervo Documental da Embrapa and Portal da Capes e destina-se à publicação de artigos científicos originais que possam contribuir para o desenvolvimento científico e tecnológico do melhoramento e da agricultura. Os artigos deverão contemplar as pesquisas básica e aplicada em melhoramento de plantas perenes e anuais, nas áreas de genética, conservação de germoplasma, biotecnologia, genômica, citogenética, estatística experimental, sementes, qualidade de alimentos, estresse biótico e abiótico, e áreas correlatas. O artigo deve ser inédito, sendo vetada a submissão do mesmo a outro periódico. As opiniões e conceitos emitidos são de exclusiva responsabilidade dos autores, não refletindo necessariamente as idéias da Editoria. A Editoria, porém se reserva o direito de sugerir ou solicitar as modificações que se fizerem necessárias. A reprodução completa ou parcial dos artigos é permitida, desde que citada a fonte.

Informação para aquisição

Para associar-se à Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas ou adquirir exemplares avulsos da CBAB envie e-mail para cbabjournal@gmail.com.

Artigo

A CBAB publica artigo exclusivamente em inglês, porém faculta ao autor a possibilidade de submetê-lo em português para, após o aceite, providenciar a sua tradução. O ônus da tradução é de responsabilidade do autor, porém a CBAB recomenda que ela seja feita por seu tradutor oficial. Se o artigo for submetido em inglês, ele deve ser obrigatoriamente revisado, em termos linguísticos e após o aceite. A revisão será feita exclusivamente pelos tradutores oficiais da CBAB, com ônus para o autor. Contribuições são submetidas via WEB acessando <http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/index.php>, clicando Submission. O sistema de gerenciamento de artigos solicitará o e-mail do autor correspondente e a geração de uma senha. Os manuscritos deverão ser inseridos sem os nomes dos autores e seus endereços, os quais deverão ser disponibilizados em um formulário à parte. Como a CBAB opera com revisão do tipo duplo cego, autores não devem revelar suas identidades no manuscrito. Com seu e-mail e sua senha pessoal, o autor poderá acompanhar toda a tramitação do seu artigo. A avaliação do artigo será feita por revisores *ad hoc* especialistas, para auxiliar a Editoria quanto à decisão final de aceite, modificações ou rejeição do mesmo. O artigo completo deverá conter, preferencialmente, a seguinte sequência: title, abstract, key words, introduction, material and methods, results and discussion, acknowledgements, título, resumo, palavras-chave, references, and tables and black-and-white figures. Ilustrações coloridas serão permitidas, porém com ônus para o autor correspondente. A digitação deverá ser feita em Word for Windows versão 6.0 em diante, em fonte times new roman, tamanho 12, espaçamento duplo, formato A4, com margens de 20 mm e paginação consecutiva no topo à

direita. O artigo não deverá exceder a 18 páginas, incluindo tabelas e figuras digitadas em páginas separadas (uma por página) ao final do texto. Todas as equações, modelos e símbolos devem ser inseridos via Microsoft Equation. O Título deverá ser claro, conciso e refletir a essência do artigo. Escrito com a inicial maiúscula e posto a esquerda, não deve conter mais de 15 palavras digitadas em times new roman 14, bold. O Abstract, tanto quanto o Resumo, não deve exceder a 150 palavras. Um máximo de cinco palavras-chave, diferentes do título, será permitido. A introdução deve incluir uma breve revisão de literatura sobre o tema e os objetivos da pesquisa. O Material e Método deve ser redigido de modo que outro pesquisador possa repetir a experiência. Preferencialmente, Resultados e Discussão devem ser apresentados em conjunto, para maior dinâmica de leitura. Os agradecimentos devem ser sucintos, limitados a colaboradores efetivos e agências financiadoras. O Resumo deve ser precedido do título do artigo em português. Cuidado com as Referências. Não citar resumos de eventos, teses e nem artigos não publicados. Esses cuidados darão maior credibilidade ao artigo e a revista. As citações feitas no texto pelo sobrenome do autor e ano (por exemplo, Liu 1998, Pereira and Amaral Júnior 2001, William et al. 1990) deverão ser ordenadas alfabeticamente no item Referências, seguindo os exemplos abaixo:

Artigos em periódicos:

Pereira MG and Amaral Júnior AT (2001) Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 1: 3-10.

Livro:

Ramalho MAP, Ferreira DF and Oliveira AC (2000) Experimentação em genética e melhoramento de plantas. Editora UFLA, Lavras, 326p.

Capítulo de livro:

Sakiyama NS, Pereira AA and Zambolim L (1999) Melhoramento do café arábica. In: Borém A (ed.) *Melhoramento de espécies cultivadas*. Editora UFV, Viçosa, p. 189-204.

Congresso:

Frey KJ (1992) Plant breeding perspectives for the 1990s. In: Stalker HT and Murphy JP (eds.) *Proceedings of the Symposium on Plant Breeding in the 1990s*. CAB, Wallingford, p. 1-13.

CAPÍTULO 2

Isolamento, identificação e inoculação de fungos micorrízicos rizoctenóides associados à *Cyrtopodium saintlegerianum* Richb.f. (Orchidaceae – Catasetinae)

RESUMO

O sucesso germinativo e o desenvolvimento dos protocormos das orquídeas, em seu habitat natural, está atrelado à simbiose entre as sementes e as micorrizas. Portanto, o conhecimento da natureza dessa relação, em termos de especificidade ou compatibilidade, faz-se necessário para o desenvolvimento de programas eficiente de propagação das espécies, uma vez que são escassas as informações acerca da relação planta fungo dentro da subtribo Catasetinae. Assim, visando compreender melhor o processo germinativo e o desenvolvimento de protocormos da espécie *Cyrtopodium saintlegerianum*, procedeu-se o isolamento, a identificação e a inoculação (germinação simbiótica) de fungo micorrízico associado à esta. O isolamento foi feito em meio BDA. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3, sendo: meio de cultura aveia-ágar (presença e ausência de carvão ativado) e fungo (CS01, M65 e assimbiótico), com cinco repetições. Os experimentos foram submetidos a dois ambientes distintos: claro e escuro. A avaliação ocorreu 30 dias após a inoculação. A metodologia utilizada para o isolamento foi eficiente e o isolado obtido foi denominado CS01. O isolado M65 mostrou-se compatível com a espécie trabalhada. A adição do carvão ao meio influenciou positivamente o isolado CS01 em ambos os ambientes, possibilitando elevadas taxas germinativas e IC. Na presença de luz, os maiores valores de germinação e IC do fungo M65, foram observados no meio sem adição de carvão. Na ausência de luz, isso ocorreu para o isolado CS01. Na presença de luz, a adição carvão ao meio de cultura favoreceu o percentual germinativo do tratamento assimbiótico.

PALAVRAS-CHAVE: orquídea, micorrizas, germinação simbiótica.

ABSTRACT

The germination success and the protocorm development of orchids, in their natural habitat, are linked to the seeds symbiosis and mycorrhizal fungi. Therefore, the knowledge of this relationship nature in terms of specificity and compatibility, is necessary to develop efficient propagation programs of orchids species, since that information about fungal-plant relationship within the subtribe Catasetinae are scarce. Thus, to better understand the germination process and the protocorm development of the orchid *Cyrtopodium saintlegerianum*, fungi isolation identification and inoculation (symbiotic germination) of mycorrhizal fungi associated with that orchid were carried out. The isolation was done on PDA medium. The design was completely randomized in a 2x3 factorial, as follow: oat-agar culture medium (presence and absence of activated charcoal) and fungus (CS01, M65 and asymbiotic), with five repetitions. The experiments were subjected to two different environments: light and dark. The evaluation occurred 30 days after inoculation. The methodology used for isolation was efficient and the obtained isolated fungus was called CS01. The isolated M65 was compatible with the worked species. The activated charcoal addition to the medium culture positively influenced the isolated CS01 in both environments, enabling high germination and IC rates. In the light presence, the highest germination and IC values to M65 fungus were observed in the medium without activated charcoal addition. In the absence of light, the same response occurred to isolated CS01. In the presence of light, activated charcoal addition to the culture medium favored the germination percentage in the asymbiotic treatment.

KEY WORDS: Orchid, mycorrhiza, symbiotic germination

INTRODUÇÃO

Segundo a moderna classificação *Cyrtopodium saintlegerianum* pertence à subfamília Epidendroideae, tribo Cymbidieae e subtribo Catasetinae (Chase et al. 2003). Trata-se de uma espécie epifítica, típica da região Centro-Oeste. Apresenta pseudobulbos fusiformes longos, e que podem medir até 70 cm de comprimento. As inflorescências são paniculadas, com flores amarelas, manchadas com tons de marrom, que medem cerca de 2,8 cm de diâmetro. A floração ocorre entre os meses de julho e agosto (Menezes 2000). *C. saintlegerianum* tem atraído a atenção de colecionadores e do mercado de plantas ornamentais, em função da beleza de suas inflorescências vistosas e sua estrutura vegetativa robusta, o torna-o alvo do extrativismo. Devido à exploração extrativista desordenada, o desmatamento excessivo do Bioma Cerrado, o baixo sucesso reprodutivo e o habitat restrito, esta espécie pode extinta.

As sementes de *C. saintlegerianum* são diminutas, contendo pouca reserva nutricional, fragilizando assim o processo germinativo. Na natureza, a germinação é facilitada pela presença de fungos micorrízicos, que se associam simbioticamente às sementes, promovendo o processo germinativo (Arditti 1992, Rasmussen 1995, Peterson et al. 1998). A relação simbiótica caracteriza-se principalmente pela formação de estruturas fúngicas adensadas no interior das células parenquimáticas da região cortical da raiz, denominadas *pelotons* ou *novelos* (Smith e Read 2008, Zettler 1997, Peterson et al. 2004). Trata-se de uma relação mutualística e não parasitária, na qual ocorre um fluxo bidirecional de carbono (Cameron et al. 2006).

Nos estádios iniciais do desenvolvimento da semente, a nutrição ocorre de forma mico-heterotrófica pela utilização de produtos oriundos da digestão enzimática dos *pelotons*, sendo, portanto, as micorrizas responsáveis pela provisão contínua de açúcares solúveis simples como a glicose, de vitaminas, de minerais, de água e de outros fatores imprescindíveis à germinação da semente e desenvolvimento do protocormo (Peterson et al. 2004, Dearnaley

2007). Na sequência é estabelecer a fase autotrófica ou fotossintetizante. No entanto, para algumas espécies, a mico-heterotrofia perdura por toda a vida da planta (Rasmussen 1995), sendo tal relação caracterizada por Hadley (1982), como estado de dependência do hospedeiro ao microrganismo. Assim, a simbiose fungo-planta constitui-se em um importante fator na distribuição geográfica das orquídeas (Mckendrick et al. 2002, Peterson et al. 2004, Otero e Flanagan 2006).

Com vistas ao desenvolvimento de protocolos mais eficientes de germinação de sementes de orquídeas, faz-se necessário o entendimento da natureza dessa relação, em termos de especificidade ou compatibilidade. Tais protocolos podem ser utilizados tanto para a produção de espécimes para programas de reintrodução de espécies ameaçadas de extinção em seus habitats naturais (Zettler 1997, 1998), quanto, para produção de mudas de interesse comercial (Valadares et al. 2011, Pereira et al. 2011).

Fatores abióticos como o habitat, a temperatura e o substrato, além de variações genéticas interespecíficas da orquídea e da micorriza e a relação de especificidade fungo-planta, podem influenciar diretamente o estabelecimento da simbiose (Otero et al. 2005).

Na cultura de tecidos tem-se observado que algumas espécies apresentam dificuldades para sua multiplicação por via assimbiótica, sugerindo assim, a necessidade da associação com fungos micorrízicos, como ocorre na natureza (Pereira e Kasuya 2010).

Na germinação simbiótica, para a otimização do processo de simbiose, os meios são constituídos de ágar e de algum outro ingrediente, como fonte de açúcares simples para a nutrição dos fungos, como aveia, celulose, canjica de milho e outros.

Cada vez mais a ciência tem comprovado a maior eficiência, em termos de germinação e conversão em protocormos, no cultivo simbiótico, se comparado ao assimbiótico, que é amplamente empregado para a propagação de espécies da família Orchidaceae. Assim, com este trabalho objetivou-se isolar fungo micorrízico associado à *C. saintlegerianum*, identificá-

lo e testá-lo na germinação de sementes, visando à obtenção de um protocolo de multiplicação da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal

Plantas adultas e cápsulas maduras de *C. saintlegerianum* foram coletadas de população encontrada na Fazenda Bacurizal (Latitude 18°55'57.76"S; Longitude 52°41'08.87"O; Elevação 633 m), no município de Costa Rica, área de Domínio Cerrado (Figura 1).



Figura 1. Área de coleta do material botânico, plantas sadias e cápsulas maduras, de *C. saintlegerianum*

As amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas e levadas ao Laboratório de Biotecnologia (LABTEC) do Campus Chapadão do Sul da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS. As cápsulas foram desinfestadas superficialmente pela imersão em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio 2% (concentração comercial) por 6 minutos, e posterior lavagem em água destilada e autoclavada

por cinco vezes. Em ambiente esterilizado (fluxo laminar), as cápsulas foram abertas e as sementes depositadas em tubos de ensaio, contendo sílica gel e, em seguida, armazenadas em refrigerador à temperatura de 4 °C, durante uma semana.

Isolamento

Para o isolamento, as raízes coletadas foram lavadas em água corrente e segmentadas em fragmentos de aproximadamente 3 cm. Cortes transversais delgados, obtidos manualmente, com auxílio de lâmina de barbear, foram observados ao microscópio ótico e serviram para a confirmação da presença de *pelotons* na região cortical da raiz. Uma vez detectada a presença destas estruturas, os segmentos radiculares passaram por desinfestação superficial, por imersão em etanol 70% (v/v), durante 1 minuto e, posteriormente, em solução de hipoclorito de sódio 20% (0,5 de cloro ativo), por seis minutos. Em seguida, procedeu-se lavagem em água destilada esterilizada, por três vezes, sob agitação manual.

Em ambiente esterilizado (fluxo laminar), os segmentos colonizados das raízes foram seccionados transversalmente e, com o auxílio de agulhas hipodérmicas, cinco fragmentos do parênquima cortical, com presença de *pelotons*, foram transferidos para placas de Petri contendo 50 mL de meio Batata Dextrose Ágar - BDA (adaptado de Riker e Riker 1936), obtido do caldo do cozimento de 200 g L⁻¹ de batata, acrescido de 15 g L⁻¹ de glicose e 7 g L⁻¹ de Ágar. O pH foi ajustado para 5,6. Dez placas foram incubadas em B.O.D no escuro, à temperatura de 28± 2°C e observadas diariamente em microscópio estereoscópico para a verificação do crescimento do micélio fúngico a partir dos *pelotons*. O isolado obtido foi repicado para meio BDA e mantido sob as mesmas condições acima descritas.

Identificação

O isolado fúngico obtido de *C. paludicolum* foi enviado ao Laboratório de Associações Micorrízicas da Universidade Federal de Viçosa, para realização de procedimentos de identificação molecular. Inicialmente, o micélio fúngico foi liofilizado e a extração total de DNA realizada com o Kit NucleoSpin[®] Soil (MachereyNagel) de acordo com as instruções do fabricante. Para a avaliação da integridade do DNA, utilizou-se gel de agarose (0,8%) e a quantificação efetuada por espectrofotometria. O DNA extraído foi submetido ao PCR utilizando-se os *primers* ITS1 e ITS4 (White et al. 1990) para a amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr (DNA ribossômico) do fungo. Para cada reação utilizou-se 25 ng de DNA, de acordo com especificações do fabricante. O anelamento de *primers* foi a 95°C durante 2 min, seguidos de 39 ciclos a 95°C durante 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min e a extensão final foi a 72°C durante 10 min. Foram utilizados dois controles: um controle negativo, utilizando-se uma mistura de PCR sem molde de DNA e outro positivo, utilizando-se uma mistura de PCR com um DNA testado. O sucesso das amplificações de PCR foi testado em gel de agarose (1,5%), corado com solução de brometo de etídio 0,5 µg mL⁻¹. As amostras foram enviadas para o sequenciamento à Macrogen Inc., na Coreia do Sul. Os *reads* oriundos do sequenciamento foram montados utilizando o software *Sequencher* 4.1.4 e a sequência resultante foi comparada com outras sequências depositadas no banco de dados do GenBank utilizando a ferramenta BLAST.

Inoculação dos fungos micorrízicos

Dois experimentos foram realizados, um incubado no escuro, em B.O.D, à temperatura de 28°C ± 2°C e o outro submetido a fotoperíodo de 16 horas de escuro e à temperatura de 27°C ± 2°C em sala de crescimento. Ambos os experimentos foram instalados utilizando-se um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3 (meio de cultura com e

sem carvão ativado e dois inoculantes de fungos micorrízicos + tratamento assimbiótico), perfazendo um total de 6 tratamentos, constituídos de cinco repetições cada. O meio utilizado foi o aveia ágar (4 g L⁻¹ de aveia, 10 g L⁻¹ de ágar, pH 5,6, modificado de Dixon, 1987), em duas variações: meio puro e acrescido de 2 g L⁻¹ de carvão ativado.

Para a desinfestação, as sementes previamente armazenadas, foram imersas em solução de hipoclorito 20% (0,5% de cloro ativo), durante 10 minutos, seguida de tríplice lavagem, utilizando-se água destilada esterilizada. Após a lavagem, as sementes foram mantidas em suspensão em 40 mL de água destilada e esterilizada, e 400 µL foram inoculados sobre um disco de papel Germitest[®] de 6 cm previamente esterilizado, disposto centralmente em placas contendo 20 mL do meio de cultura. Os discos de papel serviram para a delimitação do perímetro a ser avaliado. Para os tratamentos de germinação simbiótica foi adicionado, a 6 cm do disco de papel, um disco de aproximadamente 5 mm de diâmetro dos isolados contendo micélio fúngico, retirado da margem da cultura. As placas foram seladas com filme de PVC.

Os isolados utilizados foram o CS01 (da própria espécie) e o M65 (Pereira 2009), sendo o último pertencente ao gênero *Epulorhiza* sp. da coleção de fungos micorrízicos de orquídeas do Laboratório de Associações Micorrízicas (BIOAGRO/UFV).

Caracterização da associação micorrízica

A caracterização da associação micorrízica ocorreu por meio de microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde cortes transversais de protocormos de todos os tratamentos simbióticos, em estágio de desenvolvimento 2, foram utilizados. Para a microscopia óptica, foram realizados cortes do material a fresco, montados cuidadosamente em lâmina e lamínula, com água destilada e fotografados por câmera digital acoplada a um microscópio óptico. Já para a MEV os protocormos foram submetidos a um processo de

desidratação etanólica crescente (de 5 a 95% v/v, por 1 hora cada). Posteriormente, foram feitos corte transversais manuais com auxílio de lâmina de barbear, os quais foram levados à estufa para secagem (35°C, durante 24 horas). Os cortes obtidos foram montados em porta amostras (condutoras de eletricidade), recobertos por uma camada fina de ouro pelo método de Sputtering e levados ao MEV para a captura das imagens. As imagens foram capturadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Campus Campo Grande.

Avaliação

Após um período de inoculação de 30 dias, avaliou-se a área de 6 cm, previamente definida, com o auxílio de estereomicroscópio. Foram considerados 3 estádios distintos para caracterização do processo de germinação e desenvolvimento de protocormos: sementes com embrião viável, não intumescido, não germinadas (estádio 0); sementes com embrião desenvolvido ainda no interior da testa, não germinadas (estádio 1); sementes germinadas, cujo embrião rompeu a testa, podendo ou não apresentar rizóides (estádio 2), adaptado de Bektas et al. (2013).

A partir dos dados coletados foram gerados os seguintes parâmetros: percentual total de sementes germinadas, baseado apenas no estágio 2, e obtido pela análise de variância (ANOVA), utilizando-se o Software Assistat (7.7 beta), sendo as médias comparadas pelo teste Tukey (5%). E o IC, baseado nos estádios 0, 1 e 2, foi calculado a partir da seguinte fórmula: $IC = (N1 + N2 \times 2) / (N0 + N1 + N2)$, sendo N o número de sementes em cada um dos 3 estádios (Otero et al. 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A observação de cortes transversais das raízes de *C. saintlegerianum* demonstrou a presença de enovelados fúngicos, os quais localizavam-se na região mais externa do córtex e encontravam-se intactos ou parcialmente degradados (Figura 2A).

Não houve contaminação das 10 placas inoculadas para isolamento. No entanto, apenas um explante apresentou crescimento de micélio fúngico, e o isolado obtido de *Cyrtopodium saintlegerianum* foi denominado de CS01 em função das iniciais do nome científico da espécie (Figura 2B). Isto evidencia que o processo de desinfestação superficial das raízes foi eficiente no controle de microorganismos indesejados, no entanto, o índice de crescimento fúngico, também pode ter sido afetado pelo processo. Além disto, fatores como a idade da raiz e a localização dos *pelotons* dentro do tecido cortical podem ter influenciado negativamente o crescimento do micélio fúngico.

Embora a identificação molecular ainda não tenha sido concluída, pela análise morfológica do isolado CS01, observamos características intrínsecas à maioria dos fungos micorrízicos de orquídeas, como: micélio estéril incolor; células longas; ramificações em ângulos de 90° em relação à hifa principal; presença de septos e de células monilióides (Figura 2C). As sementes avaliadas encontravam-se em três estádios distintos: 0, 1 e 2, sendo apenas o estágio 2 caracterizado como germinado propriamente dito (Figura 2D).

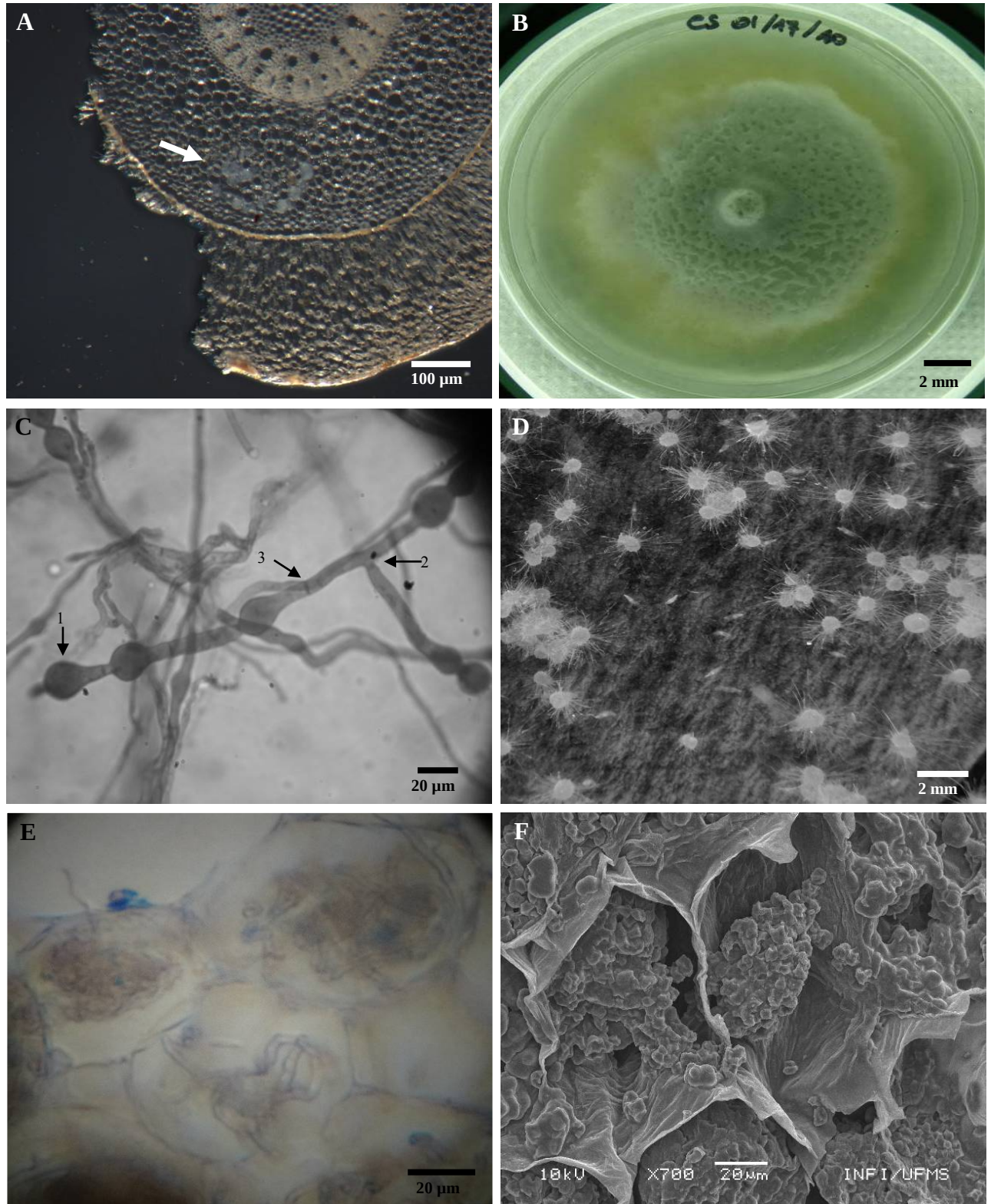


Figura 2. A – Corte transversal da raiz de *C. saintlegerianum* caracterizando a colonização; B - Isolado CS01 em meio de cultura BDA; C – Hifas fúngicas, setas evidenciando presença de células monilióides (1), ângulo de 90° (2), septo (3); D - Estádios de desenvolvimento das sementes *C. saintlegerianum*, obtidos em meio simbiótico com isolado CS01; E e F – Imagens de microscopia óptica (E) e eletrônica de varredura (F) de células corticais de protocormos de *C. saintlegerianum* em estágio de desenvolvimento 2, obtidos em meio simbiótico com isolado CS01 evidenciando presença de enovelado de hifas fúngicas (*pelotons*) viáveis em E e parcialmente degradado em F.

A observação por microscopia óptica e eletrônica de varredura, de cortes de protocormos germinados simbioticamente no estágio 2, comprovou a colonização das células corticais pelas hifas dos fungos micorrízicos. Os *pelotons* observados se encontravam em estádios que variavam desde intactos (Figura 2E) até parcialmente degradados (Figura 2F).

Para o experimento conduzido na presença da luz, em sala de crescimento sob fotoperíodo, foi detectada a interação entre os fatores fungo (presença e ausência) e meio de cultura (presença e ausência de carvão). Foi observado aumento no percentual germinativo, quando acrescentou-se carvão ao meio de cultura para os tratamentos CS01 e Assimbiótico (Tabela 1). Para o meio de cultura acrescido de carvão média superior foi observado para o tratamento M65, a qual no entanto não diferiu da média observada para o meio sem adição de carvão. As médias observadas para os tratamentos CS01 e M65, dentro do meio de cultura acrescido de carvão não diferiram entre si. Quando ao Índice de crescimento, este não sofreu influência de nenhum dos fatores (Tabela 1).

A diferença estatística observada para o tratamento assimbiótico (Tabela 1), dentro do fator meio de cultura, caracteriza a influência positiva do carvão sobre o tratamento. Resultados semelhantes foram reportados por Bressan et al. (1999), Faria et al. (2002), Fráguas et al. (2003), Araújo et al. (2006), Santos et al. (2006), Schneiders et al. (2012) e Gonçalves et al. (2014).

Por se tratar de um pó fino, a adição do carvão ativado ao meio de cultura produz uma delicada rede de poros, com grande área de superfície e volume, que confere ao meio elevada capacidade de adsorção (Arditti e Ernest 1993, Thomas 2008). Ainda, segundo Pan e Stadem (1998) e Thomas (2008), a adição do carvão ao meio nutritivo, atua na retenção de substâncias tóxicas e inibitórias presentes, assim como, reduzi a ação de metabólitos tóxicos oriundos das sementes, contribuindo para o processo germinativo.

Tabela 1. Taxa de germinação e valores de Índice de crescimento das sementes de *C. saintlegerianum*, obtidos 30 dias após a inoculação *in vitro* e incubação sob fotoperíodo em sala de crescimento, Chapadão do Sul, MS

Fungo	Meio de cultura			
	Germinação (%)		Índice de Crescimento	
	Sem carvão	Com carvão	Sem carvão	Com carvão
Assimbiótico	5,61 bB	30,90 bA	0,87 a	1,13 a
CS01	16,65 bB	32,61 abA	0,94 a	1,22 a
M65	45,77 aA	44,14 aA	0,92 a	1,00 a

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%)

Para o taxa germinativa, o experimento incubado em B.O.D, no escuro, apresentou interação entre os fatores (Tabela 2). Foi observado aumento no percentual germinativo, para os tratamentos simbióticos (CS01 e M65), inoculados em meio contendo carvão ativado. As médias apresentadas pelo fator fungo, para o meio de cultura sem adição de carvão, diferiram entre si, sendo a maior média observado para o tratamento assimbiótico, a qual no entanto, não diferiu da média observada para o meio acrescido de carvão ativado. A interação entre o fator fungo e o meio de cultura acrescido de carvão não foi significativa.

Para o IC a interação foi significativa. Para o tratamento M65 foi observado aumento no valor de IC para o tratamento inoculado em meio acrescido de carvão ativado. Resultado contrário foi observado para o tratamento assimbiótico. Para o tratamento CS01 não houve influência do fator meio de cultura. Assim, pode-se afirmar que a adição de carvão influenciou positivamente os tratamentos fúngicos sem, no entanto, exercer efeito algum sobre o tratamento assimbiótico.

A ocorrência de elevados percentuais de germinação para o grupo de tratamentos inoculados com o isolado M65 em ambos os ambientes, de acordo com a definição de Batty et al. (2001) e Bonnardeaux et al. (2007) pode ser caracterizada como uma relação de compatibilidade entre o isolado e *C. saintlegerianum*, embora a natureza da relação planta-micorriza, quanto à compatibilidade ou especificidade, ainda é fonte de controvérsia. Além disso, dois fatores têm agravado ainda mais esse impasse, o primeiro é a falta de uma

padronização no processo de obtenção dos isolados e o segundo é a dificuldade para a identificação do fungo micorrízico (Pereira et al. 2005).

Tabela 2. Taxa de germinação e valores de Índice de crescimento das sementes de *C. saintlegerianum*, 30 dias após a inoculação *in vitro* e incubação em B.O.D, em Chapadão do Sul, MS

Fungo	Meio de cultura			
	Germinação (%)		Índice de Crescimento	
	Sem carvão	Com carvão	Sem carvão	Com carvão
Assimbiótico	52,49 aA	52,77 aA	1,30 a	1,13 b
CS01	43,70 bB	49,50 aA	1,31 a	1,26 a
M65	34,60 cB	49,09 aA	1,08 b	1,34 a

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%)

Relações de compatibilidade têm sido descritas em diversos estudos e em diferentes níveis. Otero et al. (2005), utilizando sementes de *Tolumnia variegata* (Sw.) Braem, obtidas de diversas populações e inoculando-as com fungos isolados da própria espécie, observaram diferenças no índice germinativo e de crescimento. Similarmente Pereira et al. (2011), detectaram isto em experimento com sementes de *Epidendrum secundum*, inoculadas com fungos de mesmo gênero isolados da própria espécie. Fracchia et al. (2013), também observaram isto para *Aa achalensis*, utilizando isolados de gêneros diversos obtidos da espécie estudada e por Chutima et al. (2011), que utilizaram sementes de *Pecteilis susannae*, inoculadas com diversos isolados fúngicos, entre eles três obtidos da própria espécie.

Resultados distintos dos obtidos neste trabalho foram observados por Pereira et al. (2005), em experimento de germinação simbiótica de sementes de *Oncidium flexuosum*, e por Valadares et al. (2011), em experimento de germinação simbiótica de sementes *Coppensia doniana*, onde ambos obtiveram maiores resultados de germinação e desenvolvimento de protocormos, para as sementes germinadas na presença dos fungos isolados da própria espécie, o que pode ser caracterizado como uma relação de especificidade entre a planta e a micorriza. Porém, os níveis de especificidade podem variar em função da espécie e da fase de desenvolvimento do indivíduo. Como exemplo, podemos citar o processo sucessional de

espécies fúngicas observado em *Gastrodia elata*, ao longo de seu ciclo de vida (Chen 2012), o que poderia explicar as altas taxas de insucesso, em experimentos que utilizam isolados oriundos das raízes das orquídeas (Sharma et al 2003, Stewart e Kane 2006).

Contrariamente ao esperado para os tratamentos assimbióticos (controle), neste trabalho foram observados elevados percentuais germinativos em ambos os ambientes. Porém, isso deve ter ocorrido em função de um possível acúmulo de amido pela semente, durante o processo de armazenamento. Resultados semelhantes foram obtidos por Chutima et al. (2011), em experimento de germinação de sementes de *Pecteilis susannae*. Já Fracchia et al. (2013) e Pereira et al. (2005, 2011) não observaram germinação para o tratamento assimbiótico.

CONCLUSÕES

O método para o isolamento de fungo micorrízico a partir de *C. saintlegerianum* foi eficiente.

Por meio de observações de características morfológicas do isolado CS01, acredita-se tratar de uma espécie do gênero *Rizhoctonia*;

O isolado M65 é compatível com *C. saintlegerianum*;

Na presença de luz, os maiores valores de germinação do fungo M65, foram observados no meio sem adição de carvão. Os fatores não influenciaram significativamente o IC. Na ausência de luz, isso ocorreu para o isolado CS01, sendo significativa a influência dos fatores sobre o IC.

Na presença de luz, a adição de carvão ao meio de cultura favoreceu o percentual germinativo do tratamento assimbiótico.

AGRADECIMENTOS

À FUNDECT, pelo apoio financeiro imprescindível ao desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Araújo AG et al. (2006) Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson-C e carvão ativado. **Plant Cell Culture and Micropropagation** 2: 61-67.
- Arditti J (1992) **Fundamentals of Orchid Biology**. John Wiley & Sons, New York, 691 p.
- Arditti J e Ernst R (1993) **Micropropagation of orchids**. John Wiley & Sons, New York, 682 p.
- Batty AL, Dixon KW, Brundrett M e Sivasithamparam K (2001) Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a mediterranean bushland. **New Phytologist** 152: 511-520.
- Bektas E, Cüce M e Sökmen A (2013) In vitro germination, protocorm formation, and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey. **Turkish Journal of Botany** 37: 336-342.
- Bidartondo MI e Read DJ (2008) Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. **Molecular ecology** 17: 3707-3716.
- Bonnardeaux Y, Brundrett M, Batty A, Dixon K, Koch J e Sivasithamparam K (2007) Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. **Mycological Research** 111: 51-61.
- Bressan EA, Lee LL, Severo VS e Gerald LTS (1999) Desenvolvimento de orquídeas *Phalaenopsis in vitro* – efeito do carvão. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais**, 12, Jaboticabal: FCAV-UNESP, p. 111.
- Cameron DD, Leake JR e Read DJ (2006) Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **New Phytologist** 171: 405-416.
- Chase MW, Cameron KM, Barrett RL e Freudenstein JV (2003) DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In Dixon KW, Kell SP, Barrett RL e Cribb PJ (eds.). **Orchid conservation**. Borneo: Natural History Classification, Kota Kinabalu, Sabah. p. 69-89.
- Chen J, Wang H e Guo S (2012) Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae). **Mycorrhiza** 22: 297-307.

- Chutima R, Dell B e Lumyong S (2011) Effects of mycorrhizal fungi on symbiotic seed germination of *Pecteilis susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a terrestrial orchid in Thailand. **Symbiosis** 53: 149-156.
- Dearnaley JDW (2007) Further advances in orchid mycorrhizal research. **Mycorrhiza** 17: 475–486.
- Dixon K (1987) Raising terrestrial orchids from seed. In: Harris W K (ed.) **Modern orchid growing for pleasure and profit**. Orchid Club of South Australia, Adelaide, p. 47-100.
- Faria RT et al. (2002) Preservation of the Brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 2: 489-492.
- Fracchia S, Silvani V, Flachslund E, Terada G e Sede S (2013) Symbiotic seed germination and protocorm development of *Aa achalensis* Schltr., a terrestrial orchid endemic from Argentina. **Mycorrhiza** 24: 35-43.
- Fráguas CB, Villa F, Souza AV, Pasqual M e Dutra LF (2003) Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. Lavras, **Ceres** 50: 719-726.
- Gonçalves FJ, Nunes CMC, Filippi MC, Araújo LG, Gonçalves LA e Sibov ST (2014) Isolation and characterization of mycorrhizal fungi in *Cyrtopodium verum* Rchb. F. & Warm (Orchidaceae). **Revista de Ciências Agrárias** 57: 244-249.
- Hadley G (1982) Orchid Mycorrhiza. In: Arditti J (ed.) **Orchid Biology – Reviews and Perspectives II**. Cornell University Press, Ithaca, p. 84-118.
- McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL e Read DJ (2002) Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. **New Phytologist** 154: 233-247.
- Menezes LC (2000) **Orquídeas/orchids genus *Cyrtopodium*: espécies brasileiras, brasilian species**. Ed. IBAMA, Brasília, 208p.:il
- Otero JT, Bayman P e Ackerman JD (2005) Variation in mycorrhizal performance en the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* in vitro: the potential for natural selection. **Evolutionary Ecology** 19: 29-43.
- Otero JT e Flanagan NS (2006) Orchid diversity: beyond deception. **Trends in Ecology & Evolution** 21: 64–65.
- Pan MJ e Staden JV (1998) The use of charcoal in vitro culture: a review. **Plant Growth Regulation** 26: 155-163.
- Pereira MC, Kasuya MCM, Pereira OL, Costa MD e Rocha RB (2009) Diversidade de fungos micorrizicos *Epulorhiza* spp. isolados de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 33: 1187-1197.
- Pereira MC, Torres DP, Guimarães FAR, Pereira OL e Kasuya MCM (2011) Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae)

em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*. **Acta Botanica Brasilica** **25**: 534-541.

Pereira OL e Kasuya MCM (2010) Micorrizas em orquídeas. In: Siqueira et al. (ed.) **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Editora UFLA, Lavras, p. 583-613.

Pereira OL, Kasuya MCM, Rollemberg CL e Borges AC (2005) Indução in vitro da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **29**: 199-206.

Peterson RL, Massicotte HB e Melville LH (2004) **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. NRC Research Press, Ottawa, 173p.

Peterson RL, Uetake Y e Zelmer C (1998) Fungal symbiosis with orchid protocorms. **Symbiosis** **25**: 29-55.

Rasmussen HN (1995) **Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant**. Cambridge University Press, New York, 444p.

Santos AF et al. (2006) Otimização da propagação de *Sophranitis coccinea* (Orchidaceae) considerando meios de cultivo com adição de carvão ativado. **Horta** **46**:8-12.

Schneiders D, Pescador R, Booz MR e Suzuki RM (2012) Germinação, crescimento e desenvolvimento in vitro de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae) Viçosa, **Revista Ceres** **59**: 185-191.

Sharma J, Zettler LW, Van Sambeek JW, Ellerieck MR e Starbuck CJ (2003) Symbiotic seed germination and mycorrhizae of the federally threatened *Platanthera praeclara* (Orchidaceae). **The American Midland Naturalist Journal** **149**: 104–120.

Smith SE e Read DJ (2008) **Mycorrhizal Symbiosis**. Academic Press, San Diego, 605p.

Stewart SL e Kane ME (2006) Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **86**: 159–167.

Thomas TD (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances** **26**: 618-631.

Valadares RB, Pereira MC, Otero JT e Cardoso EJ (2011) Narrow Fungal Mycorrhizal Diversity in a Population of the Orchid *Coppensia doniana*. **Biotropica** **44**: 114 – 122.

White TJ, Bruns T, Lee S e Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ e White TJ, (eds.) **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, New York, p.315–322.

Zettler LW (1997) Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. **Selbyana** **18**:188–194.

Zettler LW e Hofer CJ (1998) Propagation of the little club-spurorchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. **Environmental and Experimental Botany** 39: 189-195.

Zhu GS, Yu ZN, Gu, Y e Liu ZY (2008) A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi. **Fungal Diversity** 33: 123-137.

ANEXO

INSTRUÇÕES AOS AUTORES: CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY

Política geral e escopo da revista

A **CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY** (ISSN 1518-7853, versão impressa, ISSN 1984-7033, versão on line) - é a revista trimestral oficial da Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas (<http://www.sbmp.org.br>). O nome internacional abreviado é CROP BREED APPL BIOTECHNOL. A revista está indexada na ISI Thomson Reuters, Scopus, AGRIS, CAB International Abstracts, Biosys, Latindex, Periódica, Chemical Abstracts Service, Agricola, Agrobase, Wilson, Ebsco, DOAJ, Acervo Documental da Embrapa and Portal da Capes e destina-se à publicação de artigos científicos originais que possam contribuir para o desenvolvimento científico e tecnológico do melhoramento e da agricultura. Os artigos deverão contemplar as pesquisas básica e aplicada em melhoramento de plantas perenes e anuais, nas áreas de genética, conservação de germoplasma, biotecnologia, genômica, citogenética, estatística experimental, sementes, qualidade de alimentos, estresse biótico e abiótico, e áreas correlatas. O artigo deve ser inédito, sendo vetada a submissão do mesmo a outro periódico. As opiniões e conceitos emitidos são de exclusiva responsabilidade dos autores, não refletindo necessariamente as idéias da Editoria. A Editoria, porém se reserva o direito de sugerir ou solicitar as modificações que se fizerem necessárias. A reprodução completa ou parcial dos artigos é permitida, desde que citada a fonte.

Informação para aquisição

Para associar-se à Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas ou adquirir exemplares avulsos da CBAB envie e-mail para cbabjournal@gmail.com.

Artigo

A **CBAB** publica artigo exclusivamente em inglês, porém faculta ao autor a possibilidade de submetê-lo em português para, após o aceite, providenciar a sua tradução. O ônus da tradução é de responsabilidade do autor, porém a **CBAB** recomenda que ela seja feita por seu tradutor oficial. Se o artigo for submetido em inglês, ele deve ser obrigatoriamente revisado, em termos linguísticos e após o aceite. A revisão será feita exclusivamente pelos tradutores oficiais da CBAB, com ônus para o autor. Contribuições são submetidas via WEB acessando <http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/index.php>, clicando **Submission**. O sistema de gerenciamento de artigos solicitará o e-mail do autor correspondente e a geração de uma senha. **Os manuscritos deverão ser inseridos sem os nomes dos autores e seus endereços, os quais deverão ser disponibilizados em um formulário à parte.** Como a CBAB opera

com revisão do tipo duplo cego, autores não devem revelar suas identidades no manuscrito. Com seu e-mail e sua senha pessoal, o autor poderá acompanhar toda a tramitação do seu artigo. A avaliação do artigo será feita por revisores *ad hoc* especialistas, para auxiliar a Editoria quanto à decisão final de aceite, modificações ou rejeição do mesmo. O artigo completo deverá conter, preferencialmente, a seguinte sequência: title, abstract, key words, introduction, material and methods, results and discussion, acknowledgements, título, resumo, palavras-chave, references, and tables and black-and-white figures. Ilustrações coloridas serão permitidas, porém com ônus para o autor correspondente. A digitação deverá ser feita em Word for Windows versão 6.0 em diante, em fonte times new roman, tamanho 12, espaçamento duplo, formato A4, com margens de 20 mm e paginação consecutiva no topo à direita. O artigo não deverá exceder a 18 páginas, incluindo tabelas e figuras digitadas em páginas separadas (uma por página) ao final do texto. Todas as equações, modelos e símbolos devem ser inseridos via Microsoft Equation. O Título deverá ser claro, conciso e refletir a essência do artigo. Escrito com a inicial maiúscula e posto a esquerda, não deve conter mais de 15 palavras digitadas em times new roman 14, bold. O Abstract, tanto quanto o Resumo, não deve exceder a 150 palavras. Um máximo de cinco palavras-chave, diferentes do título, será permitido. A introdução deve incluir uma breve revisão de literatura sobre o tema e os objetivos da pesquisa. O Material e Método deve ser redigido de modo que outro pesquisador possa repetir a experiência. Preferencialmente, Resultados e Discussão devem ser apresentados em conjunto, para maior dinâmica de leitura. Os agradecimentos devem ser sucintos, limitados a colaboradores efetivos e agências financiadoras. O Resumo deve ser precedido do título do artigo em português. **Cuidado com as Referências.** Não citar resumos de eventos, teses e nem artigos não publicados. Esses cuidados darão maior credibilidade ao artigo e a revista. As citações feitas no texto pelo sobrenome do autor e ano (por exemplo, Liu 1998, Pereira and Amaral Júnior 2001, William et al. 1990) deverão ser ordenadas alfabeticamente no item Referências, seguindo os exemplos abaixo:

Artigos em periódicos:

Pereira MG and Amaral Júnior AT (2001) Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 1: 3-10.

Livro:

Ramalho MAP, Ferreira DF and Oliveira AC (2000) **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Editora UFLA, Lavras, 326p.

Capítulo de livro:

Sakiyama NS, Pereira AA and Zambolim L (1999) Melhoramento do café arábica. In: Borém A (ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Editora UFV, Viçosa, p. 189-204.

Congresso:

Frey KJ (1992) Plant breeding perspectives for the 1990s. In: Stalker HT and Murphy JP (eds.) **Proceedings of the Symposium on Plant Breeding in the 1990s**. CAB, Wallingford, p. 1-13.