



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ELIANA DE MEDEIROS OLIVEIRA

INTERAÇÕES ENTRE MICRORGANISMOS E *Cattleya purpurata*,
GERMINAÇÃO SIMBIÓTICA E OUTRAS CONSIDERAÇÕES

INTERACTIONS BETWEEN MICROORGANISMS AND *Cattleya*
purpurata, SYMBIOTIC GERMINATION AND OTHER
CONSIDERATIONS

CAMPINAS

2023

ELIANA DE MEDEIROS OLIVEIRA

**INTERAÇÕES ENTRE MICRORGANISMOS E *Cattleya purpurata*,
GERMINAÇÃO SIMBIÓTICA E OUTRAS CONSIDERAÇÕES**

**INTERACTIONS BETWEEN MICROORGANISMS AND *Cattleya*
purpurata, SYMBIOTIC GERMINATION AND OTHER
CONSIDERATIONS**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para obtenção do título
de Doutora em Biologia Vegetal.*

*Thesis presented to the Institute of Biology of the
University of Campinas in partial fulfillment of
the requirements for the degree of Doctor in
Plant Biology.*

Orientadora: Juliana Lischka Sampaio Mayer

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ELIANA DE
MEDEIROS OLIVEIRA E ORIENTADA POR JULIANA
LISCHKA SAMPAIO MAYER.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

OL4i Oliveira, Eliana de Medeiros, 1980-
Interações entre microrganismos e *Cattleya purpurata*, germinação
simbiótica e outras considerações / Eliana de Medeiros Oliveira. – Campinas,
SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Juliana Lischka Sampaio Mayer.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Orquidea. 2. Germinação. 3. Simbiose. 4. Micro-organismos. 5. Micorriza.
I. Mayer, Juliana Lischka Sampaio, 1979-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Interactions between microorganisms and *Cattleya purpurata*,
symbiotic germination and others considerations

Palavras-chave em inglês:

Orchids

Germination

Symbiosis

Microorganisms

Mycorrhizas

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Juliana Lischka Sampaio Mayer [Orientador]

Ingrid Koch

Maria Alice Neves

Fábio Pinheiro

Aline Bertolosi Bombo

Data de defesa: 30-06-2023

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7937-6021>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8670812754571144>

Campinas, 30 de junho de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer

Profa. Dra. Ingrid Koch

Profa. Dra. Maria Alice Neves

Prof. Dr. Fabio Pinheiro

Profa. Dra. Aline Bertolosi Bombo

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus filhos, mãe, pai (em memória), irmãos e amigos, que me ajudaram a viver estes últimos anos, sem vocês sobreviver, e escrever, não teria sido possível. Obrigada.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal de Santa Catarina que além de me permitir o afastamento integral para exercer as atividades do doutorado, durante 3 anos e meio, ainda me apoiou com a infraestrutura dos laboratórios: LCME, LAMEB (além da infraestrutura, um ótimo atendimento dos técnicos), Laboratório de Ecologia do Solo, LFDGV, e NEUVIN.

Agradeço também à UNICAMP por oferecer uma boa infraestrutura e o serviço de profissionais altamente qualificados.

À profa. Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer pela orientação, inspiração e paciência.

Ao prof. Miguel Pedro Guerra, pela orientação e apoio.

Ao prof. Paulo Emílio Lovato, por disponibilizar toda a infraestrutura do laboratório de Ecologia do Solo, e pelas discussões sobre mutualismos entre plantas e microrganismos.

Aos membros da banca, Ingrid, Aline, Maria Alice, Fábio e João Paulo, que dedicaram seu tempo e atenção na leitura e melhora do texto da tese.

Aos orquíditos Ingo Bauer, Alexandre de Medeiros e Marcelo Nascimento, por estarem sempre dispostos a tirar minhas dúvidas e me fornecer matérias das orquídeas, como livros e cápsulas da *Cattleya purpurata*.

Aos colegas e amigos que juntaram suas mãos e mentes às minhas, me ajudando a entender esse universo novo de interações, colaborações, parcerias e mutualismos: Anna de Neri, Carlos Eduardo Siqueira, Edenilson Meyer, Kelly Besen, Andressa Hilha, Mateus Uller, Juliano Machado, Giulia Burle, Márcia Fanta, Karina Cesca, Maira Bicca, Andrews, Gunther, Luiz Pompermeyer, Eduardo Isoppo, Luciano Oliveira, Caroline Vieira, Deise Rebelo, Susane Lopes.

À minha família incrível, que amo mais que tudo, pessoas que me inspiram, cuidam de mim, me fazem acreditar num mundo melhor: Damiana, Yuri, Davi, Diana, Adriano, Júnior, Lucas e Laryssa.

Às minhas grandes amigas, e amigos, que me apoiam, mesmo longe: Bety Fernandes (BFF), Suellem Tosi, Regina, Cecília, Mauro, Maiara.

Quero agradecer às pessoas fantásticas que me inspiram: Damiana (de novo, e para sempre!), Débora Biana, Carla Akotirene, bell hooks, Neil Gaiman, Alan Moore, Jaime Hernandez, Robert Smith, Marlies Sazima, Maria Alice Neves, Tammy Arai, amigas da acrobacia aérea, Renata, Aline, Duda, prof. Arestides, Luciana, Stéfani, Maíra Bicca.

Aos meus amados primos e tios e tias de São Paulo, que me acolheram, deram amor e

apoio a meus filhos e minha mãe.

Uma das pessoas mais importantes para que eu conseguisse escrever a tese: minha psicóloga Carina, e um obrigado especial aos psicólogos dos meus filhos: Cleiton, Tiago e Gustavo.

Por fim, e não menos importante, quero agradecer a mim, por sobreviver. Quero agradecer a mim por não desistir, mesmo querendo permanecer deitada pra sempre. Quero agradecer a mim mesma, por lutar, por ser sempre gentil, disposta a ajudar. Quero agradecer a mim mesma por caminhar em frente, mesmo quando eu não tinha mais esperanças. Quero agradecer a mim mesma, por me perdoar e me enxergar novamente com olhos livres de raiva e de culpa.... (inspirado na fala do Snoopy Doggy ao receber sua estrela na calçada da fama, 2018).

À Jesus Cristo por ensinar o mais importante: “Amai-vos uns aos outros”.

EPÍGRAFE

“Às vezes você acorda, às vezes a queda te mata, e, às vezes, quando você cai, você voa.”

Neil Gaiman, em *Sandman*

RESUMO

As orquídeas compõem a família botânica com maior riqueza de espécies entre as Angiospermas e, além disso, essas plantas ocupam uma grande variedade de habitats, e tem distribuição cosmopolita. As orquídeas desenvolveram também estratégias ímpares para se estabelecerem no ambiente. Suas flores podem apresentar muitas formas, cores e aromas diferentes atuando para atrair polinizadores. As sementes das orquídeas são microscópicas, geralmente dispersas pelo vento, e necessitam obrigatoriamente de fungos micorrízicos específicos para germinarem, e para que os protocormos, estruturas embrionárias exclusivas, se desenvolvam. As raízes mostram uma estrutura comum a todas as orquídeas, e muito rara em outras plantas, o velame. O velame é uma epiderme diferenciada, multisseriada e sem protoplasto na sua maturidade, e responsável pela absorção de água e nutrientes. Buscando conhecer os parceiros simbiotes da orquídea *Cattleya purpurata*, espécie ameaçada de extinção, foram realizados testes de germinação, dentre fungos micorrízicos de orquídeas, e foram feitas análises morfológicas das raízes para se conhecer e identificar os principais grupos de microrganismos que se associam à orquídea. Sementes inoculadas com fungos, do gênero *Tulasnella*, isolados da própria *C. purpurata*, de raízes e de protocormos na natureza, apresentaram os maiores níveis de desenvolvimento, enquanto outra espécie de fungo micorrízico orquidóide, do gênero *Ceratobasidium*, não foi capaz de germinar as sementes. Esses achados somados à literatura existente, sugerem que a germinação de orquídeas do gênero *Cattleya* tenham especificidade por fungos do gênero *Tulasnella*. Quanto às alterações celulares na ontogênese da germinação simbiótica, após a entrada das hifas do fungo nas células do suspensor e da região adjacente, com células ricas em lipídeos, as hifas se enovelam, e formam pélotons na região mediana e apical do embrião. Com o avanço do desenvolvimento, organelas como mitocôndrias e protoplastos, se tornam mais numerosos, e os protoplastos se diferenciam em amiloplastos, e em seguida em cloroplastos. Após o sucesso do desenvolvimento dos protocormos e plântulas, os fungos micorrízicos ainda desempenham papel importante nas raízes, no processo de nutrição das orquídeas. Estimamos a taxa de micorrização das raízes, em 18%, e descrevemos a ultraestrutura dos pélotons, mostrando que não há parede celular vegetal ao redor das hifas, e que a membrana plasmática vegetal está em contato direto com a parede do fungo. Mitocôndrias e vesículas estão frequentemente associadas à membrana perifúngica. Na raiz, o velame exibe uma estrutura muito complexa, com até seis camadas, contando com paredes celulares espessadas, com muitos poros, sem protoplasto, que forma um microambiente capaz de abrigar uma ampla gama de microrganismos. Imagens de microscopia confocal e eletrônica de transmissão, revelaram que a microbiota do velame é composta por bactérias, fungos, cianobactérias, algas e até animais, como os nematódeos. Este diversificado microbioma pode ter papel fundamental na nutrição e nas respostas da orquídea *C. purpurata* frente à estresses bióticos e abióticos. Além disso, o microbioma, associado ao potencial complexo ecológico, sugere que as raízes da orquídea atuem como um órgão-ecossistema, termo já usado em um estudo prévio, onde foi descrita a riqueza de algas e cianobactérias nas raízes de orquídeas epífitas da Índia.

Palavras-chave: Orquídeas. Germinação. Simbioses. Microrganismos. Micorrizas.

ABSTRACT

Orchids comprise the botanical family with the greatest species richness, in addition, these plants occupy a wide variety of habitats and have a cosmopolitan distribution. Orchids have also developed unique strategies to establish themselves in the environment. Their flowers can have many different shapes, colors and aromas, performing to attract pollinators. Orchid seeds are microscopic, usually dispersed by the wind, and compulsorily need specific mycorrhizal fungi to germinate, and for the development of the protocorms, exclusive embryonic structures. The roots show a structure common to all orchids, and very rare in other plants, the velamen, which is a differentiated epidermis, which is multiseriated and without a protoplast at maturity, and responsible for absorbing water and nutrients. Seeking to know the symbiotic partners of the orchid *Cattleya purpurata*, an endangered species, germination tests were carried out, among mycorrhizal fungi of orchids, and morphological analyses of the roots were also carried out to know and identify the main groups of microorganisms that are associated with the orchid. Seeds inoculated with fungi, of the genus *Tulasnella*, isolated from the *C. purpurata* itself, from roots and also from protocorms in nature, showed the highest levels of development, while another species of orchid mycorrhizal fungus, genus *Ceratobasidium*, was not able to germinate the seeds. These findings added to the existing literature, suggest that the germination of orchids of the genus *Cattleya* have specificity for fungi of the genus *Tulasnella*. As for cellular alterations in the ontogenesis of symbiotic germination, after the fungal hyphae enter the suspensor cells and the adjacent region, with cells rich in lipids, the hyphae become entwined and form pelotons in the median and apical region of the embryo. As development progresses, organelles such as mitochondria and protoplasts become more numerous, and protoplasts differentiate into amyloplasts and then into chloroplasts. After the successful development of protocorms and seedlings, what influences orchid nutrition? In the roots, mycorrhizal fungi still play an important role in the nutrition of orchids, and in the present study, in addition to estimating the root mycorrhization rate of 18%, the ultrastructure of the pelotons was described, showing that the plant cell wall around the hyphae is not present, and that the plant plasma membrane is in direct contact with the fungal wall. Mitochondria and vesicles are often associated with the perifungal membrane. At the root, the velamen exhibits a very complex structure, with up to six layers, with thickened cell walls, with many pores, without protoplast, which forms a microenvironment capable of harboring a wide range of microorganisms. Confocal and transmission electron microscopy images revealed that the microbiota of the velamen is composed of bacteria, fungi, cyanobacteria, algae and even animals, such as nematodes. This diverse microbiome may play a key role in the nutrition and the responses to biotic and abiotic stresses in the orchid *C. purpurata*. In addition, the microbiome, associated with the ecological complex potential, suggests that the orchid roots act as an organ-ecosystem, a term already used in a previous study, where the richness of algae and cyanobacteria in the roots of epiphytic orchids from India was described.

Keywords: Orchids. Germination. Symbioses. Microorganisms. Mycorrhizas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- Figura 1: Imagens dos isolados de fungos usados nos testes de germinação mostrando as características do gênero *Tulasnella*. Os isolados ROB 218, Isca 2 e Isca 3 mostraram as mesmas características. A) Foto da colônia de Isca 2, em meio BDA após 2 semanas de cultivo no escuro. B) Hifas e células monilióides (m) de isolado de Isca 2, a seta indica a ramificação em angulo de 90°, e constrição no ponto de ramificação. C) Septo dolipórico característico de *Tulasnella*, com doliporo (d) com parentossomos curvos e imperforados (cabeça de seta), (m) mitocôndria, (li) lipídeo.....30
- Figura 2: Protocormos de *C. purpurata* após 50 dias de germinação e desenvolvimento, em condições diferentes de desenvolvimento dos protocormos. A) Visão de diversos protocormos no estágio de desenvolvimento 3, quando é possível notar que algumas sementes não germinaram, encontrando-se no estágio 1 (embriões marrons). B) Protocormos com o primórdio foliar (seta). C) Visão geral e em detalhe D) de sementes não germinadas, apenas no meio OMA (controle negativo). E) Visão geral e em detalhe F) de sementes não germinadas, com micélio (branco) abundante, do tratamento com o isolado PA03 crescendo sobre elas...35
- Figura 3: Protocormos de *C. purpurata* após 50 dias de germinação com tratamentos diferentes. A) Meio MS com diversos protocormos no estágio de desenvolvimento 3, quando é possível notar que algumas sementes não germinaram (embriões beges). B) Protocormos em meio MS, mostrando o primórdio foliar (seta). C) Protocormos do tratamento OMA+ROB 218, com presença de pelos absorventes (cabeça de seta). D) protocormos em desenvolvimento no tratamento OMA+ROB 2018, com a primeira folha (*) em desenvolvimento (estágio 4); E) Protocormos cultivados em meio OMA, na presença do isolado Isca 2, apresentando vários protocormos com 1 folha e pelos absorventes (cabeça de seta). F) Detalhe de um protocormo com a primeira (*) e a segunda folha (**) desenvolvidas. G) Protocormos do tratamento OMA e Isca 3, no estágio 6 de desenvolvimento, com 2 folhas e pelos absorventes (cabeça de seta). H) Protocormo no estágio 6 de desenvolvimento, com primeira (*) e segunda folha (**) se desenvolvendo.36
- Figura 4: Gráfico de pontos das coordenadas 1, 2 e 3, mostrando a sobreposição dos grupos Isca 2 e Isca 3, e que os tratamentos com os meios de cultivo MS e ROB218 ocupam uma posição entre os grupos PA03 e meio OMA, e entre os tratamentos com Iscas.37
- Figura 5: Gráfico da análise de correspondência (AC), mostrando a proximidade dos tratamentos em relação aos estágios de desenvolvimento das orquídeas.....38

Figura 6: Gráfico de barra da média de desenvolvimento das orquídeas nos tratamentos, em cada um dos meios de cultura, combinados ou não com os isolados fúngicos.	38
Figura 7: Gráfico de barra da média de total de indivíduos por estágio de desenvolvimento da orquídea, com comparação aos seis tratamentos analisados.	39
Figura 8: Fotomicrografias de sementes de <i>C. purpurata</i> , em microscopia de luz de campo claro (A), e Microscopia Eletrônica de Transmissão (B-D). A) Visão geral das sementes, composta pelo embrião propriamente dito, com células do suspensor na região basal, e envolto pela testa (te). Observar as células com lipídeo (*) na base do embrião. B) Detalhe das células do suspensor (su), com a testa adjacente (te). C) Células da região lipídica (*) mostrando o conteúdo elétron-denso. D) Células da região apical (ap), com citoplasma cheio de pequenos vacúolos.	40
Figura 9: Imagens de Microscopia Confocal (MC; A e D), e de luz, com campo claro (MLTCC; A-C e E). A) Campo claro e fluorescência conjugada no microscópio confocal, mostra o embrião dentro da testa (seta), com as células do suspensor (su) com hifas marcadas em vermelho. B) Células do suspensor (su) colonizado por hifas (cabeça de seta), e hifas fora da testa. C) Células do suspensor e da região lipídica (rl) colonizadas com hifas (cabeça de seta) e envolvido pela testa (seta). D) Embrião com hifas fluorescendo em vermelho (cabeças de seta), colonizando a região do suspensor (su), e na região apical (ap) livre de hifas, a testa (seta) fluoresce em azul. E) Embrião mostrando a região apical com células não colonizadas por fungo, a seta indica a testa.	41
Figura 10: Imagens de microscopia de campo claro (MLTCC; A-B e D) e fluorescência, no confocal (MC; C), de embriões de <i>C. purpurata</i> germinando. A) Hifas, em vermelho, passando pelo suspensor (su) e chegando à região apical do embrião, formando os pélotons. B) Embrião cujas células micorrizadas (cabeça de seta) mostram um aumento de volume. C) Hifas enveladas (cabeças de seta), formando o péloton e fazendo com que o volume da célula aumente. D) Protocormo formando os primeiros pelos absorventes (setas).	42
Figura 11: Micrografias mostrando o desenvolvimento da interação fungo-célula do protocormo. As hifas (cabeça de seta) se comportam diferentemente se estão em células do polo suspensor, onde se alongam e atravessam o citoplasma (A). Nas células da região mediana (apical) do protocormo (B), onde as hifas se envelam, formando os pélotons, essas células, além do aumento do citoplasma, apresentam núcleo hipertrófico (*). C) Hifa íntegra (hf) e hifa em processo de digestão (hd). D) Corpo mielínico (cm) formado no interior de hifa bem elétron-densa. E) Compartimento hifal delimitado pelas paredes celulares fúngicas (pf), repleto de membranas degradadas (setas). F) Estágio avançado de digestão das hifas (cabeça de seta).	

.....43

Figura 12: Eletromicrografias de embriões e protocormos de *C. purpurata*. Na coluna da esquerda é apresentada a evolução das células embrionárias da região mediana e apical, e na da direita, a evolução das células da região basal, a qual contém células ricas em substâncias lipídicas do embrião. A) Células da semente, mostrando muitos vacúolos em todo o citoplasma, e núcleos pequenos (nu). B) A maior parte do citoplasma é preenchida por lipídeos, que se apresentam elétrondensos (li), e pequenos vacúolos (va). C) Células apresentam ainda muitos vacúolos (va), mas também alguns amiloplastos, com os grãos de amido (am). D) Células da região lipídica do embrião, com grandes gotículas de lipídeo (li), já com vacúolos (va) grandes e núcleo (nu). E) Muitos vacúolos (va) circundando os muitos amiloplastos (am), que por sua vez, envolvem o núcleo (nu). F) células com menor conteúdo lipídico (li), e com vacúolos grandes (va). G) Plastídeo já com granum (*), com membranas tilacóides organizadas, porém ainda apresenta grãos de amido (am). H) Mitocôndrias (mi) envolvem e circundam gotículas de lipídeos (li).....45

CAPÍTULO 2

Figura 1: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV; A-C) e de Microscopia Confocal (MC; D-E), mostrando a raiz de *C. purpurata*. A) Secção transversal de raiz, mostrando as regiões dorsal (dor), arredondada e a região ventral (ven), achatada, o cilindro vascular (CV), o córtex (Cor) e o velame (Vel), com camadas de células mortas, barra=1mm. B) Hifas penetrando no córtex, através do velame e célula de passagem. C) Detalhe das estrias e poros na parede celular das células do velame. D) Pélotons íntegros no parênquima cortical (cabeça de seta) e paredes celulares espessadas da exoderme (azul mais intenso). E) Microrganismos simbiotes (cabeça de seta) no interior do velame.....60

Figura 2: Imagens de Microscopia Confocal (MC; A), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV; B) e de Transmissão (MET; C-G), mostrando a interface células corticais e hifas de fungos micorrízicos em *C. purpurata*. A) Péloton íntegro, com hifas passando para a célula cortical adjacente (seta), e pélotons em diferentes estágios de degradação (cabeças de seta). B) Parênquima cortical, ocupado por pélotons degradados (cabeça de seta). C) Detalhe de célula parenquimática delimitada por parede celular (seta), com hifas íntegras (cabeça de seta) e péloton degradado (Pd). D) Hifas (Hi) delimitadas pela membrana perifúngica (cabeça de seta) e circundadas por muitas mitocôndrias (m) da célula vegetal. E) Vesículas (cabeça de seta) próximas e se fundindo à membrana perifúngica. F) Detalhe do doliporo (Do) do fungo (Hi) micorrízico. G) Detalhe de vesículas com material elétrondenso se fundindo à membrana perifúngica, e sendo exportada ao meio em contato com a hifa micorrízica (Hi).....61

Figura 3: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV; A), técnica de microscopia de luz transmitida em campo claro (B) e fluorescência no microscópio confocal (MC; C), mostrando fungos endofíticos que ocupam o velame de *C. purpurata*. A) Vista geral do córtex (Co) e do velame (Vel), mostrando hifas de diversos calibres (cabeça de seta). B) Hifas (setas) e esporos (cabeça de seta) de fungos endofíticos melanizados no velame. C) Hifas de morfologias distintas (setas) no velame. 63

Figura 4: Imagens de Microscopia Confocal (MC), a partir da autofluorescência das paredes celulares da raiz (em azul) e dos cloroplastos de *C. purpurata* (em vermelho), (imagens A-C). Em D, imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de microalga verde no velame. A) Vista geral de parte da raiz mostrando, as múltiplas camadas do velame, os organismos fotossintetizantes distribuídos pelo velame (setas) e os cloroplastos também no córtex da raiz. B) Em azul, as paredes do velame, com poros, e em vermelho as microalgas, filamentosas e unicelulares (setas). C) Detalhe de alga filamentosa, setas mostram as células com alguns cloroplastos. D) Detalhe de alga verde, com plastoglóbulo (P) no cloroplasto (Cl) e no núcleo (Nu), e parede celular do velame (cabeça de seta). 64

Figura 5: Imagens de Microscopia Confocal (MC), mostrando cianobactérias no velame de *C. purpurata*. A) Velame com espaços, onde se observa presença de aglomerados de cianobactérias, e exoderme com parede espessada. B) Vista longitudinal da exoderme (Exo) e velame (Ve), mostrando células de passagem (menores) e células lignificadas (maiores), e grande concentração de agrupamentos de cianobactérias no velame, logo acima da exoderme. C) Cianobactérias que apresentam um envoltório extracelular, que também autofluoresce em azul. D) Cianobactérias dispostas em talos filamentosos no velame. 65

Figura 6: Imagens de Microscopia Confocal (MC), mostrando microrganismos e pélotons degradados (autofluorescência em vermelho), e a presença de cianobactérias em células de passagem e do parênquima cortical de *C. purpurata*. A) Cianobactérias presentes no velame (Ve) e exoderme (Ex). B) Presença de cianobactérias (seta) em célula parenquimática do córtex, e pélotons degradados no córtex (cabeça de seta). C) Detalhe das cianobactérias dentro de célula, evidenciada na autofluorescência da parede da célula cortical (em azul) e por pélotons degradados nas células parenquimáticas adjacentes (cabeça de seta). 66

Figura 7: Imagens de Microscopia Confocal (MC), mostrando microrganismos (em vermelho) presentes no velame de *C. purpurata*. A) Vista tangencial da raiz mostrando muitas células do velame com microrganismos, presença de um nematódeo (seta), e parte da exoderme (Ex), com o citoplasma da célula de passagem corado em vermelho (cabeça de seta). B) Vista de um nematódeo, com parte de seu interior à mostra (seta). C) Nematódeo (seta) ocupando algumas

células do velame.....67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ap	Região apical do embrião ou do protocormo de orquídea
BDA	Meio de cultivo Batata Dextrose Ágar
BOD	Incubadora do tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CNCFlora	Centro Nacional de Conservação da Flora
CONSEMA	Conselho Estadual do Meio Ambiente de Santa Catarina
Cor	Córtex
CV	Cilindro vascular
Do	Doliporo
Hi	Hifas micorrízicas
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
MC	Microscopia Confocal
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
ML	Microscopia de Luz
µL	Microlitro
mL	Mililitro
MLTCC	Microscopia de Luz Transmitida de Campo Claro
mm	Milímetro
MNM	Meio Norman-Merlin modificado
MS	meio de cultivo Murashige & Skoog
OMA	Meio de cultivo ágar-aveia
nm	Nanômetro
Pd	Péloton degradado
PMLP	Parque Municipal da Lagoa do Peri
rl	Região lipídica dos embriões
SC	Santa Catarina
SP	São Paulo
su	Região do suspensor
te	Testa, envoltório das sementes

TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
UV	Radiação Ultravioleta
Vel	Velame

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	20
2.	CAPÍTULO 1	25
2.1.	INTRODUÇÃO	27
2.2.	MATERIAL E MÉTODOS	29
2.2.1.	Isolados de Fungos micorrízicos para a germinação de sementes	29
2.2.2.	Taxa de germinação simbiótica e desenvolvimento de protocormos	30
2.2.3.	Estudo morfológico e ultraestrutural da ontogênese da interação embrião – fungo micorrízico	33
2.2.4.	Microscopia de Luz Transmitida Campo Claro (MLTCC), Confocal (MC) e Eletrônica de Transmissão (MET)	33
2.3.	RESULTADOS	34
2.3.1.	Taxa de germinação e de desenvolvimento de protocormos de <i>Cattleya purpurata</i> em condições simbióticas e assimbiótica	34
2.3.2.	Ontogênese do estabelecimento da simbiose do fungo e os protocormos de <i>C. purpurata</i>	39
2.4.	DISCUSSÃO	46
2.5.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	49
2.6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
3.	CAPÍTULO 2	54
3.1.	INTRODUÇÃO	56
3.2.	MATERIAL E MÉTODOS	57
3.2.1.	Material vegetal e sítios de coleta	57
3.2.2.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de transmissão (MET)	57
3.2.3.	Microscopia Confocal (MC)	58
3.2.4.	Avaliação da colonização micorrízica das raízes	59
3.3.	RESULTADOS	59
3.4.	DISCUSSÃO	68
3.5.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	72
3.6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE	78
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
	ANEXOS	82

ANEXO I – DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA.....	83
ANEXO II - DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE AOS DISPOSITIVOS DA LEI N° 9610/98	84

1. INTRODUÇÃO GERAL

As orquídeas, plantas da família botânica Orchidaceae, têm relevante importância ecológica, econômica e cultural (ARDITTI, 1992; HOENE, 1949). Por apresentarem características ornamentais e serem de fácil cultivo, muitas espécies sofrem declínio populacional devido a sua extração ilegal na natureza. *Cattleya purpurata* ((Lindl. & Paxton) Van den Berg, 1855) – também conhecida como *Laelia purpurata* – é uma orquídea com flores vistosas, belas e com agradável perfume, sendo popularmente chamada de “A Rainha das Orquídeas do Brasil”, e no exterior, conhecida como “*Summer Queen*”. Esta espécie de orquídea é uma das que mais sofre com a retirada ilegal em ambientes naturais, além da redução de seu habitat devido ao avanço das fronteiras urbanas e rurais (NASCIMENTO, 2019).

A orquídea *C. purpurata*, que tem uma distribuição restrita à Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste do Brasil, vem sofrendo considerável redução nas suas populações naturais, sendo considerada extinta nos Estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, onde não é coletada há algumas décadas (CNCFLORA, 2013). Além dos problemas acima relatados, sobre seu declínio populacional natural, a espécie apresenta baixa taxa de frutificação (CABALLERO *et al.*, 2016) e uma baixa taxa de sobrevivência dos indivíduos juvenis na natureza, que necessitam encontrar parceiros fúngicos específicos para o estabelecimento da nova geração. Por todos esses motivos, essa espécie encontra-se em risco de extinção, sendo classificada como “Vulnerável” na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (MMA, 2022), bem como com status de “Vulnerável” na Lista Vermelha do Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFLORA, 2023) e “Em Perigo de Extinção”, pelo Conselho Estadual do Meio Ambiente de Santa Catarina (CONSEMA, 2014).

Orquídeas apresentam flores com morfologia complexa, e interações altamente diferenciadas e especializadas com seus visitantes florais. Sabe-se que as especializações das flores estão relacionadas à interação com seus agentes polinizadores, tendo a família Orchidaceae experimentado uma alta pressão seletiva e irradiação adaptativa no processo evolutivo (STERN, 2014).

Após a polinização e a fecundação, as orquídeas das regiões tropicais podem produzir milhares, e até milhões, de sementes por fruto, sendo que na maior parte das espécies as sementes são muito pequenas, com dimensões microscópicas, cujos tamanhos variam de 0,005 mm até 6 mm (ARDITTI, 1992). Em espécies de *Anathallis* e *Acianthera*

(Pleurothallidinae), observou-se sementes ainda menores, de 0,002 mm (informação pessoal¹). Além de muito pequenas, as sementes apresentam um embrião muito pouco diferenciado, sem a instalação dos meristemas, sendo semelhante ao embrião de fase globular comum à maioria das Angiospermas. Adicionalmente, as sementes de orquídeas não possuem tecido de reserva, o endosperma (CLEMENTS, 1999; DRESSLER, 1990).

As sementes de orquídeas apresentam um padrão uniforme de germinação e desenvolvimento inicial, onde a hidratação da semente promove um aumento no volume do embrião, que pode romper o tegumento e liberar o protocormo; ou apenas aumentar o seu volume, sem o rompimento da testa (tegumento da semente). Este protocormo, ainda muito imaturo, se desenvolve numa estrutura tuberiforme, exclusiva de Orchidaceae, sendo clorofilada nas espécies epífitas (ARDITTI, 1992). A forma do protocormo é específica para cada táxon, podendo ser oval, alongada, discoide, ramificada ou esférica (BATYGINA *et al.*, 2003).

No ambiente natural, o protocormo não continua o seu desenvolvimento enquanto não houver a associação a um fungo micorrizico específico. Quando esta associação acontece, o fungo fornece a nutrição inicial, com o aporte de carboidratos e de compostos nitrogenados ao protocormo (ARDITTI, 1992; ARDITTI; GHANI, 2000). O protocormo prossegue então o desenvolvimento, com a formação primeiramente do meristema apical caulinar, o qual dará origem ao primórdio foliar e às primeiras folhas (HARRISON, 1977). Isso quer dizer que, em ambiente natural, sem o parceiro fúngico específico, não há germinação e desenvolvimento de protocormos, e conseqüentemente, não há o estabelecimento de uma nova geração. Assim, infere-se que fungos micorrízicos e orquídeas estabelecem uma relação mutualística, onde ambos os grupos se beneficiam da interação. A orquídea, no início do desenvolvimento, disponibiliza compostos nitrogenados ao fungo, e quando fotossintetizante, disponibiliza carbono, na forma de fotoassimilados, enquanto o fungo micorrízico contribui com fosfato e nitrogênio (DEARNALEY; CAMERON, 2017; VIJ *et al.*, 2002). Em algumas espécies de orquídeas, as chamadas micoheterotróficas, toda a nutrição, inclusive os carboidratos, continuam sendo fornecidos pelos fungos micorrízicos durante toda o ciclo de vida da planta.

Fungos isolados das raízes de plantas adultas são capazes de promover a germinação das sementes e o desenvolvimento dos protocormos (ALEXANDER; HADLEY, 1983; MUIR, 1989; PEREIRA, 2006; WARCUP, 1981). Dentre os fungos conhecidos por facilitarem a germinação e promoverem o desenvolvimento inicial dos protocormos, destacam-

¹ Dados de observação de materiais de pesquisa, no decorrer das análises microscópicas que compõe o primeiro projeto do doutorado, projeto este que teve que ser alterado. Análises conduzidas de 2017 a 2018.

se os chamados fungos rizoctonioides (do inglês *Rhizoctonia-like*).

Muitos estudos têm contribuído para o conhecimento dos fungos associados às raízes das orquídeas. Alguns priorizam a identificação dos fungos micorrízicos, os quais formam uma interação característica em orquídeas, nas quais as hifas crescem e se enovelam dentro das células do protocormo, ou do parênquima cortical das raízes, formando estruturas conhecidas como pélotons. Neste grupo de fungos micorrízicos orquidoides estão representantes de diversos gêneros e de diversas famílias de Basidiomycota, como por exemplo *Tullasnella* J. Schröt. (Tulasnellaceae), *Sebacina* Tul. & C. Tul. (Sebacinaceae), *Ceratobasidium* D.P. Rogers e *Rhizoctonia* DC (Ceratobasidiaceae), dentre outros. Estes fungos têm características micromorfológicas em comum, como por exemplo, a formação de células monilióides, que são células com volume aumentado na porção final das hifas, ramificação em ângulo de 90°, septo dolipórico característico para alguns gêneros, constrição perto do ponto de ramificação, dentre outras. Embora estes fungos não formem um grupo monofilético, são conhecidos como fungos rizoctonióides (GARCIA *et al.*; 2006, OTERO *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2009).

Ainda que as orquídeas sejam totalmente dependentes dessa simbiose, em pelo menos uma fase do ciclo de vida, os fungos micorrízicos não dependem das orquídeas, e têm papéis ecológicos distintos, podendo ser formadores de ectomicorrizas com outras plantas, saprófitos, ou até mesmo patógenos vegetais (GARCIA *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-CHÁVEZ *et al.*, 2018; OBERWINKLER *et al.*, 2017). Diversos trabalhos têm focado em descrever e identificar todos os fungos endofíticos, isto é, fungos que vivem em algum tecido das plantas sem lhe causar um prejuízo (BACON; WHITE, 2016; JIANG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2021). No caso das orquídeas, além dos fungos micorrízicos – que são também endofíticos – existe uma diversidade grande, ainda pouco conhecida em verdade, de fungos que vivem no velame, e são chamados de endofíticos de orquídeas (MA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2018; SHAH *et al.*, 2019).

As raízes das orquídeas têm uma epiderme modificada em relação às outras plantas. Esse tecido geralmente apresenta mais de uma camada de células, e pode ser ainda mais modificado em espécies epífitas. O velame tem uma função chave na nutrição das orquídeas; além disso, devido ao espessamento e composição da parede, que é impregnada de lignina e pectinas, garante proteção mecânica aos tecidos internos da raiz (JOCA *et al.*, 2020; ZOTZ; WINKLER, 2013).

O velame se apresenta como uma epiderme que, na sua maturidade, conta apenas com paredes celulares espessadas, com poros e sem protoplasto (PRIDGEON, 1987; ROTH-

NEBELSICK *et al.*, 2017). Como uma adaptação para o meio epifítico, as orquídeas apresentam o velame pluriestratificado, com espessamento da parede em anéis, ou estrias, e com muitos poros. Esse tecido tem uma grande capacidade de embebição de água (HAUBER *et al.*, 2020), absorvendo água muito rapidamente, em questão de segundos, mas também a perdendo por evapotranspiração em muitas horas do fotoperíodo (ZOTZ; WINKLER, 2013). Além disso, provém um nível de proteção contra a radiação ultravioleta (UV) (CHOMICKI *et al.*, 2015). Estas características combinadas promovem a formação de um microambiente. No interior do velame, o ambiente é mais úmido e mais protegido da radiação. Estas condições do microambiente do velame podem favorecer o crescimento e o desenvolvimento de diversos tipos de microrganismos.

Neste estudo buscamos compreender aspectos da ecologia das interações simbióticas de *C. purpurata*, seus fungos endofíticos, além de outros tipos de microrganismos, que geralmente não são considerados na maioria dos estudos sobre simbioses das raízes de orquídeas. A presente tese teve como norte os seguintes questionamentos:

- a) Fungos micorrízicos isolados de raízes de orquídeas são capazes de germinar sementes, e promoverem o desenvolvimento do protocormo?
- b) A germinação simbiótica é vantajosa quando comparada com a germinação assimbiótica para *C. purpurata*?
- c) Além dos fungos, existem outros grupos de organismos em simbiose com essas raízes?
- d) E se existem, que grupos são esses? e,
- e) O velame de *C. purpurata* pode atuar como abrigo, ou habitat, para grupos diferentes de microrganismos?

Perante o que foi apresentado, a respeito do conhecimento e da caracterização das relações simbióticas planta-fungo e planta-microrganismo, ressalta-se que a caracterização das espécies de fungos micorrízicos que podem propiciar a germinação das sementes de orquídeas e sustentar o desenvolvimento dos protocormos em *C. purpurata* é de grande importância, para que sejam estabelecidas as estratégias para a conservação desta orquídea. A caracterização destas dinâmicas de autoecologia e das espécies envolvidas também pode nortear planos de manejo e reintrodução na natureza dessa espécie de orquídea, atualmente ameaçada de extinção.

Em decorrência do levantamento teórico, o objetivo inicial deste trabalho foi o de estudar as interações entre fungos micorrízicos e a orquídea *C. purpurata*. No entanto, com o avanço do estudo morfológico das raízes, e a posterior descoberta da ampla diversidade de microrganismos associados às raízes, o objetivo foi ampliado, e buscamos descrever a riqueza

de microrganismos que interage com as raízes da orquídea. Além de identificar quais espécies de fungos micorrízicos que poderiam ser isolados de plantas adultas, ou de protocormos na natureza, os quais seriam capazes de germinar as sementes e apoiar o desenvolvimento de protocormos de *C. purpurata*, fase-chave para o estabelecimento das novas gerações da orquídea em ambientes naturais.

2. CAPÍTULO 1

Artigo a ser submetido para a revista Symbiosis.

Germinação simbiótica e desenvolvimento de protocormos de *Cattleya purpurata*

***Cattleya purpurata* orchid symbiotic germination and protocorms development**

RESUMO

Orchidaceae, a maior família de plantas Angiospermas do globo em número de espécies, precisa de um nicho de germinação muito complexo, para que novas gerações de orquídeas se estabeleçam em ambientes naturais. Na natureza, todas as espécies de orquídeas dependem de fungos micorrízicos específicos para que as sementes germinem, e para que os protocormos, estruturas embrionárias exclusivas das orquídeas, possam se desenvolver. O fungo simbiote fornece a nutrição necessária para os primeiros eventos celulares da germinação e do desenvolvimento das fases juvenis das orquídeas. No presente estudo, buscou-se desenvolver um método eficaz para a germinação simbiótica de *Cattleya purpurata*, uma orquídea ameaçada de extinção, comparando a promoção da germinação em meio assimbiótico e simbiótico. Além disso, registrar a ontogênese da simbiose, onde as fases juvenis da orquídea germinam e se desenvolvem com o suporte do fungo micorrízico do gênero *Tulasnella*. A germinação das sementes de *C. purpurata* ocorreu em meio assimbiótico (MS) e no meio simbiótico, inoculados com fungos micorrízicos do gênero *Tulasnella*, mas não houve germinação na presença do fungo *Ceratobasidium*. Os fungos *Tulasnella*, isolados de sementes germinadas na natureza, mostraram as melhores taxas de germinação, e os protocormos desse tratamento alcançaram os maiores estágios de desenvolvimento. Quanto à ontogênese da interação do fungo *Tulasnella* com embriões e protocormos da orquídea *C. purpurata*, o desenvolvimento das células embrionárias avança mostrando o aumento no número de organelas como as mitocôndrias, e os proplastídeos, a hipertrofia dos núcleos, o crescimento e enovelamento das hifas dentro das células, formando os pelotons. Segue a digestão dos pelotons, o surgimento dos amiloplastos e a conversão destes em cloroplastos. As sementes de *C. purpurata* tiveram então sua germinação e desenvolvimento dos protocormos facilitados por fungos do gênero *Tulasnella*, enquanto o fungo micorrízico do gênero *Ceratobasidium* não influenciou na germinação da orquídea. Estes achados, combinados aos registados na literatura, sugerem que

as espécies de *Cattleya* têm especificidade em relação ao gênero de fungo simbiote na germinação. Além disso, o presente trabalho produziu com sucesso protocormos simbióticos, que continuaram se desenvolvendo *in vitro*, e alcançaram o estágio de plântulas, e estas são boas candidatas para estudo de reintrodução na natureza da orquídea ameaçada.

Palavras-chave: Orchidaceae. Germinação simbiótica. Protocormo. Ontogênese. *Cattleya purpurata*. *Tulasnella*.

ABSTRACT

Orchidaceae is the largest family of plants in the world, and needs a very complex germination niche for new orchid generations establishment in natural environments. In nature, all orchids species depend on specific mycorrhizal fungi presence in the seeds to germinate. They also depend on unique embryonic structures named protocorms, to develop. The symbiotic fungus provides necessary nutrition for the initial cellular events of germination, and the juvenile stages of development. The present study sought to develop an effective method for *Cattleya purpurata* symbiotic germination, an endangered orchid species. We also aimed to characterize the symbiosis ontogenesis, in which orchids in juvenile stages germinate and develop supported by the mycorrhizal fungus of the genus *Tulasnella*. *C. purpurata* seeds germination occurred with mycorrhizal fungi of the genus *Tulasnella* at different germination efficiency rates when inoculated in symbiotic MS medium and oat agar medium inoculated with mycorrhizal fungi of the genus *Tulasnella*, with different rates of germination efficiency. However, they did not germinate with another orchidaceous mycorrhizal fungus of the genus *Ceratobasidium*. *Tulasnella* fungi (isolated from naturally germinating seeds) showed the best germination rates, and the protocorms resulting from this treatment reached the highest stages of development. As for the ontogenesis of the *Tulasnella* fungus interaction with embryos and protocorms of *C. purpurata* orchid, the development of embryonic cells shows an increase in organelles numbers, such as mitochondria and proplastids, as well as nuclei hypertrophy, hyphae growth and folding inside the cells, pelotons formation and digestion, and ultimately amyloplasts appearance and conversion into chloroplasts. *C. purpurata* seeds showed facilitated germination and protocorm development in the presence of *Tulasnella* genus fungi, while *Ceratobasidium* genus mycorrhizal fungus did not influence germination at all. In light of the previous literature, our findings indicate *Cattleya* species require specific genus of symbiont fungus for germination. Furthermore, the present work successfully produced symbiotic protocorms, which continued

to develop in vitro, and reached the seedling stage, and these are good candidates for study of reintroduction in the wild of the endangered orchid.

Keywords: Orchidaceae. Symbiotic germination. Protocorm. Ontogenesis. *Cattleya purpurata*. *Tulasnella*.

2.1. INTRODUÇÃO

As orquídeas apresentam algumas características morfológicas e anatômicas intrínsecas, que podem limitar sua distribuição e estabelecimento. Entre elas, o de apresentar o pólen agrupado em polínias, o que as leva a depender obrigatoriamente de animais (zoofilia) para a transferência das polínias das anteras de flor uma para o estigma de outra flor co-específica, para a reprodução sexuada. Além disso, a etapa de estabelecimento de novas gerações em ambientes naturais, depende do sucesso na germinação de sementes, além do desenvolvimento de protocormos e plântulas. As sementes das orquídeas são muito pequenas (microscópicas, de milímetros a micrômetros), desprovidas de endosperma, e com escassas reservas nutritivas no embrião propriamente dito (ARDITTI, 1967). Na natureza, para que ocorra a germinação e a formação do protocormo, estrutura embrionária exclusiva de orquídeas, que se desenvolve fora da semente, o aporte de nutrientes necessariamente vem de uma fonte externa, os quais, no caso de todas as orquídeas, é fornecido por fungos micorrízicos (ARDITTI; GHANI, 2000).

Existem muitos estudos sobre fungos endofíticos, micorrízicos e não micorrízicos, em orquídeas terrícolas, principalmente no hemisfério norte (ALEXANDER; HADLEY, 1983; WARCUP, 1981; ZELMER *et al.*, 1996). No entanto, mais reduzido é o conhecimento destes simbiontes em orquídeas epífitas em zonas tropicais (HERRERA *et al.*, 2010; SATHIYADASH *et al.*, 2012). Da mesma forma, estudos sobre germinação simbiótica, ou seja, na presença do fungo micorrízico, voltaram-se historicamente para as espécies de orquídeas terrícolas, distribuídas no hemisfério norte e na Austrália. Esses estudos demonstraram que, além destas orquídeas possuírem alto grau de especificidade pelos parceiros fúngicos, os micobiontes (WARCUP, 1981), elas necessitam de espécies específicas de fungos em etapas diferentes da germinação, e do desenvolvimento do protocormo. Portanto, para algumas orquídeas, a espécie de fungo que promove a germinação não é capaz de sustentar o desenvolvimento do protocormo, e é necessária a associação com outras espécies de micobiontes (STEWART; KANE, 2007). Consequentemente, é evidente a importância de se

conhecer os micobiontes das orquídeas, para embasar estratégias de conservação e de reintrodução de espécies ameaçadas de extinção na natureza.

Fungos micorrízicos de orquídeas pertencem a um grupo artificial, quer dizer, não-monofilético de fungos do filo Basidiomycota, que além de compartilharem a habilidade em colonizar e formar micorrizas, ainda apresentam características micromorfológicas em comum. Entre estas, ressalta-se a ramificação das hifas em ângulo de 90°, constrição da hifa próximo ao ponto de ramificação e formação de células moniloides (ALMEIDA *et al.*, 2007; GONZALEZ *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2005).

O estabelecimento de uma nova geração de orquídeas na natureza exige complexas especificidades de nichos de germinação, considerando tanto as relações bióticas quanto abióticas. Em relação ao primeiro grupo, a compatibilidade do micobionte (simbionte fúngico) com o seu hospedeiro na relação interespecífica é determinante para o sucesso da germinação e desenvolvimento. Sobre a diversidade de fungos micorrízicos compatíveis, aqui se deve incluir também os fungos endofíticos do velame, que podem determinar o sucesso da espécie em mecanismos ecológicos como a competição interespecífica, a maior taxa sobrevivência, o estabelecimento de novas gerações no seu habitat e a ampliação da distribuição das orquídeas (BATTY *et al.*, 2002; RASMUSSEN, 1995).

Além dos fatores bióticos para o sucesso da germinação, desenvolvimento e colonização, devem ser analisados os fatores abióticos do meio que suportam o ciclo vital das espécies, a citar: substrato que o micobionte necessita para suas necessidades nutricionais, variação de fatores como luz, temperatura e umidade, sendo a combinação destes fatores, bióticos e abióticos, que determinam o sucesso da germinação e do estabelecimento de populações naturais (RASMUSSEN *et al.*, 2015). Devido a essas especificidades, e dependência de outras espécies para germinação e desenvolvimento de fases juvenis, as orquídeas são um dos grupos de plantas mais ameaçados de extinção diante de um cenário de mudanças no espaço de nicho e pressões antrópicas, tais como as relacionadas ao aquecimento global (ZETLER *et al.*, 2007; ZETTLER; DVORAK, 2021).

Em um estudo com 73 espécies de orquídeas e 95 unidades taxonômicas (OTUs) de fungos, por exemplo, foi demonstrado que as redes de associações das orquídeas epífitas são mais conservadoras, e tendem à coevolução com fungos parceiros, mais do que as espécies de orquídeas terrícolas. Essa característica pode ser devido ao habitat epifítico, com estresses ambientais mais intensos que o habitat terrícola (MARTOS *et al.*, 2012).

A orquídea *Cattleya purpurata* (Lindl. & Paxton) Van den Berg (sinonímia de *Laelia purpurata* Lindley (1853)) é uma espécie de hábito epifítico, que floresce uma vez ao

ano, e não oferece nenhum tipo de recompensa aos polinizadores (CABALLERO *et al.*, 2016). Essa espécie, além de sofrer com os desafios ecológicos e de estabelecimento de ciclo vital descritos acima e comuns a todas as orquídeas, sofre também com o declínio populacional devido à coleta ilegal e à perda de habitat (NASCIMENTO, 2019). Como é endêmica da Floresta Atlântica das regiões sul e sudeste do Brasil, é considerada vulnerável à extinção pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN). Devido a isso, são importantes as ações para uma melhor compreensão do seu ciclo de vida. Estes dados trarão subsídios para sua conservação e para futuros programas de reintrodução da espécie na natureza, fundamentais para que a espécie não desapareça em ambientes naturais.

Com base no que foi apresentado, o objetivo deste estudo foi avaliar condições diferentes de germinação *in vitro*, além de buscar desenvolver um método eficiente de germinação simbiótica para a produção de plântulas *C. purpurata*. Outra pretensão foi registrar e compreender as alterações estruturais e anatômicas que ocorrem durante o desenvolvimento do protocormo em contato com os fungos micorrízicos.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Isolados de Fungos micorrízicos para a germinação de sementes

Para testar o potencial de favorecimento da germinação e do desenvolvimento de protocormos de *C. purpurata*, os seguintes isolados fúngicos foram utilizados:

a) Isolado ROB 218: foi isolado de raízes de indivíduos adultos de *C. purpurata*, e obtido durante o estudo sobre riqueza de microrganismos endofíticos. Identificado por causa de suas características morfoanatômicas, tais como o aspecto da colônia (Figura 1A), a formação de células monilióides (Figura 1B), e ramificações das hifas em ângulo de 90° (Figura 1B), septo dolipórico característico (Figura 1C), dentre outras características. Constatou-se que se tratava de uma espécie de fungo micorrízico de orquídea, pertencente ao gênero *Tulasnella*;

b) Isolados Isca 2 e Isca 3: estes isolados são fungos obtidos a partir de “iscas” na natureza, onde sementes de *C. purpurata* foram colocadas sobre cubos de esponjas úmidas, e acondicionadas em pacotes de *voil*. Essas armadilhas foram colocadas próximas às raízes de plantas adultas de *C. purpurata*, em ambiente natural, por um período de 180 dias. Após, as armadilhas foram levadas para o Laboratório de Microbiologia do Solo, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (CCA, UFSC), onde as sementes germinadas (ou protocormos) foram desinfetadas com álcool etílico 70% (v/v), por dois

minutos, e hipoclorito de sódio (NaClO) 2% (v/v), por cinco minutos. Após a desinfecção, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada esterilizada (ADE), e então colocadas sobre placas de Petri com os seguintes meios de cultura: Batata Dextrose Ágar (BDA), Meio Norman-Merlin modificado (MNM) e Malte (Extrato de Malte, de Levedura e Ágar) (metodologia adaptada a partir de Cruz-Higareda *et al.*, 2015). As placas foram mantidas em incubadoras do tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio (BODs) no escuro, a temperatura constante de 23°C, para que o micélio crescesse. Após isso, os fungos que emergiram das placas foram repicados e colocados em novas placas, sendo cultivados então em meio BDA.

c) Isolado PA03: fungo micorrízico, pertencente ao gênero *Ceratobasidium*, isolado de raízes da orquídea *Campilocentrum* sp., a partir de estudos do grupo de pesquisa da Prof. Juliana Lischka Sampaio Mayer, e gentilmente cedido para o presente trabalho.

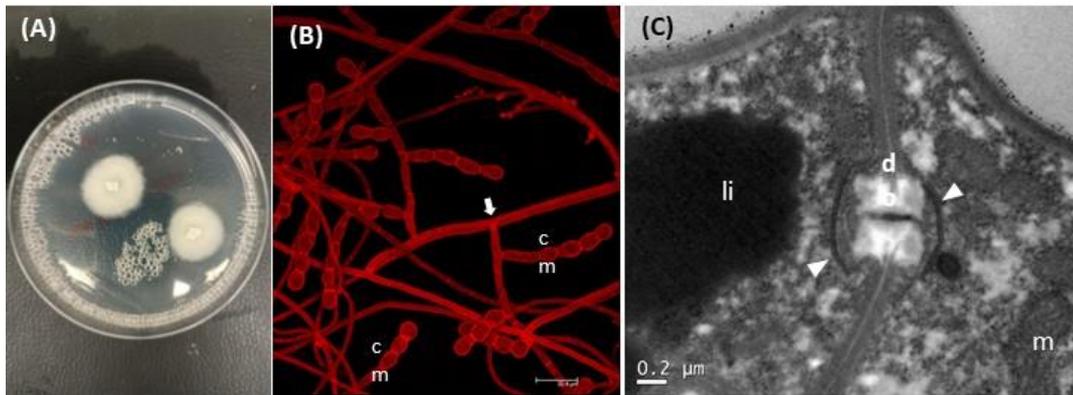


Figura 1: Imagens dos isolados de fungos usados nos testes de germinação mostrando as características do gênero *Tulasnella*. Os isolados ROB 218, Isca 2 e Isca 3 mostraram as mesmas características. A) Foto da colônia de Isca 2, em meio BDA após 2 semanas de cultivo no escuro. B) Hifas e células monilióides (m) de isolado de Isca 2, a seta indica a ramificação em ângulo de 90°, e constrição no ponto de ramificação. C) Septo dolipórico característico de *Tulasnella*, com doliporo (d) com parentossomos curvos e imperforados (cabeça de seta), (m) mitocôndria, (li) lipídeo.

Para testar o potencial de favorecimento da germinação e do desenvolvimento de protocormos de *C. purpurata*, para fins analíticos e comparativos, foram utilizados os mesmos isolados fúngicos (Isolado ROB 218, Isolados Isca 2 e Isca 3 e Isolado PA03). Os procedimentos de isolamento seguiram os mesmos protocolos anteriormente descritos.

2.2.2. Taxa de germinação simbiótica e desenvolvimento de protocormos

Foram realizadas polinizações manuais cruzadas em flores de *C. purpurata*, para a obtenção de cápsulas com sementes para os experimentos de germinação. Cerca de seis meses após as polinizações, as cápsulas foram manualmente colhidas e acondicionadas em envelopes

de papel filtro (PEREIRA *et al.*, 2011), e então levadas para o Laboratório de Microbiologia do Solo, da UFSC, onde as sementes foram removidas das cápsulas, em câmara de fluxo laminar, para evitar contaminar as sementes.

Após a abertura da cápsula, parte das sementes foi utilizada para testar a viabilidade do embrião, com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), e parte para os experimentos de germinação. Porções de 200 mg das sementes foram desinfetadas por imersão em solução de água destilada esterilizada (ADE), com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 2% (v/v), por cinco minutos. Em seguida, foram lavadas três vezes com ADE. As sementes desinfetadas foram mantidas imersas em 50 mL de ADE, sendo que 400 µL da suspensão foi aplicada sobre placas de Petri (PEREIRA *et al.*, 2011), contendo meios de cultura, ou meio de cultura mais uma porção do micélio fúngico testado. Foram propostos, ao todo, seis tratamentos, e para avaliar a eficiência destes na promoção da germinação e desenvolvimento inicial do protocormo, o experimento foi organizado da seguinte maneira:

a) Controle positivo (CP): sementes inoculadas em meio de cultivo Murashige & Skoog (MS), já caracterizado por promover bom índice de germinação assimbiótica de sementes de espécies de *Cattleya* (BAZZICALUPO *et al.*, 2021);

b) Controle negativo (CN): sementes inoculadas em meio de cultivo ágar-aveia (OMA);

c) Meio OMA e isolado fúngico ROB 218 (*Tulasnella* sp.): sementes inoculadas em meio OMA e mais um disco com 2 mm de diâmetro do micélio do isolado;

d) Meio OMA e isolado fúngico Isca 2 (*Tulasnella* sp.): sementes colocadas sobre o meio OMA mais um disco com 2 mm de diâmetro do micélio do isolado;

e) Meio OMA e isolado fúngico Isca 3 (*Tulasnella* sp.): sementes colocadas sobre o meio OMA mais um disco com 2 mm de diâmetro do micélio do isolado;

f) Meio OMA e isolado fúngico PA 03 (*Ceratobasidium* sp.): sementes colocadas sobre o meio OMA mais um disco com 2mm de diâmetro do micélio do isolado;

Para avaliar a eficácia dos tratamentos, foram estipulados sete níveis, ou estágios de desenvolvimento (baseado em Chen *et al.*, 2014), conforme o que se segue:

-Estágio 0: Semente não germinada;

-Estágio 1: Embrião intumescido (com volume aumentado) dentro da testa;

-Estágio 2: rompimento da testa (aqui se considera que a semente germinou);

-Estágio 3: Instalação do meristema apical caulinar (primórdio foliar);

-Estágio 4: Formação da primeira folha;

-Estágio 5: Primeira folha bem desenvolvida;

-Estágio 6: Formação da segunda folha;

Para cada tratamento, foram feitas cinco placas de Petri (réplicas verdadeiras), as quais foram incubadas em estufa BODs, com temperatura controlada e constante de 23 °C e fotoperíodo de 12 horas. Ao final de 50 dias de cultura, ou co-cultura entre meio nutritivo e isolado fúngico, as placas foram retiradas das BODs, todas as sementes não germinadas e/ou protocormos em desenvolvimento foram contados em microscópio estereoscópico de luz (ML), e seus estágios de desenvolvimento foram registrados, para posteriores testes estatísticos.

Os embriões e protocormos foram fotografados, utilizando microscópio estereoscópico modelo Zeiss SZH 10[®], com sistema de captura de imagens. Este procedimento foi adotado, com o intuito de registrar as diferenças morfológicas dos embriões ou protocormos, e comparar o desenvolvimento anatômico entre os tratamentos propostos.

Para a análise da influência dos fungos, ou do meio MS (assimbiótico) na germinação, foi realizada análise multivariada da variância (MANOVA), a fim de verificar a existência, ou não, de diferenças estatísticas significativas para cada estágio de desenvolvimento e entre os tratamentos propostos. Para isto, os dados foram transformados pelo método da raiz quadrada, para que se adequassem à distribuição normal. As hipóteses testadas foram:

-H₀: todos os estágios têm vetor de médias iguais para os tratamentos ($\mu_0 = \mu_1 \dots = \mu_6$) em que μ_0 representa o vetor de médias para o estágio 0, μ_1 representa o vetor de medias para o estágio 1, e assim por diante;

-H₁: pelo menos um dos vetores de média é diferente dos demais. Adicionalmente foi calculada a “*partial et squared*”, uma métrica frequentemente usada com MANOVA, que mede o efeito que a variável independente (neste caso, os tratamentos) têm sobre as variáveis dependentes (estágios de desenvolvimento).

A partir dos resultados de significância obtidos para a análise de MANOVA, realizou-se duas técnicas de análise estatística multivariada: análise discriminante linear (LDA) e a análise de correspondência (AC). A LDA calcula uma combinação linear de recursos que melhor separa dois ou mais grupos, representando essas informações graficamente para inferir quais grupos estão mais próximos entre si. Já a AC obtém índices que permitem mostrar a relação entre os tratamentos e os estágios, a sua representação gráfica indica os tratamentos que possuem perfis semelhantes entre si e o quanto também se aproximam dos estágios de desenvolvimento.

2.2.3. Estudo morfológico e ultraestrutural da ontogênese da interação embrião – fungo micorrízico

Para o estudo morfológico e ultraestrutural da ontogênese da interação simbiótica fungo-embrião-protocormo, sementes de *C. purpurata* foram desinfestadas, e um disco do micélio do isolado Isca 2 foi colocado sobre o meio. Os embriões ou protocormos foram amostrados até o estágio 3 de desenvolvimento, quando surge o primórdio foliar. As sementes foram amostradas em intervalos de 1 ou 2 dias, até o tempo de cocultivo de 20 dias, onde o protocormo já mostra a instalação do meristema caulinar (formação do primórdio foliar). Estes embriões ou protocormos, e as sementes não germinadas, foram processados para serem analisados em Microscopia Confocal (MC), de Luz Transmitida de Campo Claro (MLTCC) e Eletrônica de Transmissão (MET), a fim de se verificar como os simbiontes interagem, e como as células e os tecidos vão se modificando ao longo do desenvolvimento inicial da orquídea.

2.2.4. Microscopia de Luz Transmitida Campo Claro (MLTCC), Confocal (MC) e Eletrônica de Transmissão (MET)

Para análise em MC, as sementes, os protocormos e os fungos associados foram fixados em paraformaldeído 4% (v/v), em tampão fosfato de sódio (Na_3PO_4) concentração 0,1 M, e os indivíduos foram corados com fucsina ácida para registro das hifas e outras partes dos fungos. A parede celular vegetal emite uma autofluorescência na faixa do azul, e isso permitiu uma boa visualização das hifas dos fungos, que com a fucsina fluoresceu na faixa do vermelho, dentro ou fora das células vegetais. Protocormos e fungos corados foram montadas sobre lâmina e lamínula, e então foram analisadas no microscópio confocal com sistema de escaneamento a laser, modelo SP 5, da Leica Microsystems[®], no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME, UFSC).

A autofluorescência da parede celular das células da orquídea foi registrada com excitação na faixa do UV (405 nm) e emissão da faixa do azul (460 a 490 nm). Estruturas fúngicas foram visualizadas pela fluorescência da fucsina ácida, excitação na faixa do verde (514 nm) e emissão da faixa no vermelho (600 a 640 nm). As imagens finais são fruto da máxima projeção, onde foram capturadas imagens num intervalo de até 40 µm, e passos de 3 ou 4 µm. Ao final, todas as imagens foram sobrepostas (máxima projeção), para obtenção de uma imagem com toda a informação dos organismos e estruturas que fluoresceram ao longo dos três eixos de escaneamento (X, Y e Z). Todo o processamento da imagem foi realizado no

software LAS AF, da Leica Microsystems®.

Para análise das células e organelas nos microscópios de luz (MLTCC) e eletrônico de transmissão (MET), as sementes e protocormos foram fixados com solução de glutaraldeído 3% (v/v) em tampão cacodilato de sódio (CaCO) 0,1M, em pH 7,2, por 24 horas. Posteriormente, seguiu-se a etapa de pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO₄) concentração 1% (v/v) em tampão CaCO por 2 horas, e então as amostras foram desidratadas em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%).

Após estas etapas de processamento, as amostras foram infiltradas lentamente em resina SPURR (Sigma-Aldrich®). Então, os blocos de resina contendo as amostras de raízes foram polimerizados em estufa, a temperatura constante de 70 °C. Os cortes semifinos foram colocados sobre lâminas e corados com azul de toluidina (AT-O). Os cortes foram fotografados com a técnica de campo de campo claro (MLTCC), no microscópio Olympus BX 41®, no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia, da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMEB, UFSC).

Os mesmos blocos de resina foram utilizados para fazer os cortes ultrafinos para a microscopia de transmissão (MET). Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. O registro do material foi feito no microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 TEM, da Jeol Ltda®, também no LCME-UFSC.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Taxa de germinação e de desenvolvimento de protocormos de *Cattleya purpurata* em condições simbióticas e assimbiótica

Após 50 dias de cultura no meio MS (Controle Positivo), as sementes de *C. purpurata*, germinaram e a maioria dos indivíduos se encontravam no estágio 3 de desenvolvimento (Figura 2A), com a instalação do meristema apical caulinar (Figura 2B). Já no tratamento apenas com meio OMA (Controle Negativo), as sementes foram consideradas não germinadas, porque não ocorreu o rompimento da testa (Figura 2C), embora tenham tido incremento no volume, em relação à semente seca, e se tornado esverdeadas (Figura 2D). O mesmo padrão de embriões não germinados foi observado no tratamento com o isolado PA03 (Figura 2E), com a diferença de que neste tratamento existe uma massa de micélio crescendo sobre as sementes (Figura 2F).

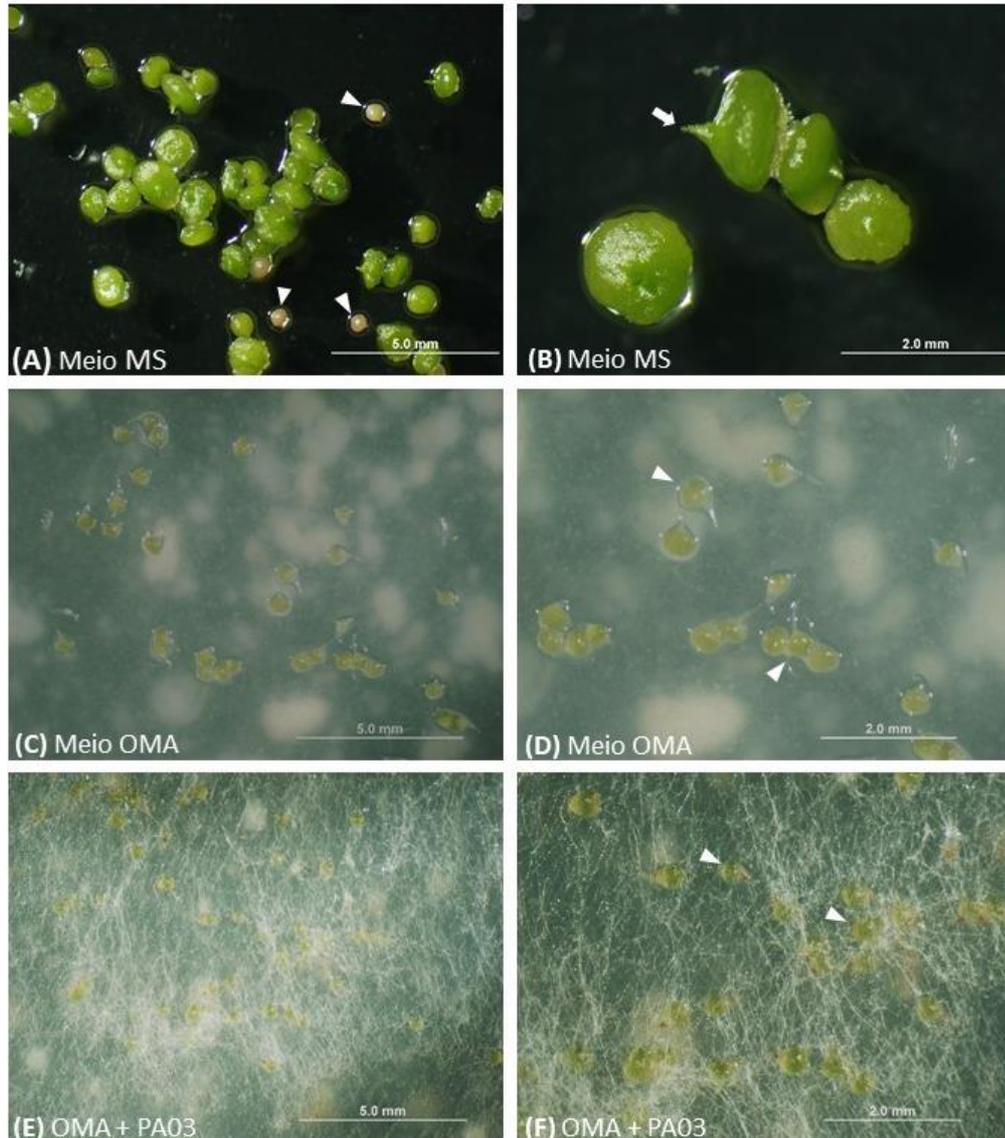


Figura 2: Protocormos de *C. purpurata* após 50 dias de germinação e desenvolvimento, em condições diferentes de desenvolvimento dos protocormos. A) Visão de diversos protocormos no estágio de desenvolvimento 3, quando é possível notar que algumas sementes não germinaram, encontrando-se no estágio 1 (embriões marrons). B) Protocormos com o primórdio foliar (seta). C) Visão geral e em detalhe D) de sementes não germinadas, apenas no meio OMA (controle negativo). E) Visão geral e em detalhe F) de sementes não germinadas, com micélio (branco) abundante, do tratamento com o isolado PA03 crescendo sobre elas.

Os tratamentos com os fungos obtidos a partir de isolados da raiz de *C. purpurata*, ou das iscas, tiveram um desempenho na promoção do desenvolvimento ainda maior que o meio MS (Figura 3A-B). O tratamento com o isolado de raiz ROB218 apresentou muitos indivíduos no estágio 4 de desenvolvimento (Figura 3C), mostrando o surgimento da primeira folha, e a presença de pelos absorventes (Figura 3D). Os tratamentos com os fungos isolados de Isca 2 e Isca 3 mostraram o maior avanço no desenvolvimento entre os tratamentos (Figura 3E e G), onde muitos indivíduos avançaram até o estágio de desenvolvimento 5 ou 6, com as primeiras folhas desenvolvidas, e a presença de pelos absorventes (Figura 3F e H).

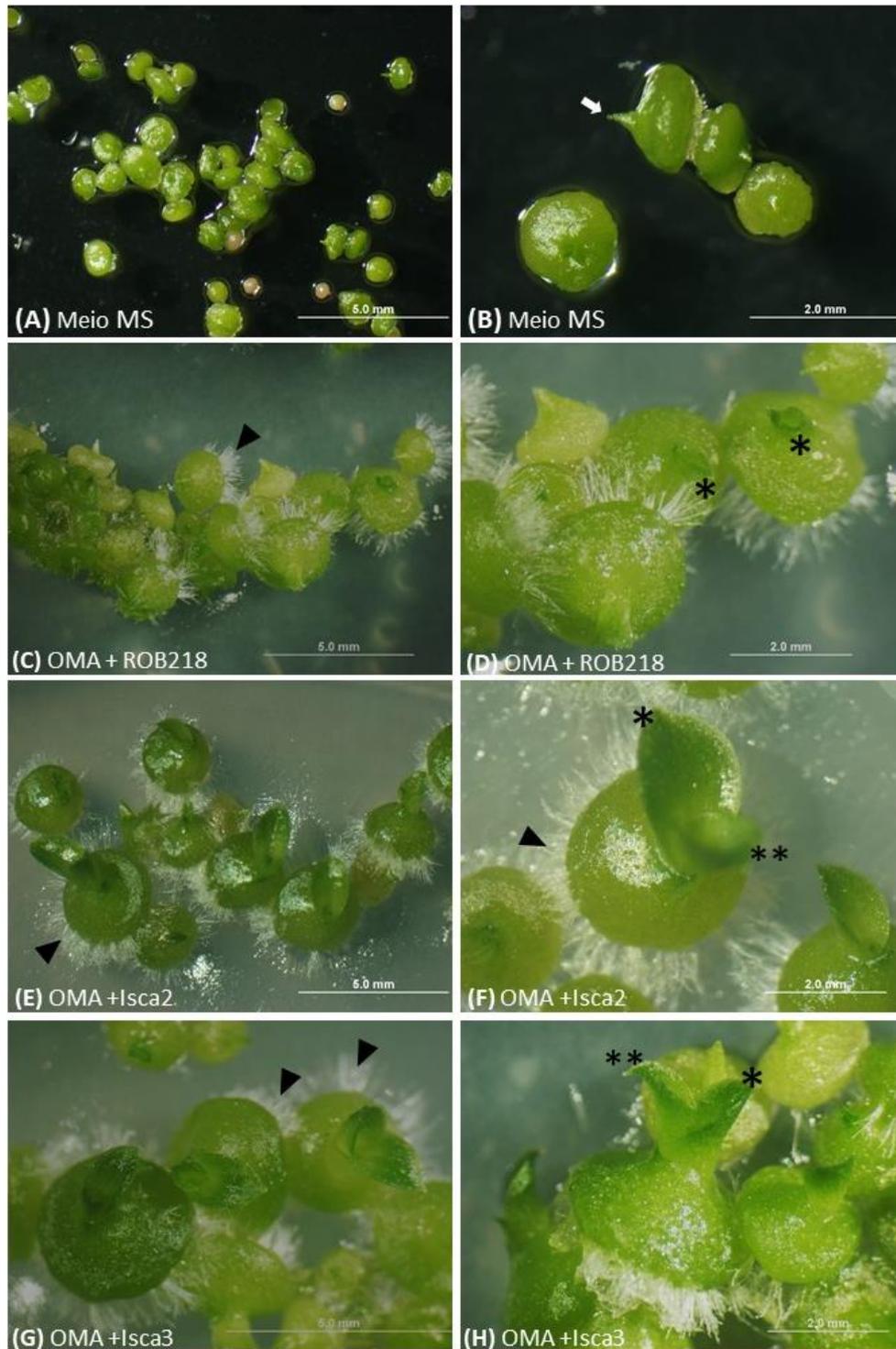


Figura 3: Protocormos de *C. purpurata* após 50 dias de germinação com tratamentos diferentes. A) Meio MS com diversos protocormos no estágio de desenvolvimento 3, quando é possível notar que algumas sementes não germinaram (embriões beges). B) Protocormos em meio MS, mostrando o primórdio foliar (seta). C) Protocormos do tratamento OMA+ROB 218, com presença de pelos absorventes (cabeça de seta). D) protocormos em desenvolvimento no tratamento OMA+ROB 2018, com a primeira folha (*) em desenvolvimento (estágio 4); E) Protocormos cultivados em meio OMA, na presença do isolado Isca 2, apresentando vários protocormos com 1 folha e pelos absorventes (cabeça de seta). F) Detalhe de um protocormo com a primeira (*) e a segunda folha (**) desenvolvidas. G) Protocormos do tratamento OMA e Isca 3, no estágio 6 de desenvolvimento, com 2 folhas e pelos absorventes (cabeça de seta). H) Protocormo no estágio 6 de desenvolvimento, com primeira (*) e segunda folha (**) se desenvolvendo.

O teste MANOVA evidenciou que os tratamentos com os fungos do gênero *Tulasnella*, isolados da orquídea adulta *C. purpurata*, favoreceram a germinação e o desenvolvimento inicial dos protocormos da espécie. O teste MANOVA encontrou diferenças significativas entre os tratamentos, na germinação e no desenvolvimento dos protocormos. Além disso, o valor obtido de 0,63 da “*partial et squared*” reforçou os resultados do teste da MANOVA, de que os tratamentos são diferentes estatisticamente.

Foi realizada então a análise LDA, na qual foi observado o contraste entre os tratamentos, e que os isolados das Iscas 2 e 3 se sobrepõem. O isolado da raiz ROB218 mostra eficiência na germinação que se situa entre os isolados de iscas e o meio MS. Assim, o isolado ROB 218 mostrou uma eficiência maior que o controle positivo, meio MS, porém menor que a eficiência dos isolados Isca 2 e Isca 3. Além disso, os tratamentos OMA e PA03 se mostraram muito próximos, com nenhum incremento na germinação (Figura 4).

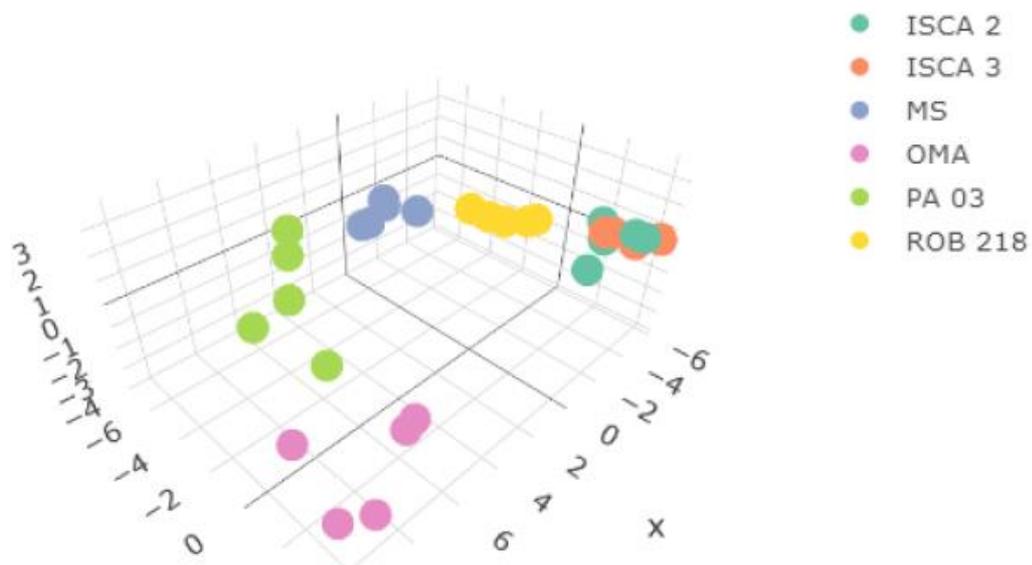


Figura 4: Gráfico de pontos das coordenadas 1, 2 e 3, mostrando a sobreposição dos grupos Isca 2 e Isca 3, e que os tratamentos com os meios de cultivo MS e ROB218 ocupam uma posição entre os grupos PA03 e meio OMA, e entre os tratamentos com Iscas.

A análise de correspondência (AC) também evidenciou que os tratamentos OMA e PA 03 estão próximos, com estágios 0 ou 1 de desenvolvimento. Já meio MS, com o estágio 2 de desenvolvimento, está próximo ao tratamento ROB218, o qual apresenta-se no estágio 3. E por fim, os tratamentos com as Iscas 2 e 3 mostraram-se próximos entre si, quase que em sobreposição aos estágios de desenvolvimento 4, 5 e 6 (Figura 5).

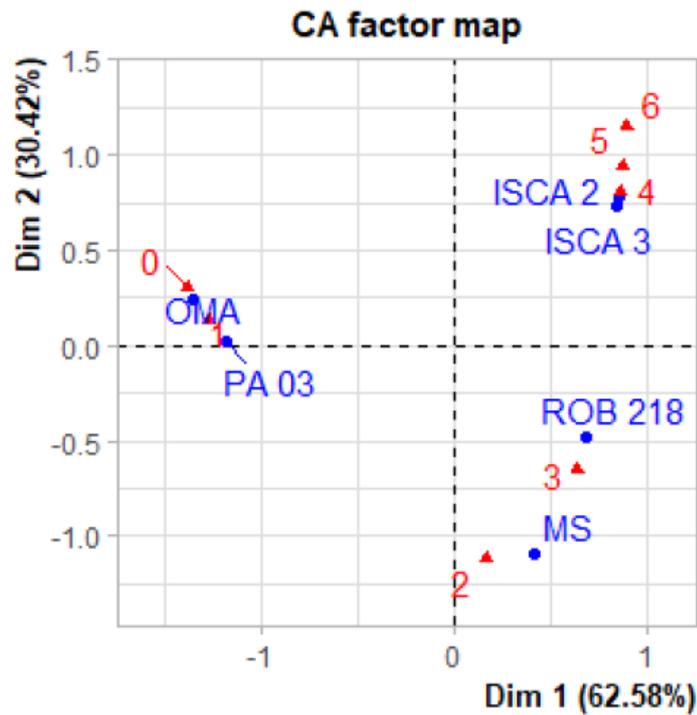


Figura 5: Gráfico da análise de correspondência (AC), mostrando a proximidade dos tratamentos em relação aos estágios de desenvolvimento das orquídeas.

Essa mesma análise dos perfis é possível de ser verificada nos gráficos de barras das médias para os estágios de cada tratamento, tanto para o agrupamento por tratamento (Figura 6), quanto por agrupamento por estágio de desenvolvimento (Figura 7).

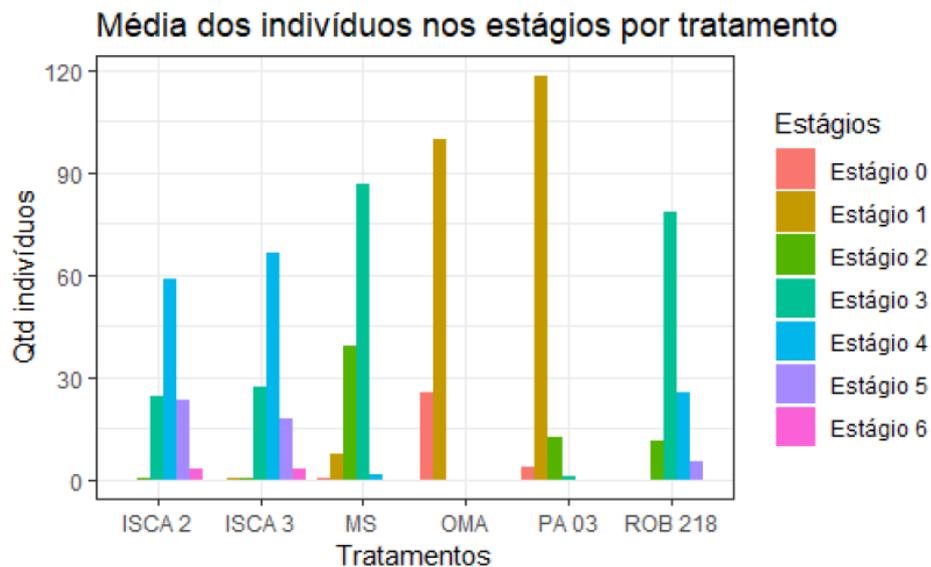


Figura 6: Gráfico de barra da média de desenvolvimento das orquídeas nos tratamentos, em cada um dos meios de cultura, combinados ou não com os isolados fúngicos.

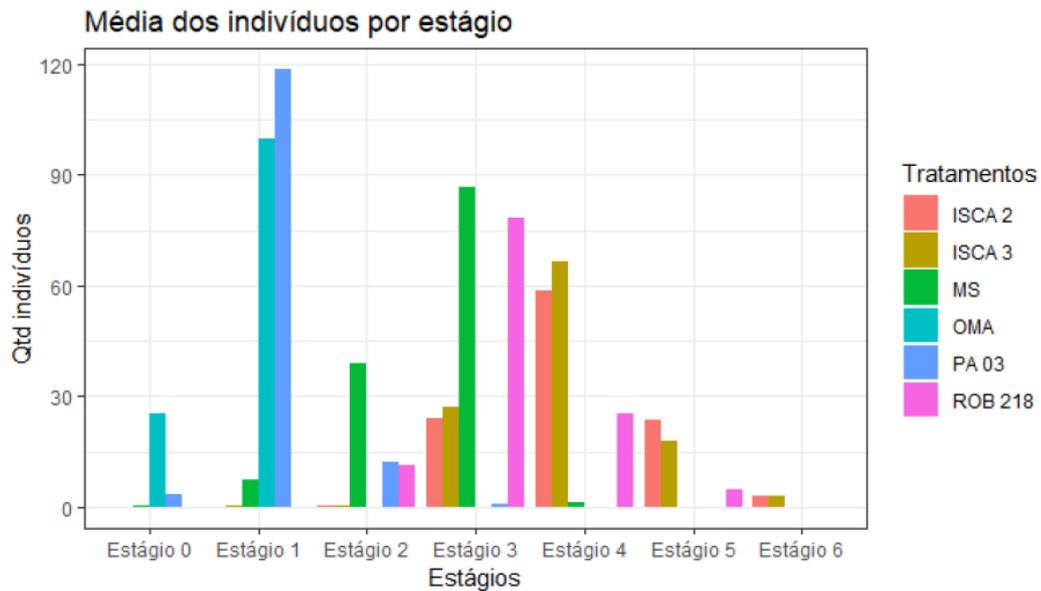


Figura 7: Gráfico de barra da média de total de indivíduos por estágio de desenvolvimento da orquídea, com comparação aos seis tratamentos analisados.

Portanto, foi possível observar, através das comparações entre os resultados dos tratamentos, uma relação de proximidade entre o tratamento OMA e PA 03, onde nenhum dos dois foram capazes de estimular a germinação das sementes (estágios 0 e 1). Agora, o tratamento de controle positivo MS ficou próximo ao tratamento ROB218, um isolado de fungo micorrízico da raiz da *C. purpurata* adulta, e predominaram indivíduos no estágio 2 e 3 de desenvolvimento, com sementes cujos embriões germinaram e romperam a testa. Além disso, o tratamento ROB218 apresentou taxa de germinação numericamente maior que o meio MS, porém menor em comparação aos fungos isolados das Iscas, que obtiveram uma performance muito semelhante entre si, com alta habilidade em incrementar o desenvolvimento de embriões e de protocormos de *C. purpurata*. Ressalta-se que, nestes tratamentos com as Iscas, predominaram os maiores estágios de desenvolvimento de protocormos observados, situando a maior proporção dos indivíduos entre os estágios 4 e 5.

2.3.2. Ontogênese do estabelecimento da simbiose do fungo e os protocormos de *C. purpurata*

As sementes de *C. purpurata* se apresentaram na análise de microscopia com o formato oval, e envolvidas por uma testa delgada, composta por paredes celulares espessadas (Figura 8A). O embrião mostrou uma polaridade no eixo longitudinal (Figura 8A), onde em um dos extremos fica a região do suspensor, com poucas células e estas com vacúolo celular

volumoso (Figura 8B). Próximo à região do suspensor, localiza-se o embrião propriamente dito, e este possui células com o citoplasma repleto de lipídeos (Figura 8C); a essa porção, será chamada de região lipídica do embrião ao longo do manuscrito. No polo oposto ao suspensor, a região apical, é composta por células com citoplasma mais elétron denso, com numerosos vacúolos pequenos, os quais parecem reservar proteínas, denominados de corpos proteicos (Figura 8D), e conforme as observações, esta região ocupa quase dois terços do volume do embrião, aparecendo imediatamente após a região lipídica.

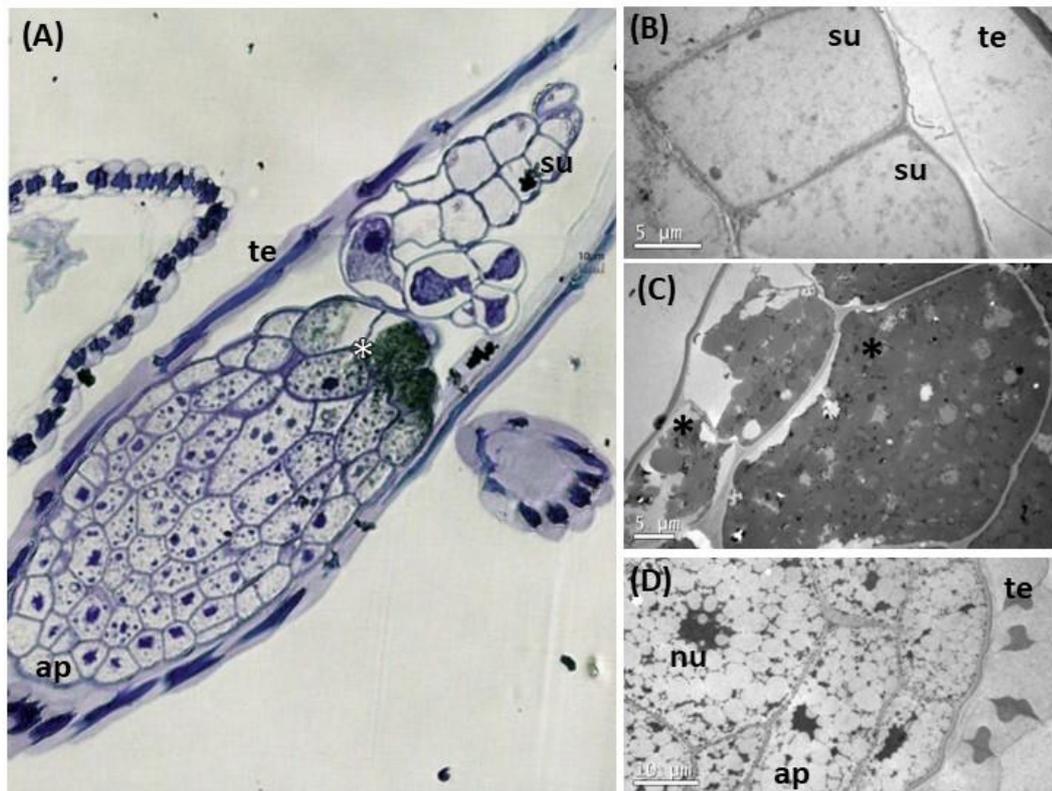


Figura 8: Fotomicrografias de sementes de *C. purpurata*, em microscopia de luz de campo claro (A), e Microscopia Eletrônica de Transmissão (B-D). A) Visão geral das sementes, composta pelo embrião propriamente dito, com resquílios de células do suspensor (su) na região basal, e envolto pela testa (te). Observar as células com lipídeo (*) na base do embrião. B) Detalhe das células do suspensor (su), com a testa adjacente (te). C) Células da região lipídica (*) mostrando o conteúdo eletron denso. D) Células da região apical (ap), com citoplasma cheio de pequenos vacúolos, os chamados corpos proteicos.

Após cerca de 5 dias do início do experimento de germinação, as hifas que circundam a semente penetram nas células do embrião pela região do suspensor (Figura 9A). Verificou-se que as hifas que penetram nestas células não formam os pélotons (Figura 9B), que são estruturas características de micorriza orquidóide, e nas quais ocorre o enovelamento de hifas, ocupando a maior parte do citoplasma da célula hospedeira. Da mesma forma que nas células do suspensor, as hifas atravessam a região lipídica, sem formar pélotons (Figura 9C).

Enquanto as hifas percorrem as células com reserva lipídica, a região apical permanece com células pequenas, com material vesiculado no citoplasma, sem a presença de hifas (Figura 9D).

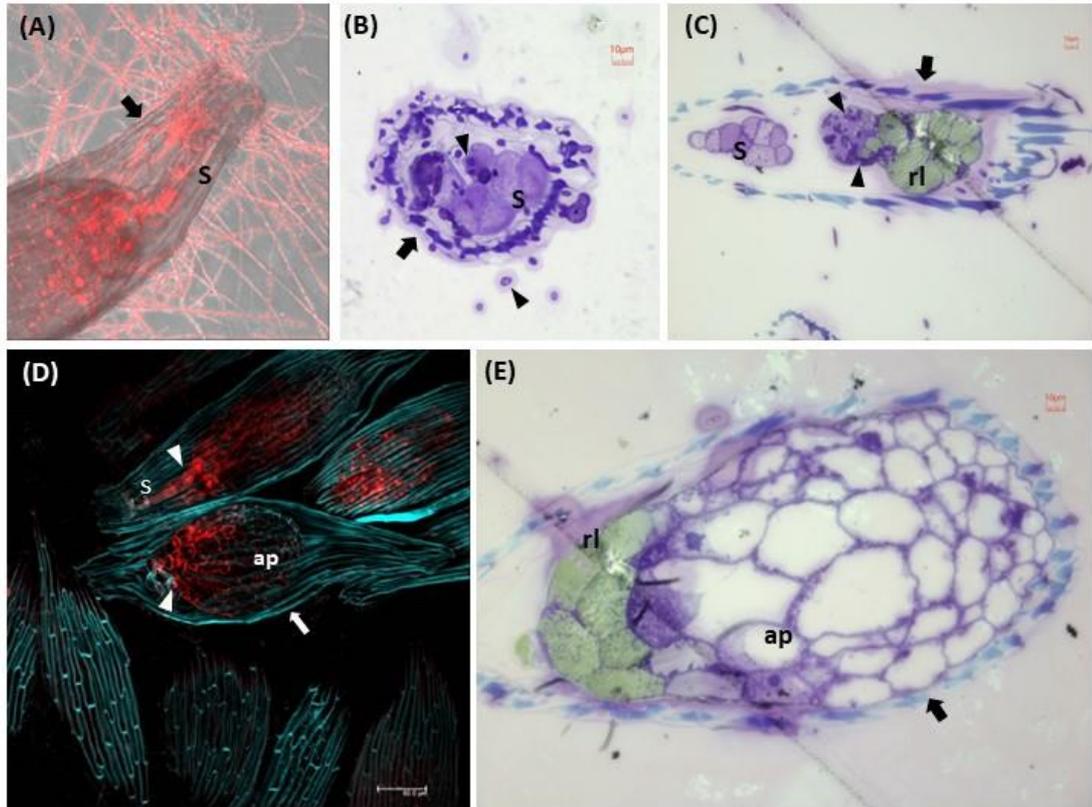


Figura 9: Imagens de Microscopia Confocal (MC; A e D), e de luz, com campo claro (MLTCC; A-C e E). A) Campo claro e fluorescência conjugada no microscópio confocal, mostra o embrião dentro da testa (seta), com as células do suspensor (su) com hifas marcadas em vermelho. B) Células do suspensor (su) colonizado por hifas (cabeça de seta), e hifas fora da testa (seta). C) Células do suspensor e da região lipídica (rl) colonizadas com hifas (cabeça de seta) e envolvido pela testa (seta). D) Embrião com hifas fluorescendo em vermelho (cabeças de seta), colonizando a região do suspensor (su), e na região apical (ap) livre de hifas, a testa (seta) fluoresce em azul. E) Embrião mostrando a região apical com células não colonizadas por fungo, a seta indica a testa.

Entre os nove e treze dias de co-cultivo, ocorre o crescimento das hifas pelo suspensor e pela região basal pelas células contendo substâncias lipídicas do embrião. Nessa fase, as hifas continuam a crescer, e chegam então à região apical (Figura 10A). Quando as hifas chegam nas células desta região, crescem intensamente e se enovelam no citoplasma, formando os pélotons (Figura 10B), levando a um aumento no volume da célula hospedeira (Figura 10C). Além destas modificações celulares observadas, obteve-se que nessa fase também ocorre o início do rompimento da testa, e a formação dos primeiros pelos absorventes (Figura 10D).

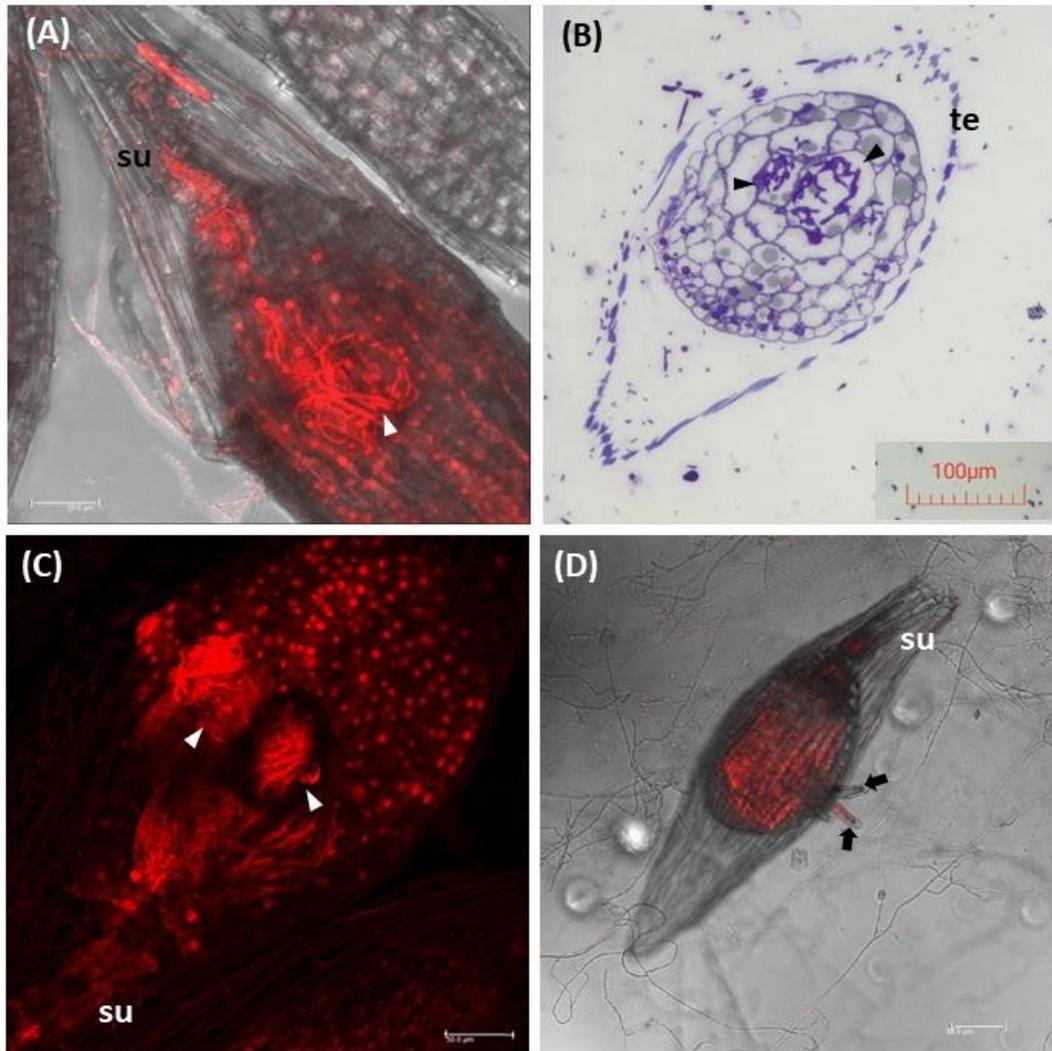


Figura 10: Imagens de microscopia de campo claro (MLTCC; A-B e D) e fluorescência, no confocal (MC; C), de embriões de *C. purpurata* germinando. A) Hifas, em vermelho, passando pelo suspensor (su) e chegando à região apical do embrião, formando os pélotons (cabeça da seta). B) Embrião cujas células micorrizadas (cabeça de seta) mostram um aumento de volume. C) Hifas enoveladas (cabeças de seta), formando o péloton e fazendo com que o volume da célula aumente. D) Protocormo formando os primeiros pelos absorventes (setas).

Após 16 dias de co-cultivo, as hifas ainda estão presentes na região do suspensor e na região lipídica (Figura 11A). Essas hifas permanecem intactas e não digeridas. Durante o processo de micorrização, ocorre o aumento no volume das células embrionárias, e o embrião passa a ter mais células com a presença das hifas, como observado a partir de 13 dias de co-cultivo. Essas células micorrizadas passam a apresentar o núcleo hipertrófico, de dimensões e volume maiores, quando comparado com o núcleo das células não-micorrizadas (Figura 11B).

As hifas se concentram nas células da porção central (da região apical) dos protocormos. Nessa região, as hifas ocorrem em diferentes estágios de interação, desde intactas, com as paredes íntegras e membrana perifúngica presente, como também em diferentes estágios de degradação e digestão celular (Figura 11B-C).

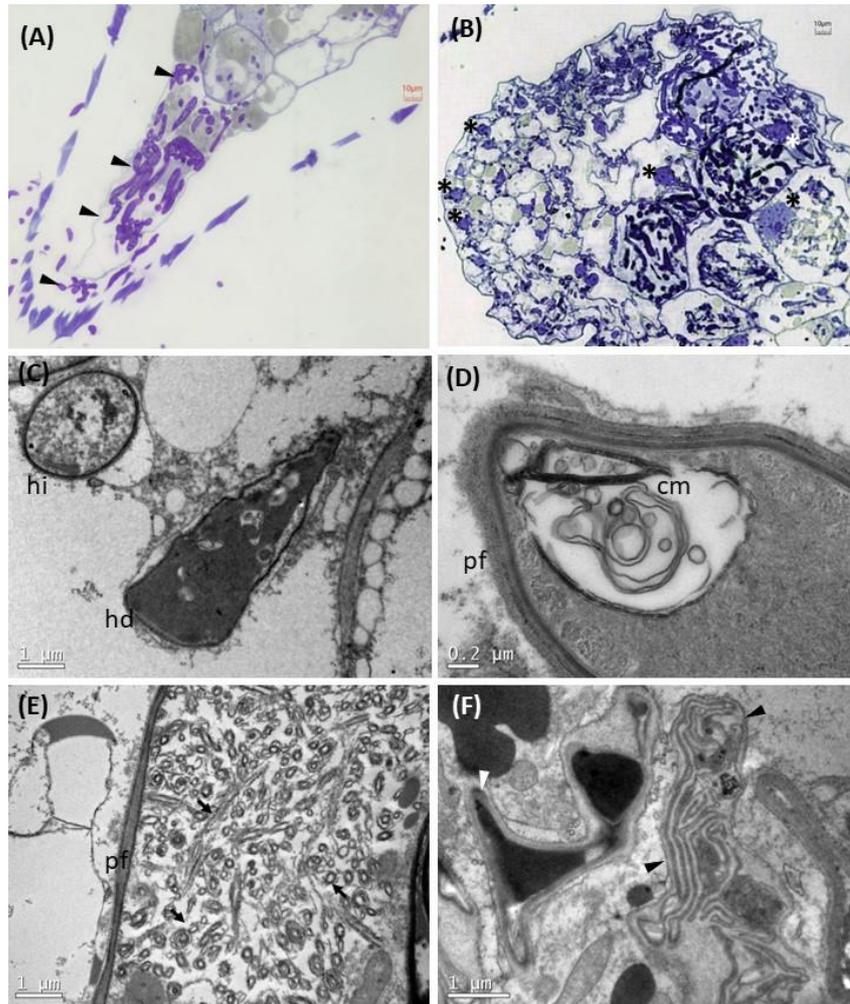


Figura 11: Micrografias mostrando o desenvolvimento da interação fungo-célula do protocormo. As hifas (cabeça de seta) se comportam diferentemente se estão em células do polo suspensor, onde se alongam e atravessam o citoplasma (A). Enquanto nas células da região mediana do protocormo (B), as hifas se enovelam, formando os péltons, e essas células, além do aumento do citoplasma, apresentam núcleo hipertrofico (*). C) Hifa íntegra (hf) e hifa em processo de digestão (hd). D) Corpo mielínico (Cm) formado no interior de hifa bem eletrondensa. E) Compartimento hifal delimitado pelas paredes celulares fúngicas (pf), repleto de membranas degradadas (setas). F) Estágio avançado de digestão das hifas (cabeça de seta).

O estudo da ultraestrutura dos simbiontes evidencia que o processo de degradação e digestão das hifas dos péltons se inicia com os compartimentos hifais, o que equivale a uma célula de fungo, quando estas se tornam escuras, ou eletrondensas (Figura 11C). Hifas íntegras têm um citoplasma claro (43letrontransparente), conforme observado nas imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET; Figura 11C). Já as hifas escuras passam a apresentar corpos mielínicos (Figura 11D), termo atribuído em virtude dessa estrutura ser semelhante à bainha de mielina de células nervosas animais, pois os corpos mielínicos são membranas que se rompem no citoplasma, e se organizam formando espirais (Figura 11D).

Durante essa fase, na qual o citoplasma fúngico se torna mais escuro e eletrondenso, aparecem mais corpos mielínicos. Nesse processo de digestão surge um estágio ultraestrutural, no qual ainda se observa a parede celular fúngica, mas o citoplasma passa a ser ocupado totalmente por “pequenos pacotes” de membranas menores que os corpos mielínicos (Figura 11E). Seguindo a digestão das hifas pelas células do protocormo, o produto do processo aparece nas micrografias de MET com aparência semelhante a um pacote de material amorfo, com regiões mais eletrondensas, formando linhas (Figura 11F).

As células embrionárias passam também por diversas mudanças em relação às organelas citoplasmáticas, considerando sua distribuição, volume e número de organelas. Nas sementes não germinadas, além das células do suspensor, ocorrem outros dois outros tipos morfológicos distintos: as células repletas de pequenos vacúolos e núcleos (Figura 12^a), e as células abundantes em corpos lipídicos (Figura 12B).

Durante a germinação, na periferia citoplasmática das células vacuoladas, na região apical e mediana do embrião, aparecem plastídios com grãos de amido (Figura 12C), enquanto nas células com muito conteúdo lipídico, na região basal do embrião, esse material deixa de ocupar a maior porção do volume citoplasmático, aparecendo na forma de gotículas menores de lipídeo (Figura 12D). Essas mudanças ultraestruturais ocorrem por volta dos sete aos nove dias de germinação, e a visualização dos núcleos dessas células se torna mais frequente, provavelmente porque, ao diminuir o volume que os lipídeos ocupam na célula, o núcleo ocupa um volume proporcionalmente maior (Figura 12 D). Até esse estágio, poucas organelas, como as mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, podem ser visualizadas nas células.

Com o avançar do desenvolvimento do embrião e a formação do protocormo, de nove a 13 dias após o início do co-cultivo, o número de plastídios, na forma de amiloplastos, aumenta proporcionalmente. Além de se tornarem mais numerosos na célula, frequentemente são observados ao redor dos núcleos (Figura 12E). Concomitantemente, as reservas de lipídeo vão diminuindo em número de gotículas e em volume, e é formado um grande vacúolo no centro das células da região lipídica, porção basal do protocormo (Figura 12F). Após 16 a 20 dias do co-cultivo, é possível observar nos plastídios que as membranas dos tilacóides começam a se organizar, sobrepondo-se umas às outras, e formando a estrutura dos *granum* (Figura 12G). Os grãos de amido ainda continuam presentes, sugerindo que há uma conversão de amiloplastos em cloroplastos. Nas células que apresentam conteúdo lipídico foram observadas muitas mitocôndrias, e estas, por muitas vezes, estavam associadas aos lipídios (Figura 12H), chegando a circundar as gotículas de lipídeo. Aparentemente, com base nas observações registradas, a

mobilização lipídica pode estar associada ao metabolismo mitocondrial.

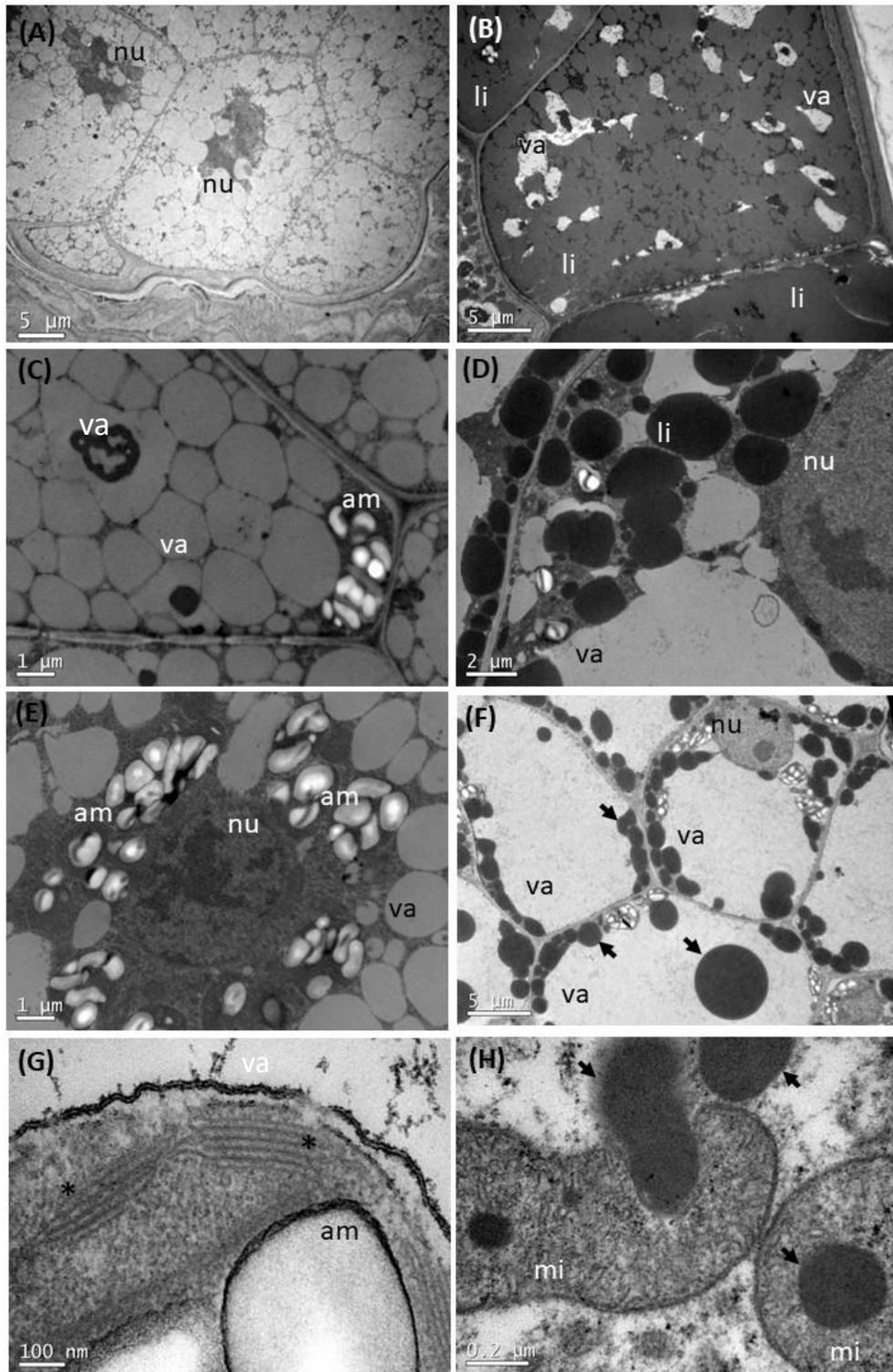


Figura 12: Eletromicrografias de embriões e protocormos de *C. purpurata*. Na coluna da esquerda é apresentada a evolução das células embrionárias da região mediana e apical, e na da direita, a evolução das células da região basal, a qual contém células ricas em substâncias lipídicas do embrião. A) Células da semente, mostrando muitos vacúolos em todo o citoplasma, e núcleos pequenos (nu). B) A maior parte do citoplasma é preenchida por lipídeos, que se apresentam eletrondensos (li), e pequenos vacúolos (va). C) Células apresentam ainda muitos vacúolos (va), mas também alguns amiloplastos, com os grãos de amido (am). D) Células da região lipídica do embrião, com grandes gotículas de lipídeo (li), já com vacúolos (va) grandes e núcleo (nu). E) Muitos vacúolos (va) circundando os muitos amiloplastos (am), que por sua vez, envolvem o núcleo (nu). F) células com menor conteúdo lipídico. G) células com maior conteúdo lipídico. H) células com maior conteúdo lipídico, mostrando mitocôndrias (mi) e lipídeos (li).

(li), e com vacúolos grandes (va). G) Plastídeo já com granum (*), com membranas tilacóides organizadas, ainda com grãos de amido (am). H) Mitocôndrias (mi) envolvem e circundam gotículas de lipídeos (setas).

A ontogênese da interação do fungo simbiótico e micorrízico *Tulasnella* (Isolado Isca 2) com embriões e protocormos da orquídea *C. purpurata* evolui para o aumento de organelas, como as mitocôndrias, a hipertrofia dos núcleos, o crescimento das hifas dentro das células do embrião, a digestão dos pélotons, o surgimento dos amiloplastos e a conversão destes em cloroplastos.

2.4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, a germinação e o desenvolvimento de protocormos da orquídea *C. purpurata* ocorreu no cultivo simbiótico na presença de fungos do gênero *Tulasnella*, isolados de raízes e de “armadilhas com sementes como iscas” (Isca 2 e 3), e também no meio MS (assimbiótico). O fungo *Ceratobasidium*, isolado de outra espécie de orquídea, não foi capaz de induzir a germinação de sementes de *C. purpurata*, embora este gênero de fungo tenha se mostrado bem eficiente na germinação de outras espécies de orquídeas (HERRERA *et al.*, 2016; FREESTONE *et al.* 2022). A partir dos poucos estudos de germinação simbiótica com outras espécies de *Cattleya* (ZETTLER & DVORAK, 2021, ENDRES JUNIOR *et al.*, 2023) e mais o que foi descrito neste estudo, fica aqui sugerido a especificidade de *C. purpurata* com o fungo do gênero *Tulasnella* para a germinação de sementes. Os fungos *Tulasnella*, isolados a partir de protocormos da natureza, promoveram as maiores taxas de germinação, enquanto aqueles isolados da raiz mostraram taxas de germinação menores do que os isolados das iscas, mas ainda assim, maiores do que a taxa de germinação do meio assimbiótico. Isso revela variações entre diferentes linhagens (podem ser espécies diferentes, ou apenas indivíduos diferentes) de *Tulasnella* com relação aos seus efeitos na germinação de sementes de *C. purpurata*.

Os pesquisadores Porrás-Alfaro e Bayman (2007) mostraram que fungos isolados de espécies de baunilha, das raízes crescendo no solo (*Ceratobasidium*) e das raízes ligadas ao substrato (*Tulasnella*) mostraram desempenhos diferentes na germinação das sementes, e apenas *Ceratobasidium* foi capaz de germinar as sementes e estimular o desenvolvimento dos protocormos. Outros estudos também revelaram o fungo *Ceratobasidium* como responsável pela germinação simbiótica de orquídeas (DURÁN-LÓPEZ *et al.*, 2019; FREESTONE *et al.*, 2022; PETERSON; CURRAH, 1990; WARCUP, 1973). No entanto, para a espécie do presente estudo – *C. purpurata* – o fungo desse gênero foi testado, mas não se mostrou capaz de induzir

a germinação das sementes.

Para a germinação de sementes da orquídea *Epidendrum secumndum*, a pesquisa de Pereira e colaboradores (2011), mostrou a eficiência de germinação de diversos fungos isolados das raízes, todos do gênero *Tulasnella*, e os resultados obtidos foram semelhantes ao do presente estudo. Os autores obtiveram que a germinação com um isolado de *Tulasnella* mostrou taxa de germinação maior que a de outros isolados do mesmo gênero, ressaltando a importância de se buscar os isolados com maiores chances de germinar as sementes, e possibilitar um maior número de plântulas simbióticas para usos em programa de reintrodução de espécies de orquídea na natureza.

Em estudo com *C. intermedia*, uma espécie simpátrica à *C. purpurata*, fungos isolados das raízes da própria orquídea, pertencentes à espécie *Tulasnella amonilioides*, favoreceram a germinação e o desenvolvimento de protocormos e de plântulas (ENDRES JUNIOR *et al.*, 2023). Os tratamentos com estes isolados mostraram também maiores taxas de germinação, maior número de folhas, raízes mais longas e maior massa seca, quando comparados com os indivíduos que germinaram no meio MS com carvão ativado (assimbiótico).

A maioria dos estudos que avaliam a especificidade de micobiontes para orquídeas é referente a orquídeas terrícolas e espécies do hemisfério norte global (América do Norte, Europa e Austrália); também a maioria descreve alta especificidade entre espécies de orquídeas, e gêneros ou espécies de fungos (BONNARDEUX *et al.*, 2007; McCORMICK *et al.*, 2006; WARCUP, 1981). Em alguns casos, essa especificidade é tão alta, que a espécie de fungo que sustenta o desenvolvimento do protocormo e das plântulas é diferente da espécie de fungo que estimula a germinação da semente (FUJI *et al.*, 2020; MENG *et al.*, 2019; STEWART; KANE, 2007).

No que tange ao desenvolvimento e às mudanças estruturais durante a germinação das sementes, e desenvolvimento dos protocormos de *C. purpurata*, quando em associação com o fungo micorrízico do gênero *Tulasnella*, encontramos novidades em relação à ultraestrutura e ao padrão de crescimento das hifas no interior das células. Durante a germinação, as células do embrião apresentam um padrão estrutural e de polarização, com células diferenciadas, não só em relação a sua morfologia, mas também em relação as suas reservas nutritivas. A região basal do embrião, ainda com resquícios do suspensor, possui células com um vacúolo grande, e outras células, ricas em lipídios. Já a região mediana e apical do embrião possui células com muitos vacúolos de pequena dimensão, e apresentam conteúdo proteico como provável substância de reserva, por conta da elétronttransparência dos vacúolos. Vinogradova e

Andronova (2002) descreveram padrão semelhante de germinação e desenvolvimento para orquídeas terrestres com formação de um eixo longitudinal no protocormo, com células embrionárias e células do suspensor em polos diferentes.

As sementes de orquídeas apresentam corpos lipídicos e corpos proteicos como substâncias de reserva energética (ARDITTI; GHANI, 2000). Poucos estudos em literatura já observaram grãos de amido em proplastídios; geralmente, não há reserva de carboidratos nas sementes de orquídeas, e os lipídeos formam a maior fonte nutritiva das suas sementes (ARDITTI; ERNST, 1992). No estudo sobre a germinação e o desenvolvimento da orquídea medicinal micohetetétrica, *Gastrodia elata*, com colonização por *Mycena*, fungo decompositor de serrapilheira, após o crescimento das hifas do fungo nas células embrionárias, os corpos proteicos se degradaram, e os amiloplastos começaram a aparecer (LI *et al.*, 2020).

Embora os lipídios sejam a fonte nutritiva nas sementes de orquídeas, no presente trabalho foi demonstrado que a mobilização dos lipídios é lenta. Além disso, as micrografias realizadas ao longo do desenvolvimento demonstraram que eventos como a entrada das hifas do fungo micorrízico, a mudança citoplasmática das células embrionárias, com o aumento da presença de organelas, como amiloplastos e mitocôndrias, o crescimento e a digestão dos pélotons, são processos que antecedem a mobilização total dos lipídios. Esta descrição evidencia-nos, portanto, que a energia necessária à germinação e ao desenvolvimento realmente provém do fungo micorrízico.

Estudos sobre a ontogênese da germinação simbiótica têm mostrado que a entrada do fungo micorrízico na semente se dá através das células do suspensor em orquídeas epífitas (LI *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020; PETERSON *et al.*, 1990), e que nas células do suspensor nunca se formam pélotons, fato também evidenciado pelo presente estudo. A conversão de proplastídeos em amiloplastos, e destes em cloroplastos, ocorreu num tempo curto para *C. purpurata*. O embrião passou de um estado de metabolismo completamente dependente do fungo micorrízico, com raros proplastídeos à amiloplastos, e destes, a cloroplastos com potencial fotossintético, em menos de 20 dias.

Com a chegada das hifas fúngicas à região apical do protocormo, mudanças celulares começaram a ocorrer com maior intensidade, mesmo nas células não micorrizadas. As células micorrizadas mostraram citoplasma aumentado, núcleos hipertróficos e isso denota uma intensa atividade metabólica (ARDITTI, 1967).

Após a formação dos pélotons nas células embrionárias da região mediana, ocorre a digestão de alguns pélotons, mas o que sinaliza o início dessa digestão permanece não esclarecido. O presente estudo sugere que as hifas senescentes é que serão digeridas, pois

observou-se uma espécie de *continuum* morfológico, onde hifas íntegras possuem o citoplasma eletrtransparente. Com os dias, vão surgindo alterações celulares nas hifas, como escurecimento do citoplasma, e o surgimento de corpos membranosos, denominados de “corpos mielínicos” ou “*structures myelin-like*”. Após, as hifas aparecerem em estágios avançados de degradação, sem forma, e são envolvidas pela parede celular das células da orquídea.

Os corpos mielínicos podem aparecer em células de animais, de vegetais ou de alguns tipos de microrganismos. Eles geralmente estão associados a processos de estresse oxidativo ou de morte celular, aparecendo em função de rompimentos de membranas internas, que se organizam na forma de espirais, pois essa forma é mais estável, já que a composição das membranas é rica em fosfolípidos, com cabeças apolares, e o meio citoplasmático é rico em íons e moléculas com cargas iônicas, isto é, são polares. Então, as membranas se enrolam, voltando suas regiões apolares entre si, e formando espirais, cuja aparência nas eletromicrografias de transmissão se semelha às bainhas de mielina das células nervosas (JOHNSON *et al.*, 2002; POLLARD *et al.*, 2022). Nos fungos, estes corpos mielínicos aparecem em células em processo de senescência e de morte celular (BOK *et al.*, 2003).

Sabe-se que o tempo médio de vida dos pélotons nas células corticais das raízes de orquídeas é de 48 horas, a partir deste dado surge a seguinte pergunta: as células das orquídeas, tanto as dos protocormos como as corticais das raízes, ao digerirem as hifas, poderiam estar contribuindo para manter o vigor do fungo micorrízico, eliminando as porções senescentes do fungo? A partir dos dados obtidos ainda não é possível uma inferência, devendo-se centrar novos estudos futuros para a elucidação da dinâmica do metabolismo energético nesta fase de desenvolvimento.

2.5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

As sementes de *C. purpurata* tiveram sua germinação e desenvolvimento do protocormo estimulados pelos isolados de fungos do gênero *Tulasnella*, enquanto o fungo micorrízico do gênero *Ceratobasidium* não favoreceu a germinação desta espécie de orquídea. Este resultado, somado aos registros de estudos prévios de germinação com outras espécies de *Cattleya* e fungos *Tulasnella*, sugerem que as espécies de *Cattleya* têm especificidade em relação a esse gênero de fungo, o qual é capaz de favorecer a germinação e estimular o desenvolvimento da espécie em suas fases juvenis.

A presente tese foi capaz de gerar um protocolo eficiente na produção de protocormos simbióticos, que mantiveram seu desenvolvimento em incubadoras BODs e que

se tornaram plântulas, com a primeira raiz bem desenvolvida.

Foram produzidas muitos protocormos simbióticos de *C. purpurata*, estes continuaram se desenvolvendo nas incubadoras e foram acompanhados até se desenvolverem em plântulas. Estas plântulas continuam se desenvolvendo até o presente momento, 140 dias após o início do cocultivo sementes/fungos *Tulasnella*.

As plântulas e plantas simbióticas de *C. purpurata* geradas pelo presente trabalho são ótimas candidatas para uso em programas de reintrodução na natureza, visto que segundo a literatura plantas micorrizadas apresentam melhores respostas frente a estresses abióticos, como períodos de seca, e estresses bióticos, como doenças causadas por patógenos.

Para o estudo da morfologia e ultraestrutura dos protocormos em germinação simbiótica, a Microscopia Confocal e Eletrônica de Transmissão combinadas são ferramentas robustas para auxiliar a compreensão de fenômenos celulares e ecológicos envolvendo simbioses.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; Walter, Peter. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Science, 2002.

ALMEIDA, P. R.; VAN DEN BERG, C.; GOES-NETO, A. Morphological and molecular characterization of species of *Tulasnella* (Homobasidiomycetes) associated with Neotropical plants of *Laeliinae* (Orchidaceae) occurring in Brazil. **Lankesteriana: International Journal on Orchidology**, v. 7, n. 1-2, 2007. DOI: <https://doi.org/10.15517/lank.v7i1-2.18387>.

ARDITTI, J. Factors affecting the germination of orchid seeds. **The Botanical Review**, v. 33, p. 1–97, 1967. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02858656>.

ARDITTI, J.; GHANI, A. K. A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, v. 145, p. 367-421, 2000.

ARDITTI, Joseph. **Fundamentals of orchid biology**. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 1992.

BATTY, A. L.; DIXON, K. W.; BRUNDRETT, M. C.; SIVASITHAMPARAM, K. Orchid conservation and mycorrhizal associations. *In*: SIVASITHAMPARAMA, K.; DIXON, K. W.; BARRETT, R.L. (eds.). **Microorganisms in plant conservation and biodiversity**. Dordrecht: Springer, 2002. DOI: https://doi.org/10.1007/0-306-48099-9_7.

BAZZICALUPO, M.; CALEVO, J.; ADAMO, M.; GIOVANNINI, A.; COPETTA, A.; CORNARA, L. Seed micromorphology, *in vitro* germination, and early-stage seedling morphological traits of *Cattleya purpurata* (Lindl. & Paxton) Van den Berg. **Horticulturae**, n. 7, v. 11, p. 480, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae7110480>.

- BOK, J.-W.; ISHIDA, K.-I.; GRIFFITHS, A. J. F. Ultrastructural changes in *Neurospora* cells undergoing senescence induced by kalilo plasmids. **Mycologia**, v. 95, n. 3, p. 500–505, 2003. DOI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21156639/>.
- BONNARDEAUX, Y.; BRUNDRETT, M.; BATTY, A.; DIXON, K.; KOCH, J.; SIVASITHAMPARAM, K. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. **Mycological Research**, v. 111, n. 1, p. 51-61, 2007.
- CHEN, J.; WANG, H.; LIU, S. S.; LI, Y. Y.; GUO, S. X. Ultrastructure of symbiotic germination of the orchid *Dendrobium officinale* with its mycobiont, *Sebacina* sp. **Australian Journal of Botany**, v. 62, n. 3, p. 229, 2014. DOI:10.1071/bt14017.
- CRUZ-HIGAREDA, J. B.; LUNA-ROSALES, B. S.; BARBA-ALVAREZ, A. A novel seed baiting technique for the epiphytic orchid *Rhynchostele cer vantesii*, a means to acquire mycorrhizal fungi from protocorms. **Lankesteriana**, v. 15, n. 1, p. 67-76, 2015.
- DEARNALEY, J. D. W.; CAMERON, D. D. Nitrogen transport in the orchid mycorrhizal symbiosis – further evidence for a mutualistic association. **New Phytologist**, v. 213, p. 10–12, 2017.
- DURÁN-LÓPEZ, E.; CAROCA-CÁCERES, R.; JAHREIS, K.; NARVÁEZ-VERA, M.; ANSALONI, R. M.E.; CAZAR, M. E. The micorrryzal fungi *Ceratobasidium* sp. and *Sebacina vermifera* promote seed germination and seedling development of the terrestrial orchid *Epidendrum secundum* Jacq. **South African Journal of Botany**, v. 125, p. 54-61, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.06.029>.
- ENDRES JÚNIOR, D., ALVES-SILVA, G. ., SASAMORI, M. H., SILVEIRA, R. M. B. DA, & DROSTE, A. Successful *Tulasnella amonilioides* isolation from wild *Cattleya intermedia* and effectiveness of the mycobiont on in vitro propagation of this threatened Orchidaceae. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, 8(1), 009–029. 2023. <https://doi.org/10.24221/jeap.8.1.2023.5160.009-029>
- FREESTONE, M.; LINDE, C.; SWARTS, N.; REITER, N. *Ceratobasidium* orchid mycorrhizal fungi reveal intraspecific variation and interaction with different nutrient media in symbiotic germination of *Prasophyllum* (Orchidaceae). **Symbiosis**, v. 87, p. 255–268, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13199-022-00874-9>.
- GONZÁLEZ, V.; PORTAL, M. A.; RUBIO, V. Review. Biology and Systematics of the form Genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, v. 4, n. 1, 2006. DOI:10.5424/sjar/2006041-178.
- HOENE, F. C. **Iconografia de Orchidaceas do Brasil**. São Paulo: Editora Gráfica Lanzara, 1949.
- LEE, Y.-I.; YEUNG, E. C.; LEE, N.; CHUNG, M. Embryo development in the Lady's Slipper Orchid, *Paphiopedilum delenatii*, with emphasis on the ultrastructure of the suspensor. **Annals of Botany**, v. 98, n. 6, p. 1311–1319, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcl222>.
- LI, Y. Y.; CHEN, X. M.; ZHANG, Y.; CHO, Y. H.; WANG, A. R.; YEUNG, E. C.; ZENG,

X.; GUO S.-X.; LEE, Y.-I. Immunolocalization and changes of hydroxyproline-rich glycoproteins during symbiotic germination of *Dendrobium officinale*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 552, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00552>.

LI, Y. Y.; GUO, S. X.; LEE, Y. I. Ultrastructural changes during the symbiotic seed germination of *Gastrodia elata* with fungi, with emphasis on the fungal colonization region. **Botanical studies**, v. 61, n. 1, p. 1-8, 2020.

MARTOS, F.; MUNOZ, F.; PAILLER, T.; KOTTKE, I.; GONNEAU, C.; SELOSSE, M. The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchid. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 5098–5109, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05692.x.

MCCORMICK, M. K.; WHIGHAM, D. F.; SLOAN, D.; O'MALLEY, K.; HODKINSON, B. Orchid–fungus fidelity: a marriage meant to last? **Ecology**, v. 87, n. 4, p. 903-911, 2006.

NASCIMENTO, Marcelo V. **Orquídeas Nativas de Florianópolis**. 2ª ed. rev. amp. Florianópolis: Edição do autor, 2021.

NOGUEIRA, R. E.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; LANNA, M. C. DA S.; MENDONÇA, M. P. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v. 19, n. 3, p. 417–424, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062005000300001>.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; ROLLEMBERG, C. L.; CHAER, G. M. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizotonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 2, p. 191–197, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832005000200004>.

PETERSON, R. L.; CURRAH, R. S. Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* (Orchidaceae) and *Ceratobasidium cereale*. *Canadian Journal of Botany*, v. 68, p. 1117–1125, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1139/b90-141>.

POLLARD, T. D.; EARNSHAW, W. C.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; JOHNSON, G. **Cell biology E-book**. Amsterdã: Elsevier Health Sciences, 2022.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. **Mycologia**, v. 99, n. 4, p. 510-525, 2007. DOI: 10.1080/15572536.2007.11832545.

PRIDGEON, A. **The illustrated encyclopaedia of orchids**. Portland: Timber, 1995.

RASMUSSEN, H. N. **Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1995.

RASMUSSEN, H. N.; DIXON, K. W.; JERSÁKOVÁ, J.; TĚŠITELOVÁ, T. Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. **Annals of Botany**, v. 116, n. 3, p. 391-402, 2015. DOI: 10.1093/aob/mcv087.

VINOGRADOVA, T. N.; ANDRONOVA, E. V. Development of orchid seeds and seedlings.

In: KULL, T.; ARDITTI, J.; WONG S. M. (eds.). **Orchid Biology: Reviews and Perspectives**. Amsterdã: Kluwer Academic Publishers, 2009.

WARCUP, J. H. Symbiotic germination of some Australian terrestrial orchids. **New Phytologist**, v. 72, n. 2, p. 387-392, 1973.

WARCUP, J. H. The mycorrhizal relationships of Australian orchids. **New phytologist**, v. 87, n. 2, p. 371-381, 1981.

YEH, C. M.; CHUNG, K.; LIANG, C. K.; TSAI, W. C. New insights into the symbiotic relationship between orchids and fungi. **Applied Sciences**, v. 9, n. 3, p. 585, 2019.

ZELMER, C. D.; CUTHBERTSON, L.; CURRAH, R. S. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms, **Mycoscience**, v. 37, n. 4, p. 439-448, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02461001>.

ZETTLER, L. W.; POULTER, S. B.; MCDONALD, K. I.; STEWART, S. L. Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a mycorrhizal fungus. **HortScience**, v. 42, n. 1, p. 135-139, 2007. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.1.135>.

ZETTLER, L. W.; DVORAK, C. J. *Tulasnella calospora* (UAMH 9824) retains its effectiveness at facilitating orchid symbiotic germination in vitro after two decades of subculturing. **Botanical Studies**, v. 62, n. 14. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00321-w>.

ZHANG, Y.; LI, Y. Y.; CHEN, X. M.; GUO, S. X.; LEE, Y. I. Effect of different mycobionts on symbiotic germination and seedling growth of *Dendrobium officinale*, an important medicinal orchid. **Botanical Studies**, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2020.

3. CAPÍTULO 2

Artigo a ser submetido à revista Environmental Microbiome.

O microbioma da “Rainha das Orquídeas”: diversidade de microrganismos associados às raízes de *Cattleya purpurata*

Summer Queen orchid microbiome: diversity of microorganisms living in *Cattleya purpurata* roots

RESUMO

Introdução: As orquídeas compreendem uma das famílias botânicas com maior riqueza de espécies, chegando à 10% do total de plantas terrestres. Além disso, se destacam por ocupar muitos tipos de ambientes diferentes, apresentarem grande variedade de formas e cores de flores, bem como de estratégias para atraírem os polinizadores. Muitas pesquisas têm se debruçado na descrição e estudo de fungos endofíticos que se associam às orquídeas, porém, poucos estudos têm se dedicado ao conhecimento de outros tipos de organismos que podem se associar às raízes das orquídeas, como as cianobactérias e algas. Neste estudo, foi apresentada uma gama de microrganismos associados às raízes da orquídea *Cattleya purpurata*, entre os quais o primeiro registro de nematódeos tanto para raízes de orquídea, como para uma planta epífita, bem como o primeiro registro de cianobactérias simbiotes intracelulares em orquídeas. Adicionalmente, apresentamos a taxa de micorrização e detalhes ultraestruturais das interações micorrízicas nas raízes. Os registros foram feitos a partir de técnicas de Microscopia Confocal (MC) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Transmissão (MET). Resultados: Foram observados microrganismos de distintos nichos ecológicos na raiz, desde bactérias, fungos endofíticos micorrízicos e não micorrízicos, cianobactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio, algas e nematódeos, que são animais que se alimentam dos fungos e bactérias presentes nesse microambiente. O velame apresenta uma estrutura única, como espaços onde antes ficava o protoplasto, espessamento e poros nas paredes, o velame apresenta condições para o desenvolvimento de diversas espécies e grupos de microrganismos. Além disso, as células do córtex da raiz apresentam condições de manter uma simbiose mutualística, entre fungo e orquídea, pois suas células deixam de produzir parede celular, mantendo um contato direto entre sua membrana plasmática e o fungo micorrízico. Assim, a troca de nutrientes entre os parceiros é facilitada Conclusões: As raízes de *C. purpurata* apresentam um diversificado

microbioma, caracterizado pela presença de microrganismos fotossintetizantes, tais como algas e cianobactérias, fungos decompositores e micorrizícos, e nematódeos, os quais se alimentam de fungos, bactérias e algas que vivem nesse microambiente. Diante dessas evidências conclui-se que a raiz de *C. purpurata*, e provavelmente as raízes de outras orquídeas epífitas, atuam como um microecossistema.

Palavras-chave: Orchidaceae. Velame. Micorriza orquidóide. Microrganismos simbiotes. *Cattleya purpurata*.

ABSTRACT

Background Orchids represent one of the greatest botanical families within species richness, being 10% of all terrestrial plants. In addition, they become special for i) occupying panoply of environments, ii) presenting a wide variety of flower shapes and colors, iii) strategies to attract pollinators. Extent literature has focused on the endophytic fungi description associated with orchids. However, few studies have been dedicated to other types of organisms that can be associated with orchid roots, such as cyanobacteria and algae. In the present study, we present a range of microorganisms associated with the *Cattleya purpurata* roots, their mycorrhization rate, and root cells ultrastructural details. Originally we demonstrate nematodes associated with orchid roots and an epiphytic plant, as well as, the symbiotic intracellular cyanobacteria in orchids. Our data was originated using confocal microscopy and scanning and transmission electron microscopy techniques.

Results Microorganisms from different ecological niches were observed in the orchid roots. Among them bacteria, mycorrhizal and non-mycorrhizal endophytic fungi, cyanobacteria (potentially nitrogen fixers), algae, and nematodes (feeding on the fungi present in this microenvironment). We observed a unique structure in the velamen, including spaces previously occupied by protoplast, wall thickening and pores, as well as velamen presenting conditions for the development of several microorganisms groups and species. Additionally, we describe cortex cells promoting a mutualistic symbiosis, between fungus and orchid; in which, cortical cells stop cell walls production, allowing direct contact between partners (orchid plasma membrane and the mycorrhizal fungus), ultimately facilitating nutrients exchange.

Conclusions The roots of *C. purpurata* present a diverse microbiome, characterized by photosynthetic microorganisms, such as algae and cyanobacteria, decomposers and mycorrhizal fungi, and also nematodes, which feed on fungi, bacteria and algae living in this

microenvironment. Given these evidences, it is concluded that the root of *C. purpurata*, and probably the roots of other epiphytic orchids, act as a microecosystem.

Keywords: Orchidaceae. Velame. Orchid mycorrhiza. Symbiotic microorganisms. *Cattleya purpurata*.

3.1. INTRODUÇÃO

As orquídeas possuem em suas raízes uma epiderme modificada. Nas espécies epífitas costumam ter várias camadas, e que em sua maturidade contam apenas com as paredes celulares; esse tecido é o velame, responsável por absorver água e nutrir a planta (JOCA *et al.*, 2017; ZOTZ; WINKLER, 2013). Além disso, o velame, por suas estruturas combinadas, associadas à presença de muitos poros e de espessamento anelados da parede celular, é capaz de absorver água muito rapidamente e de impedir a evaporação, além de formar uma camada de proteção contra a radiação ultravioleta (UV) aos tecidos que estão internos ao velame (CHOMICKI *et al.*, 2015; HOBER *et al.*, 2020). Associado a esse microambiente do velame, nos últimos anos, descobriu-se que as orquídeas interagem com uma ampla variedade de organismos, desde fotossintetizantes, como as algas e as cianobactérias (DEEPTHI *et al.*, 2020; TSAVKELOVA *et al.*, 2007), até os saprófitos e outros decompositores, como muitas espécies de fungos e de bactérias (CEVALLOS *et al.*, 2018, KAUR & SHARMA, 2021).

Embora exista uma grande diversidade de fungos endofíticos no velame (HERNANDEZ-RAMIREZ *et al.*, 2023), poucos são os estudos que se debruçam sobre essa interação. Há muito mais estudos sobre a interação entre fungos micorrízicos e orquídeas, provavelmente porque para a orquídea essa simbiose é obrigatória (ARDITTI, 1992). Sathiyadash e colaboradores (2012) registraram a colonização micorrízica generalizada em raízes de plantas adultas de 31 espécies de orquídeas, das quais 23 espécies eram epífitas, porém não mencionam a presença de fungos não-micorrízicos.

Num estudo com orquídeas da espécie *Laelia autumnalis*, em ambiente de floresta no México, foi registrado que todas as raízes mostravam a presença de fungos micorrízicos. Em todos os sete locais de coleta, as raízes amostradas apresentaram os pélotons, que são a forma característica da micorriza orquidóide, onde as hifas fúngicas crescem, se ramificam e se enovelam dentro das células das orquídeas, formando um enovelado de hifas. Esses pélotons foram observados em diferentes graus de degeneração, isto é, em diferentes etapas de digestão das hifas, o que gera o aporte de nutrientes às orquídeas hospedeiras (JIMÉNEZ-PEÑA *et al.*,

2018).

O presente trabalho teve como principal objetivo elucidar as estruturas anatômicas e celulares envolvidas na interação orquídea-microrganismo, bem como descrever a diversidade de microrganismos associados às raízes de *C. purpurata*. Para tanto, foram realizados estudos morfológicos das raízes, através de microscopias eletrônicas e confocal, e avaliada a taxa de micorrização, bem como aspectos relevantes da biologia celular das interações orquídea-fungo em nível ultraestrutural.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal e sítios de coleta

Foram analisados 20 indivíduos de *C. purpurata*, cujas raízes foram coletadas, em área de Mata Atlântica, no Sul da Ilha de Santa Catarina.

Dois indivíduos foram coletados na restinga arbórea no parque Monumento Natural Municipal da Lagoa do Peri, sul da Ilha de Florianópolis, Santa Catarina. Quatro indivíduos vieram da expedição “Orquídeas Nativas de Florianópolis”, a partir da qual o estudioso e orquidófilo Marcelo Nascimento resgatou algumas touceiras da natureza, e forneceu amostras de raízes. Além disso, foi amostrada uma população que se encontra na Costa de Dentro, no entorno do parque Monumento Natural Municipal da Lagoa do Peri, área de Floresta Atlântica, em propriedade particular denominada de “Alambique do Zeca”, de onde outros 15 indivíduos foram amostrados ao longo de 2 anos. Porções de três a cinco centímetros de raízes saudáveis, isto é, com velame branco, que se tornava esverdeado quando hidratado, sem manchas ou buracos, foram coletadas a partir destes 20 indivíduos, e levadas para processamento no Laboratório de Ecologia do Solo, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (CCA, UFSC).

3.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de transmissão (MET)

Os tecidos foram fixados com solução de glutaraldeído 3% (v/v) em tampão cacodilato de sódio (CaCO) 0,1M, em pH 7,2, por 24 horas. Posteriormente, seguiu-se a etapa de pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO₄) concentração 1% (v/v) em tampão CaCO por 2 horas, e então as amostras foram desidratadas em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). Para as amostras que foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV),

os tecidos desidratados foram secos em aparelho de ponto crítico com fluxo de CO₂, e as amostras foram recobertas com 30nm de ouro, montadas em stubs de alumínio com fita de carbono. As raízes foram observadas em microscópio eletrônico de varredura, modelo JEOL JSM-6390LV, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME, UFSC).

Para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) o processo foi o mesmo descrito acima, até a etapa de desidratação em acetona. Após estas etapas de processamento, as amostras foram infiltradas lentamente em resina SPURR (Sigma-Aldrich®). Então, os blocos de resina contendo as amostras de raízes foram polimerizados em estufa, a temperatura constante de 70 °C. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. O registro do material foi feito no microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 TEM, da Jeol Ltda®, também no LCME-UFSC.

3.2.3. Microscopia Confocal (MC)

Raízes saudáveis de *C. purpurata* foram fixadas em paraformaldeído 4% (v/v) em tampão fosfato de sódio (Na₃PO₄), concentração 0,1 M e pH 7,2. As amostras foram congeladas e cortadas em aparelho de criostato (Leica®, modelo CM 1850). As secções de 50 micrômetros foram coradas com fucsina ácida, para visualização das hifas de fungos, e outros microrganismos.

No microscópio confocal, foram usados os seguintes parâmetros:

a) Para visualização das paredes celulares das orquídeas, que possuem autofluorescência em azul, foi usado o laser Diódio 405 nm para excitação, e foi coletada a emissão em azul, de 420 a 480 nm.

b) Para a visualização de fungos e outros microrganismos, marcados com a fucsina ácida, para a excitação do corante foi usado o laser Argônio a 415 nm, e a faixa de emissão coletada foi a do vermelho, de 600 a 650 nm;

c) Para a visualização de microrganismos fotossintetizantes, tais como as cianobactérias e as algas, os cortes não foram corados, e a autofluorescência da clorofila foi visualizada com excitação do laser Argônio 488 nm (azul), e a faixa de emissão coletada foi a do laranja e vermelho (590 a 640 nm) (OLIVEIRA *et al.*, 2016; SCHMIDT *et al.*, 2012).

Para melhor visualização dos microrganismos associados às raízes, foram feitas séries de imagens no eixo Z, e então foi feita uma projeção tridimensional para mostrar a grande variedade de microrganismos, e a sua distribuição pelos tecidos do velame e córtex.

3.2.4. Avaliação da colonização micorrízica das raízes

Raízes saudáveis de *C. purpurata* foram fixadas, cortadas e coradas com fucsina básica, em processo similar ao procedimento descrito para Microscopia Confocal. Um total de 10 secções transversais de raízes de 5 indivíduos foram avaliadas quanto à área do córtex ocupada por estruturas micorrízicas. Foram considerados na análise, tanto os pélotons íntegros quanto os degradados, com cálculo de percentual de área de ocupação dada pela seguinte equação, conforme modificações a partir de González-Chávez *et al.* (2018):

$$\%Colonization\ by\ pélotons = \frac{[\#(0\%) + \#(25\%) + \#(50\%) + \#(75\%) + \#(100\%)]}{Total\ number\ of\ segments}$$

3.3. RESULTADOS

A raiz da *C. purpurata* mostra um velame multiestratificado com até 6 camadas, que em sua maturidade contam apenas com as paredes celulares. O protoplasto nesta fase é perdido, e assim são criados os espaços no tecido, sendo estes ocupados por microrganismos (Figura 1A-E). As paredes celulares das células do velame possuem espessamento reticulado e muitos poros (Figura 1C), de diferentes tamanhos. Desta forma, apresenta uma estrutura que comporta a permanência e a passagem de microrganismos (Figura 1E).

As raízes apresentaram em sua maioria, uma morfologia “dorso ventral” na qual a região que ficava em contato com o substrato é achatada, com menor número de camadas de células no velame, e com maior concentração de microrganismos no velame, e onde se encontram mais células micorrizadas no córtex. Enquanto a porção oposta é arredonda e apresenta poucos simbiontes, ou nenhum (Figura 1A).

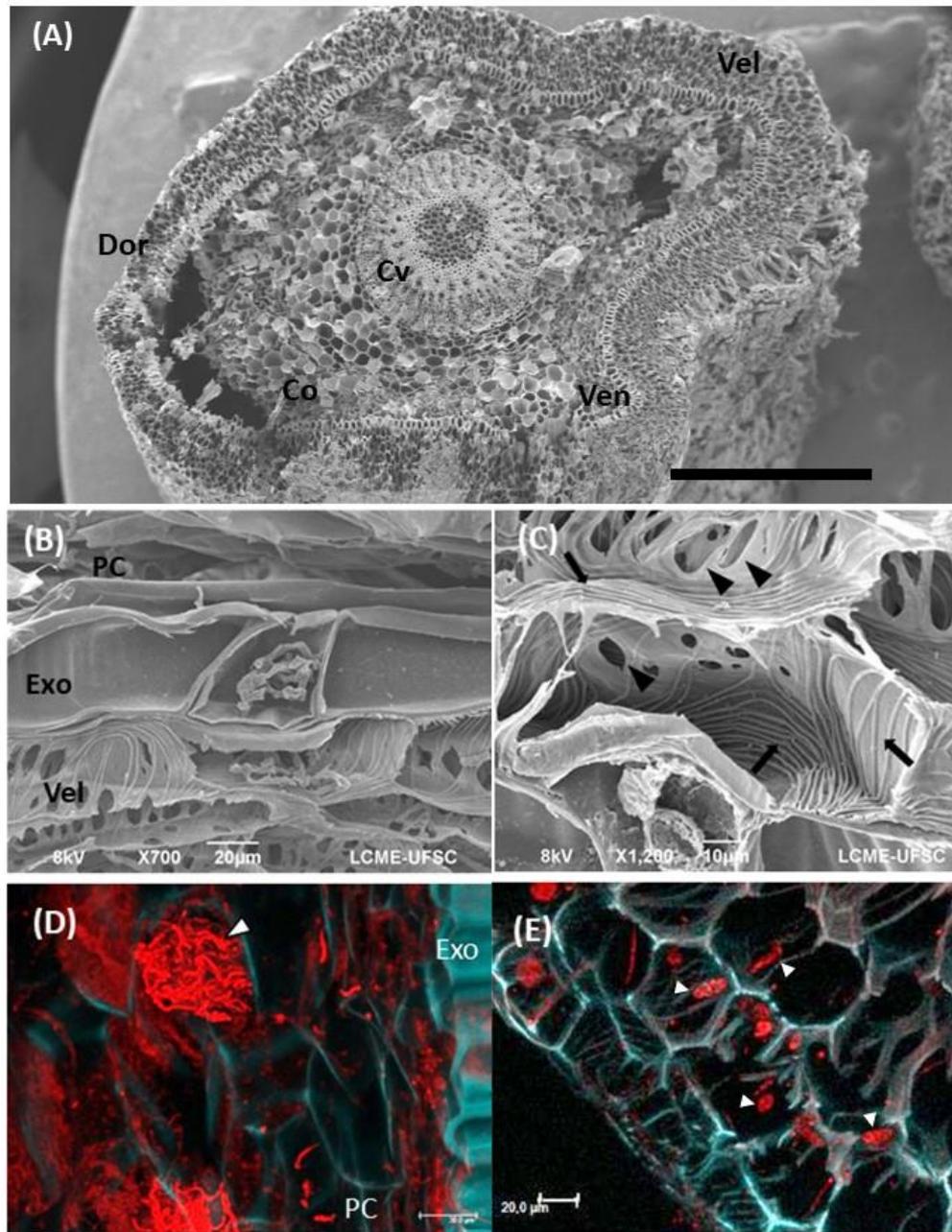


Figura 1: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV; A-C) e de Microscopia Confocal (MC; D-E), mostrando a raiz de *C. purpurata*. A) Secção transversal de raiz, mostrando as regiões dorsal (dor), arredondada, ventral (ven), achatada, o cilindro vascular (CV), o córtex (Co) e o velame (Vel), com camadas de células mortas. B) Hifas penetrando no córtex, através do velame e célula de passagem. C) Detalhe das estrias e poros na parede celular das células do velame. D) Pélotons íntegros no parênquima cortical (cabeça de seta) e paredes celulares espessadas da exoderme (azul mais intenso). E) Microrganismos simbiotes (cabeça de seta) no interior do velame.

As raízes apresentam, em sua porção mais central, o cilindro vascular com medula parenquimática (Figura 1A), e córtex com endoderme em contato com o cilindro vascular. O parênquima cortical é composto por células grandes e paredes celulares finas (Figura 1D), quando comparadas às células da endoderme e exoderme. A camada da exoderme apresenta paredes celulares bem espessadas, e com células de passagem com protoplasma, enquanto as células lignificadas são alongadas e sem citoplasma (Figura 1B).

No parênquima cortical e nas células de passagem da exoderme ocorre a simbiose com os fungos micorrízicos, onde as hifas se enovelam e formam os pélotons (Figura 1B-D). Também foram observados pélotons digeridos, formando espécies de “pacotes” com material fúngico amorfo, e em digestão (Figura 2A-C).

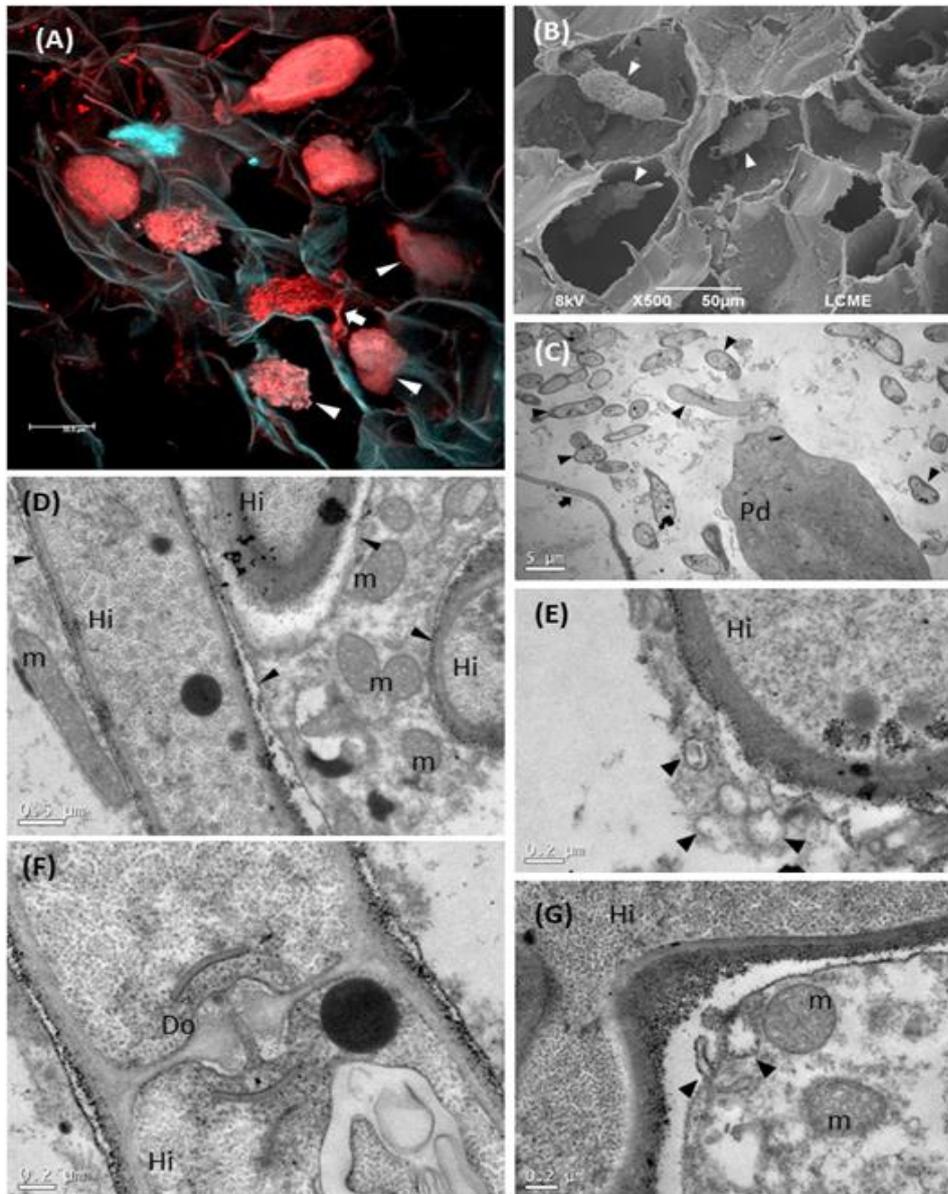


Figura 2: Imagens de Microscopia Confocal (MC; A), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV; B) e de Transmissão (MET; C-G), mostrando a interface das células corticais e hifas de fungos micorrízicos em *C. purpurata*. A) Péloton íntegro, com hifas passando para a célula cortical adjacente (seta), e pélotons em diferentes estágios de degradação (cabeças de seta). B) Parênquima cortical, ocupado por pélotons degradados (cabeça de seta). C) Detalhe de célula parenquimática delimitada por parede celular (seta), com hifas íntegras (cabeça de seta) e péloton degradado (Pd). D) Hifas (Hi) delimitadas pela membrana perifúngica (cabeça de seta) e circundadas por muitas mitocôndrias (m) da célula vegetal. E) Vesículas (cabeça de seta) próximas e se fundindo à membrana perifúngica. F) Detalhe do doliporo (Do) do fungo (Hi) micorrízico. G) Detalhe de vesículas com material elétron denso se fundindo à membrana perifúngica (cabeça da seta), e sendo exportada ao meio em contato com a hifa micorrízica (Hi).

Foi possível observar hifas de um fungo endofítico, provavelmente micorrízico, penetrando as células do córtex, passando pelo velame e pela célula de passagem, da exoderme, que é a camada mais externa do córtex (Figura 1B). No parênquima cortical, células com pélotons íntegros e pélotons degradados, em digestão, podem ocorrer lado a lado (Figura 2A). A digestão das hifas e o crescimento dessas é tão dinâmico, que se observa na mesma célula cortical hifas íntegras e hifas em diferentes estágios de digestão (Figura 2A e C).

Quando as hifas estão ativas no citoplasma das células do parênquima cortical, as células vegetais não apresentam parede celular ao redor das hifas, e a membrana plasmática está em contato direto com a parede do fungo micorrízico, sendo essa membrana especializada denominada de membrana perifúngica (Figura 2D). Com frequência, mitocôndrias e múltiplas vesículas são observadas junto à membrana perifúngica (Figura 2D e E), sendo inclusive observada a fusão de vesículas às membranas perifúngicas, e a exportação de vesículas ao meio extracelular, entre a membrana plasmática e a parede celular fúngica (Figura 2G). O espaço de troca de moléculas entre célula vegetal e hifa do fungo micorrízico é chamado de matriz interfacial, e neste espaço a parede celular vegetal é ausente (Figura 2D e F). Nas imagens de Microscopia Confocal (MC), é possível perceber que hifas integras não mostram autofluorescência em azul, enquanto os pélotons em diferentes estágios de degradação voltam a ter fluorescência nesta faixa, similar àquela observada na parede celular vegetal (Figura 2A).

As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) revelaram uma estrutura do septo, comum a todos os fungos basidiomicetos, porém com características específicas para alguns gêneros de fungos micorrízicos orquidóides: o doliporo (Figura 2F). Em todas as imagens registradas, o doliporo mostrou o mesmo padrão ultraestrutural: parentossomos encurvados, imperforados e com uma região, proximal ao poro, elétron-densa, característico de doliporo do gênero *Tullasnella*.

As raízes também foram avaliadas quanto à área do córtex ocupado por pélotons, na tentativa de estimar a importância dos fungos micorrízicos para a orquídea, além das fases iniciais de desenvolvimento. A taxa de micorrização calculada foi de 18%, significando que a média de colonização micorrízica da área cortical foi de 18% da área total analisada na secção.

Muitas estruturas fúngicas foram observadas nas células do velame. Esses fungos, ocupando essa região da raiz que é composta de paredes celulares e espaços vazios apenas, serão chamados de fungos endofíticos (Figura 3A). Diferentes fungos, com hifas de diâmetros distintos, melanizados ou hialinos, além de esporos, foram registrados no velame (Figura 3B-C).

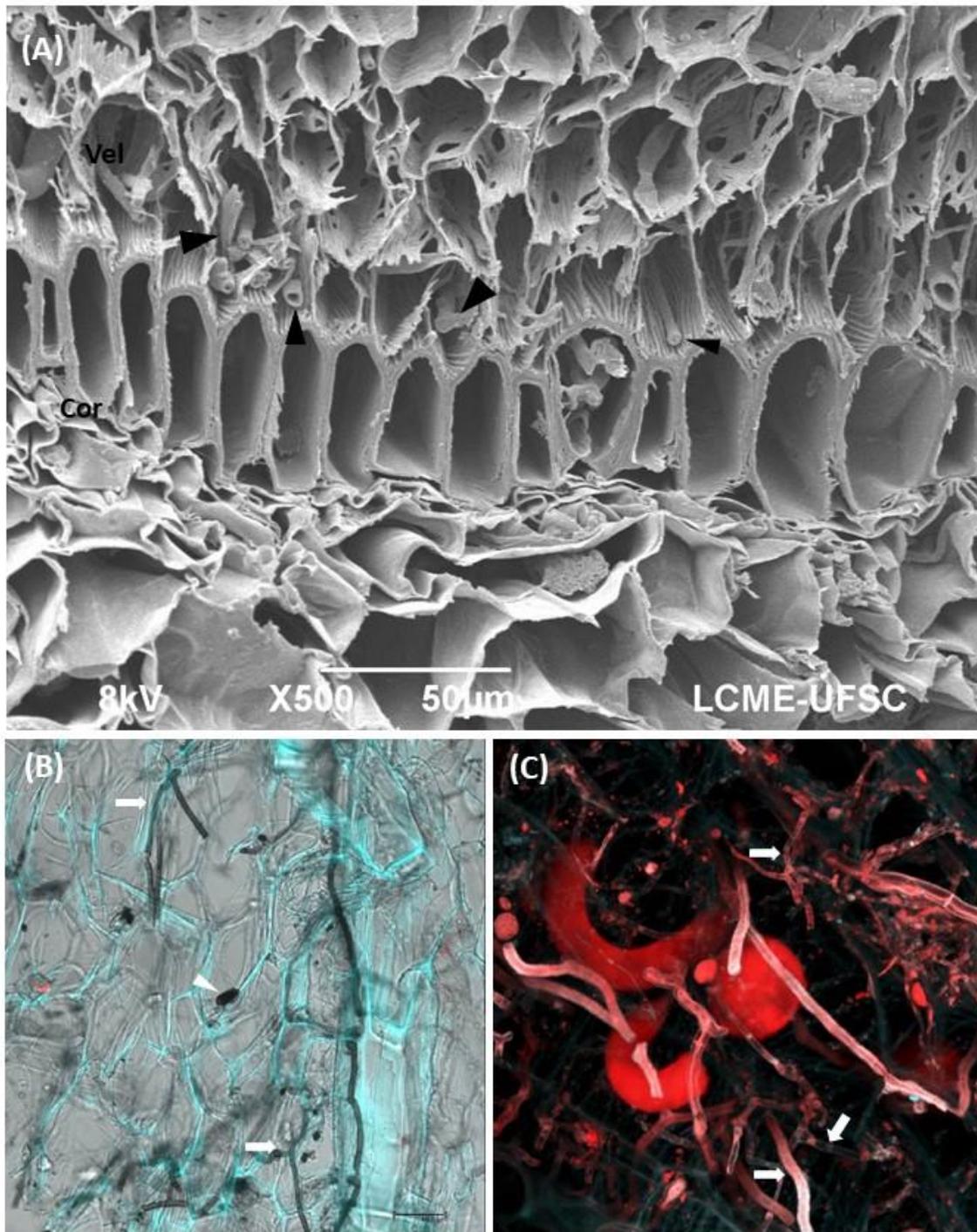


Figura 3: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV; A) de microscopia de luz transmitida em campo claro (B) e de fluorescência no microscópio confocal (MC; C), mostrando fungos endofíticos que ocupam o velame de *C. purpurata*. A) Vista geral do córtex (Co) e do velame (Vel), mostrando hifas de diversos calibres (cabeça de seta). B) Hifas (setas) e esporos (cabeça de seta) de fungos endofíticos melanizados no velame. C) Hifas de morfologias distintas (setas) no velame.

O velame apresenta uma grande diversidade de microrganismos, de diferentes filos e categorizados por exercerem diversos papéis biológicos. Dentre os organismos fotossintetizantes encontrados no velame, estão as algas (Figura 4A), com talos unicelulares ou

filamentosos, e de variadas formas (Figura 4B). Por meio da MC foram observados cloroplastos individualizados nas células de algumas algas (Figura 4C), enquanto a MET confirmou a presença de microalga verde, evidenciada pelo cloroplasto com 2 membranas, tilacóides organizados em pilhas, e a presença de plastoglóbulos (Figura 4D).

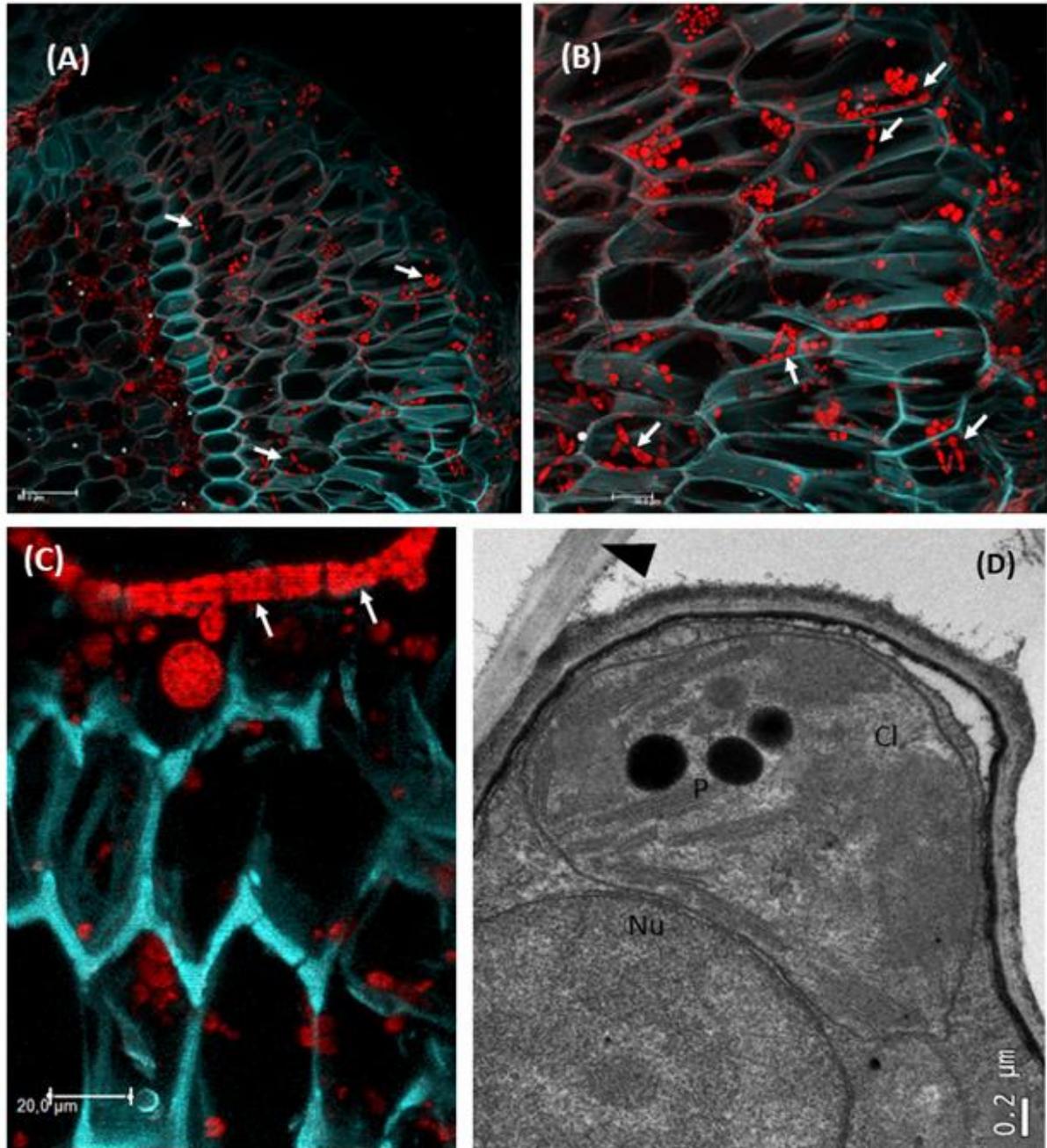


Figura 4: Imagens de Microscopia Confocal (MC), a partir da autofluorescência das paredes celulares da raiz (em azul) e dos cloroplastos de *C. purpurata* (em vermelho), (imagens A-C). Em D, imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de microalga verde no velame. A) Vista geral de parte da raiz mostrando, as múltiplas camadas do velame, os organismos fotossintetizantes distribuídos pelo velame (setas) e os cloroplastos também no córtex da raiz. B) Em azul, as paredes do velame, com poros, e em vermelho as microalgas, filamentosas e unicelulares (setas). C) Detalhe de alga filamentosa, setas mostram as células com alguns cloroplastos. D) Detalhe de alga verde, com plastoglóbulos (P) no cloroplasto (Cl) e no núcleo (Nu), e parede celular do velame (cabeça de seta).

Outro grupo de organismos fotossintetizantes associados às raízes da orquídea estudada são as cianobactérias (Figura 5A-D), as quais podem estar concentradas, em grande número de indivíduos, preenchendo totalmente os espaços celulares do velame (Figura 5B). Elas podem também apresentar um envoltório externo, que tem autofluorescência na faixa do azul, como as paredes celulares das raízes (Figura 5C). As colônias de cianobactérias podem se organizar em filamentos longilíneos (Figura 5D), em filamentos enovelados, ou também em agregados de muitos indivíduos (Figura 5A e C).

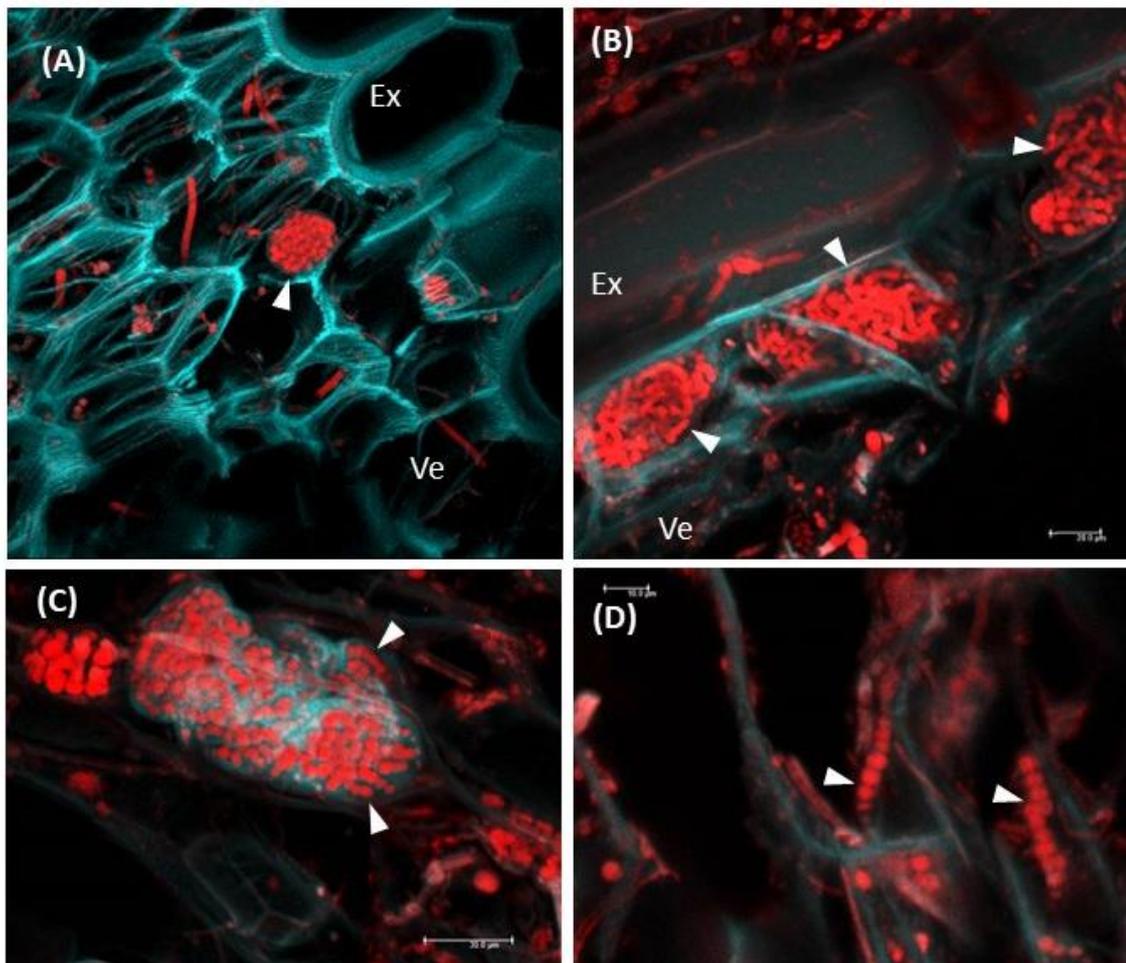


Figura 5: Imagens de Microscopia Confocal (MC), mostrando cianobactérias no velame de *C. purpurata*. A) Velame com espaços, onde se observa aglomerados de cianobactérias (cabeça de seta), e exoderme com parede espessada. B) Vista longitudinal da exoderme (Exo) e velame (Ve), mostrando células de passagem (menores) e células lignificadas (maiores), e grande concentração de agrupamentos de cianobactérias (cabeça de seta) no velame, logo acima da exoderme. C) Cianobactérias (cabeça de seta) que apresentam um envoltório extracelular, que também autofluoresce em azul. D) Cianobactérias dispostas em talos filamentosos no velame.

As cianobactérias foram observadas não apenas no velame, mas também dentro das células do córtex (Figura 6A-B). E aqui tem-se o primeiro registro deste tipo de colonização simbiótica: cianobactérias dentro de células vivas de orquídea. Geralmente as cianobactérias são simbiontes, que vivem em espaços entre as células, ou em células mortas, com apenas

paredes, como é o caso do velame. Neste estudo, foi observada a distribuição de cianobactérias em células de passagem da exoderme (Figura 6A), e em célula do parênquima cortical (Figura 6B-C). Foi possível observar, inclusive, a célula com as cianobactérias circundadas por células com pélotons degradados (Figura 6C).

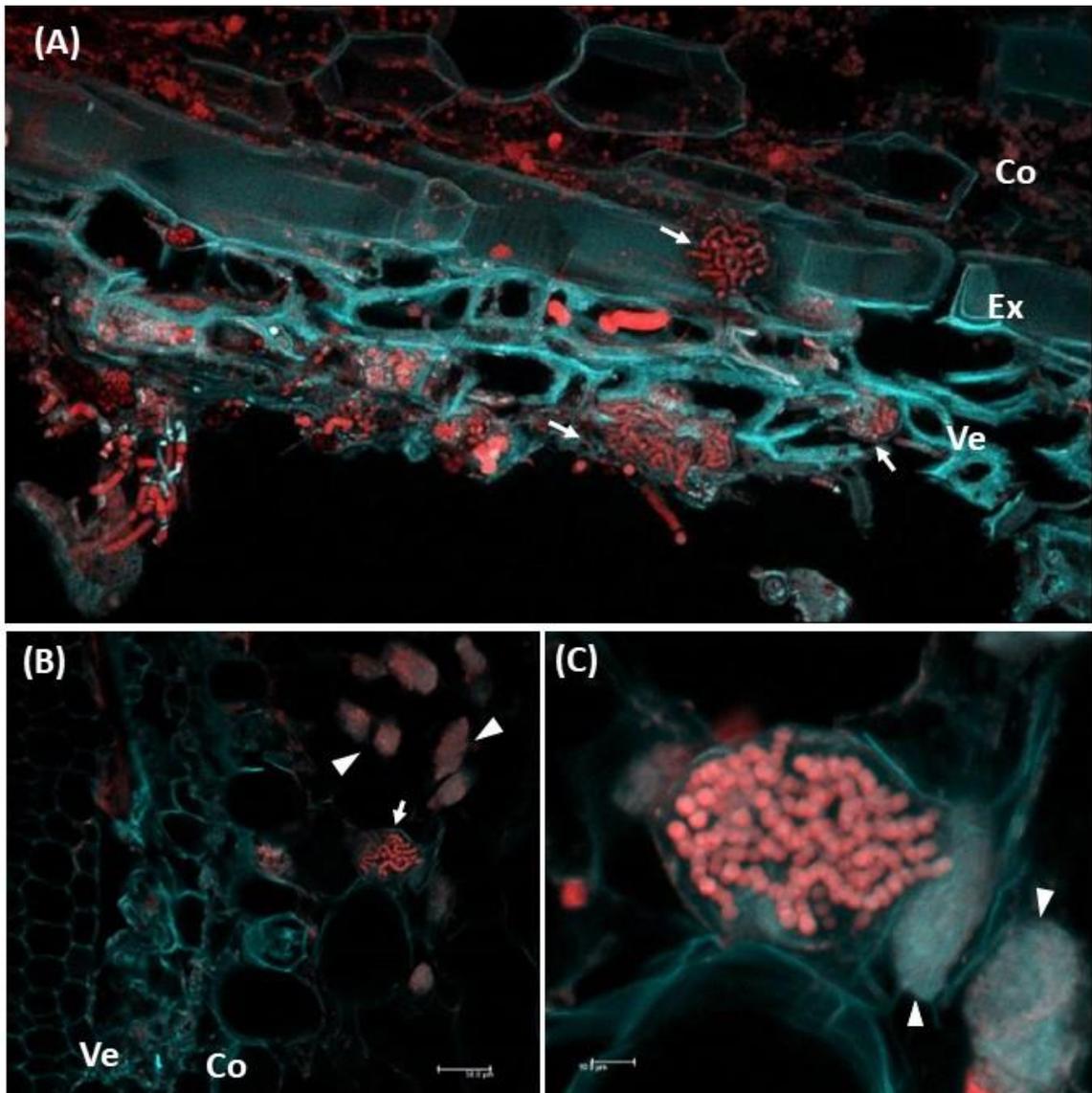


Figura 6: Imagens de Microscopia Confocal (MC), mostrando microrganismos e pélotons degradados (autofluorescência em vermelho), e a presença de cianobactérias em células de passagem e do parênquima cortical de *C. purpurata*. A) Cianobactérias (setas) presentes no velame (Ve) e exoderme (Ex). B) Cianobactérias (seta) em célula parenquimática do córtex (co), e pélotons degradados no córtex (cabeça de seta). C) Detalhe das cianobactérias dentro de célula, evidenciada na autofluorescência da parede da célula cortical (em azul) e por pélotons degradados nas células parenquimáticas adjacentes (cabeça de seta).

Um outro grupo frequentemente amostrado no velame foram os vermes do grupo dos nematódeos (Figura 7A). Os nematódeos foram registrados em quase todas as raízes dos indivíduos de *C. purpurata* da população amostrada na localidade da Costa de Dentro, nas imediações do Parque Municipal da Lagoa do Peri. A técnica de coloração com fucsina ácida e

a análise de MC foi capaz de mostrar não somente a presença dos invertebrados, mas também detalhes da anatomia dos indivíduos (Figura 7B-C).

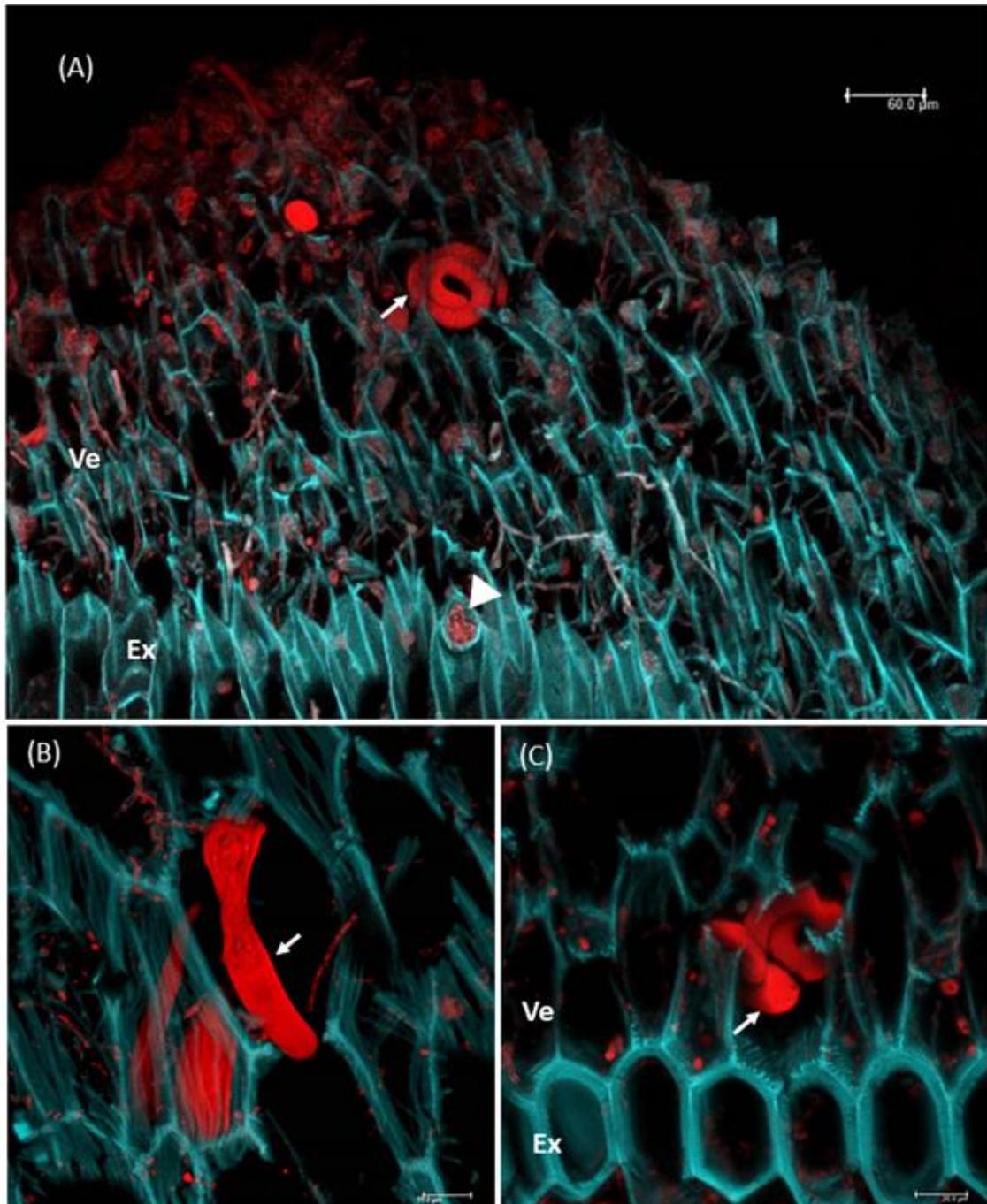


Figura 7: Imagens de Microscopia Confocal (MC), mostrando microrganismos (em vermelho) presentes no velame de *C. purpurata*. A) Vista tangencial da raiz mostrando muitas células do velame com microrganismos, presença de um nematódeo (seta), e parte da exoderme (Ex), com o citoplasma da célula de passagem corado em vermelho (cabeça de seta). B) Vista de um nematódeo, com parte de seu interior à mostra (seta). C) Nematódeo (seta) ocupando algumas células do velame.

3.4. DISCUSSÃO

As raízes de *C. purpurata* mostraram anatomia padrão para o grupo das orquídeas epífitas, com um velame multiestratificado, de até 6 camadas, córtex composto por células parenquimáticas com pélotons, demonstrando a importância da simbiose micorrízica mesmo na fase adulta. Na maioria das raízes amostradas se observou uma forma dorsiventral, onde a face ventral, voltada ao substrato, possuía velame com menor número de camadas celulares e a maior parte dos registros para os microrganismos endofíticos. Já a face dorsal das raízes é mais proeminente e arredondada, e apresenta menor frequência de microrganismos associados. Esta região fica voltada ao meio externo, em contato com o ar seco, e sob a incidência da radiação solar. As raízes das orquídeas podem se tornar dorsiventrais, como uma adaptação ao ambiente epífítico, onde a região dorsal arredondada tem uma função protetora e a porção ventral tem função de absorção, com tricomas e redução do velame, e espessamento da exoderme (STERN, 2014).

O velame surge também em outras famílias botânicas, como algumas Araceae e outras monocotiledôneas epífitas, porém apenas nas orquídeas este tecido é tão especializado (BENZING, 1990). Nas raízes das orquídeas, as paredes celulares do velame apresentam um complexo arranjo de poros e estrias lignificadas (PRIDGEON, 1983), que conferem função de absorção, pelo aumento da capilaridade e higroscopia no tecido (BENZING, 1990; Joca *et al.*, 2020). O velame também oferece suporte mecânico, evitando o colapso celular durante a dissecação (ZOTZ; WINKLER, 2013), além de ter um importante papel na proteção contra a radiação ultravioleta (UV), pois pode sintetizar, nas células vivas, compostos como os flavonóides, que atuam na proteção contra a radiação UV-B. Estes compostos fotoprotetores são acumulados nas paredes do velame, após o protoplasma ser perdido, garantindo uma proteção de longo termo à radiação UV-B (CHOMICKI *Et al.*, 2015). A soma dessas características do velame propicia a formação de um micro-habitat, com um microclima que favorece a vida e desenvolvimento de muitos tipos de microrganismos, que encontram nas raízes da orquídea um local adequado para abrigo contra dessecação e radiação UV e recursos alimentares.

As raízes de *C. purpurata* apresentaram uma grande diversidade de microrganismos associados, que incluiu diferentes táxons e níveis ecológicos, desde procariontes, como as bactérias e cianobactérias, a eucariontes unicelulares (algumas microalgas verdes), eucariontes filamentosos (representados pelos fungos micorrízicos) e animais invertebrados, como os vermes nematódeos. A diversidade também se mostra quanto aos nichos ecológicos dos

organismos, como exemplo: as algas, que necessitam de muita umidade, e que realizam fotossíntese; os fungos, que podem ser decompositores do substrato onde a orquídea se fixa, e/ou simbioses mutualistas, como os micorrízicos; e os animais, como os nematódeos, que neste contexto provavelmente estão usando a raiz como abrigo e como local de alimentação, visto que esses animais, quando de vida livre, se alimentam de algas, fungos e bactérias (HAILU; HAILU, 2020), que são abundantes no velame. Dessa forma, é possível afirmar que as raízes de *C. purpurata* atuam como um microecossistema, e que neste ambiente existe a formação de redes tróficas, com diferentes nichos, com microrganismos decompositores, como as bactérias e espécies de fungos saprofitos, aqueles fotossintetizantes, como as cianobactérias e as algas, e os predadores, como os nematódeos.

Além disso, diante desta sugerida rede alimentar biodiversa, sugere-se no presente trabalho que o velame tem um papel adicional na nutrição da orquídea. O primeiro papel é aquele já bem validado na literatura, cuja contribuição é a de absorver a água da chuva, que pode ter nutrientes dissolvidos, como comprovado por Zotz & Winkler (2013). Além deste papel, o velame também contribui nutricionalmente, por permitir que nutrientes, que são produtos da digestão que os microrganismos realizam, como as bactérias e os fungos saprofitos, no momento da hidratação da raiz, após a chuva ou absorção de água do ar, esses produtos da digestão sejam carregados para os tecidos internos e vivos da orquídea, junto com a água como seu solvente.

Poucos estudos registram as cianobactérias como endofíticas em raízes de orquídea. Em um deles, realizado com quatro espécies de orquídeas epífitas tropicais, foram isoladas e identificadas 24 espécies de algas (DEEPTHI; RAY, 2020). Além disso, surgem evidências de que as cianobactérias isoladas das raízes atuam como fixadoras de nitrogênio, e o disponibilizam para as raízes das plantas às quais se associam. Os autores juntaram evidências de que o velame atua como um “órgão ecossistema”, onde os parceiros simbióticos contribuem no aporte nutricional das orquídeas epífitas (DEEPTHI; RAY, 2020).

Em uma relação simbiótica com plantas diferentes, no caso, o arroz (*Oryza* spp.), procedeu-se um co-cultivo de plântulas e duas linhagens de cianobactérias do grupo *Nostoc*, observando-se células das cianobactérias colonizando as células da epiderme e da exoderme da raiz. Mostrou-se também que o nitrogênio fixado pelas cianobactérias era disponibilizado às plântulas, cujas raízes inoculadas mostraram incremento no comprimento total e na massa seca (ALVAREZ *et al.*, 2020). Em outro estudo com cianobactérias isoladas de raízes de arroz, cepas do gênero *Nostoc* foram capazes de acumular e liberar fitormônios, tais como a zeatina e o ácido indolacético para o meio de cultura (HUSSEIN *et al.*, 2013). Este resultado sugere que

esses simbioses, além de terem papel na nutrição da planta, também podem atuar metabolicamente em seu hospedeiro, através da sinalização hormonal e desenvolvimento do vegetal parceiro (HUSSEIN *et al.*, 2013).

Outros simbioses muito frequentes no velame da espécie de orquídea deste estudo foram os vermes nematódeos. Macroscopicamente, não se observou nenhum sintoma aparente de doenças causadas por nematódeos e reconhecidas em vegetais nos indivíduos, nas raízes coletadas no campo. Além disso, não existe ainda nenhum registro de nematódeos nas raízes de orquídeas, e este será o primeiro documentado em literatura até o presente. Embora muitas espécies de nematódeos causem doenças, e sejam pragas de diversos cultivares, a maior parte das espécies de nematódeos é de vida livre, e se alimentam de microrganismos como os fungos, bactérias, algas e até mesmo outros nematódeos. Esses microrganismos desempenham um papel ecológico importante na decomposição e reciclagem de nutrientes orgânicos em um ecossistema (HAILU; HAILU, 2020).

A simbiose mais estudada nas orquídeas é a micorrízica, provavelmente por ser esta a mais importante para a germinação, desenvolvimento e estabelecimento das orquídeas em ambientes naturais. De acordo com Hossain (2022), os primeiros estudos que evidenciaram a presença de fungos nas raízes e protocormos das orquídeas datam do final do século XIX, e de lá pra cá os estudos têm se intensificado, principalmente nas últimas décadas, buscando não só desvendar aspectos morfológicos e funcionais das interações, como também identificar os parceiros fúngicos (CURRAH.; ZELMER, 1992; DEEPHI; RAY, 2018; PAARK *et al.*, 2018; RICHARDSON; CURRAH, 1995).

Apesar das raízes das orquídeas epífitas terem um velame mais desenvolvido em comparação às das espécies terrícolas, a colonização micorrízica é menor nas espécies epífitas. Isso pode estar relacionado ao fato de que nas orquídeas terrícolas a principal fonte de nutrientes venha dos parceiros micorrízicos, enquanto nas epífitas esse aporte de nutrientes pode estar associado aos organismos endofíticos do velame (DRESSLER, 1990).

Num estudo com cinco espécies de orquídeas da subtribo *Pleurothallidinae* foram isolados mais de 200 fungos do velame, e o sequenciamento da região ITS-ribossomal agrupou os fungos em 12 ordens de Ascomycota e 3 ordens Basidiomycota, revelando uma grande diversidade de fungos associados ao velame. Segundo os autores, os fungos micorrízicos das espécies de orquídea estudadas foram basicamente do filo Basidiomycota, e que toda a riqueza de espécies do filo Ascomycota encontrada esteve associada ao velame. Estes, em sua maioria, são saprófitos, associados às cascas das árvores, e ao musgo do substrato, de onde as raízes foram coletadas, sugerindo que parte da nutrição das orquídeas tenha se originado da digestão

de matéria orgânica realizada pelos fungos do velame (HERRERA *et al.*, 2010).

No presente trabalho, *C. purpurata* mostrou uma taxa de colonização micorrízica de 18%, enquanto estudos com raízes terrestres de três espécies de *Vanilla* mostraram taxa de micorrização de até 70% da área do córtex. Para *Chloraea gaviu*, uma orquídea terrícola da região dos Andes, a taxa de micorrização foi superior a 30% (GONZALEZ-CHAVEZ *et al.*, 2018). Em um estudo com a orquídea terrícola do gênero *Paphiopedilum*, a taxa de micorrização variou de 13 a 32% (IDRIS; QAMARUZ ZAMAN, 2020). Plantas com raízes micorrizadas de *Phalaenopsis amabilis*, uma espécie importante comercialmente, mostraram maiores taxas de sobrevivência e de aclimação, frente ao estresse por alta luminosidade, quando comparadas às plantas não micorrizadas (MING-CHIH *et al.*, 2014), evidenciando as vantagens de plantas micorrizadas.

Em relação à ultraestrutura da interação entre o fungo micorrízico e as células parenquimáticas corticais, foi frequente a observação de uma intensa presença de vesículas e de mitocôndrias junto à membrana perifúngica (membrana plasmática da célula vegetal em contato com o fungo micorrízico). Estas organelas observadas podem estar participando da exportação dos fotossimilados da planta para nutrir o fungo e/ou podem estar atuando na digestão das hifas antigas, e assim, contribuindo para a nutrição da orquídea por meio da digestão e absorção de todo o conteúdo hifal. Em um estudo com uma espécie de orquídea micoheterotrófica, Liu *et al.* (2020) mostraram uma extensa rede de microtúbulos e de vesículas associadas aos pélotons em processo de lise celular, e os autores sugerem que a digestão das hifas ocorra por endocitose, sendo por isso justificada a presença tão evidente de vesículas.

A presença de doliporos nas hifas das raízes de *C. purpurata* permitiram a identificação do gênero do fungo micorrízico associado às raízes. Doliporos são nano estruturas nos poros dos septos presente em representantes de Basidiomycota. A morfologia do doliporo pode ajudar a identificar o gênero do fungo. Por exemplo, o septo dolipórico de *Tullasnella* tem as seguintes características: parentossomo levemente curvado, imperforado, com uma camada distal elétrontrondensa, e uma camada eletrontrasnlúcida na outra extremidade (ANDERSEN, 1996). Com base nesta descrição anatômica, o fungo que formou micorriza com *C. purpurata*, pertence ao gênero *Tullasnella*. Os fungos deste gênero (fase anamorfa: *Epulorhiza*) são conhecidos por decompor material vegetal morto, e têm sido descritos como formadores de micorrizas em diversas espécies de orquídeas terrícolas e epífitas (ALMEIDA *et al.*, 2007; ANDERSEN; RASMUSSEN 1996; CURRAH; ZELMER 1992; CURRAH *et al.*, 1997; FREITAS *et al.*, 2020; ZELMER *et al.*, 1996; ZETTLER, 1997).

3.5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

As raízes de *C. purpurata* apresentam um microambiente e um microbioma, com organismos que realizam *in loco* desde a decomposição e fotossíntese, até a predação de outros organismos que coabitam nesse local. Uma relação mutualística também é registrada: o fungo *Tullasnella* e as células das raízes de *C. purpurata* trocam nutrientes, e apresentam adaptações morfológicas que facilitam essa troca, tais como a digestão de parede por parte do fungo, e durante um intervalo de tempo, a não reposição da parede celular pela orquídea, o que permite um contato direto entre membrana plasmática da orquídea e a parede celular do fungo micorrízico. Vermes nematódeos também foram encontrados e descritos em raízes da orquídea epífita pela primeira vez, e nessa relação parece que os vermes não apresentam patogenicidade para a planta, pois elas não mostraram sintomas macroscópicos de doenças, evidenciando uma interação neutra para as orquídeas.

Cianobactérias já são conhecidas como simbiontes em diversas plantas, porém poucos são os registros dessa simbiose intracelular, inclusive este é o primeiro registro da presença de cianobactérias intracelulares em orquídeas. Para os poucos estudos que mostraram essa simbiose intracelular, incluindo o presente, as evidências são baseadas em imagens de Microscopia Confocal ou Microscopia de Luz transmitida. Assim, seria desejável registrar a interação ultraestrutural, objetivando aprofundar o conhecimento da interface entre os simbiontes, tal qual já se conhece na simbiose orquídea-fungo micorrízico. Nesta relação simbiótica, no estágio de péloton íntegro ocorre a digestão da parede celular vegetal, e o tempo em que a orquídea deixa de sintetizá-la, permite que os simbiontes tenham a troca de nutrientes facilitada, através da matriz interfacial. Com as cianobactérias ocorreria uma estrutura semelhante? A técnica de microscopia eletrônica de transmissão poderá ser de grande ajuda para elucidar essa questão. Outra questão interessante em relação às cianobactérias seria confirmar se elas participam na nutrição da orquídea, fixando nitrogênio e o disponibilizando para a planta. Essa pergunta pode ser respondida, por exemplo, com experimentos com radioisótopo de nitrogênio e análise de isótopos estáveis.

Outro ponto chave para evidenciar a hipótese de que a raiz de orquídea atua como um microecossistema, seria identificar todos os microrganismos que vivem ali. Análises de metagenômica, com amplificação, e sequenciamento de porções específicas do DNA, como a região 16 S para bactérias, ITS para fungos, e 18S para eucariotos, podem identificar grande parte destes microrganismos. Essa análise está em vias de finalização, e futuramente irá compor

o artigo sobre a diversidade de microrganismos associados às raízes de *C. purpurata*.

Fica aqui a hipótese de que, além de compor um microecossistema nas raízes de *C. purpurata*, a maior parte destes microrganismos contribui para a sua nutrição, visto que boa parte deles têm digestão externa, e que toda a vez que o velame é embebido, seja pelo aporte de água pluvial ou umidade do ar, a água e os nutrientes dissolvidos nela entram rapidamente nos tecidos internos da raiz.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P. R.; VAN DEN BERG, C.; GOES-NETO, A. Morphological and molecular characterization of species of *Tulasnella* (*Tulasnella* (Homobasidiomycetes) associated with Neotropical plants of *Laeliinae* (Orchidaceae) occurring in Brazil. **Lankesteriana: International Journal on Orchidology**, v. 7, n. 1-2, 2007. DOI: <https://doi.org/10.15517/lank.v7i1-2.18387>.

ÁLVAREZ, C.; NAVARRO, J. A.; MOLINA-HEREDIA, F. P.; MARISCAL, V. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the symbiotic strain *Nostoc punctiforme* PCC 73102. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 33, n. 8, p. 1040-1045, 2020. DOI: 10.1094/MPMI-01-20-0015-SC.

ANDERSEN, T. F.; RASMUSSEN, H. N. The mycorrhizal species of *Rhizoctonia*. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (eds.). ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1966. p 379–390.

ANDERSEN, Torben Frank. A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia sensu lato* employing morphological, ultrastructural and molecular methods, . **Mycological Research**, Volume v. 100, Issue n. 9, 1996, Pagesp. 1117-1128, 1996. ISSN 0953-7562, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80224-3](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80224-3).

ARDITTI, J.; GHANI, A. K. A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, v. 145, p. 367-421, 2000.

ARDITTI, Joseph. **Fundamentals of orchid biology**. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 1992.

BACON, Charles W.; WHITE, James F. Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. **Symbiosis**, v. 68, p. 87-98, 2016.

BARTHLOTT, W.; GROBE-VELDMANN, B.; KOROTKOVA, N. **Orchid seed diversity: A Scanning Electron Microscopy Survey**. Berlin-Dahlem: Botanischer Garten und Botanisches Museum, 2014. DOI: <https://www.jstor.org/stable/24365345>.

BAYMAN, P.; OTERO, J. T. Microbial Endophytes of Orchid Roots. In: SCHULZ, B. J. E.;

BOYLE, C. J. C.; SIEBER, T. N. (eds.). **Microbial Root Endophytes**. Soil Biology, v. 9. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006. DOI: https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_9.

BENZING, D. H. **Vascular epiphytes**: General biology and related biota. United Kingdom: Cambridge University Press, 1990.

CAMERON, Duncan D.; LEAKE, Jonathan R.; READ, David 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, p. 405–416, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01767.x>.

CEVALLOS, S.; HERRERA, P.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A.; DECLERCK, S.; SUÁREZ, J. P. Untangling factors that drive community composition of root associated fungal endophytes of Neotropical epiphytic orchids. **Fungal Ecology**, v. 34, p. 67-75, 2018.

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

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

DEARNALEY, J. D. W.; CAMERON, D. D. Nitrogen transport in the orchid mycorrhizal symbiosis – further evidence for a mutualistic association. **New Phytologist**, v. 213, p. 10–12, 2017.

DEEPTHI, Azhanthanilkunnathil S.; RAY, Joseph G. Endophytic diversity of hanging velamen roots in the epiphytic orchid *Acampe praemorsa*. **Plant Ecology & Diversity**, v. 11, n. 5/6, p. 649-661, 2018. DOI: [10.1080/17550874.2019.1610911](https://doi.org/10.1080/17550874.2019.1610911).

DEEPTHI, Azhanthanilkunnathil Sankunny; RAY, Joseph George. Algal associates and the evidence of cyanobacterial nitrogen fixation in the velamen roots of epiphytic orchids. **Global Ecology and Conservation**, v. 22, e00946, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e00946>.

DRESSLER, R.L. **The orchids**: natural history and classification. Cambridge MA: Harvard University Press, 1990.

FREITAS, E. F. S.; SILVA, M.; CRUZ, E. D. S.; MANGARAVITE, E.; BOCAYUVA, M.F.; VELOSO, T. G. R.; SELOSSE, M. A.; KASUYA, M. C. M. Diversity of mycorrhizal *Tulasnella* associated with epiphytic and rupicolous orchids from the Brazilian Atlantic Forest, including four new species. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. DOI: [10.1038/s41598-020-63885-w](https://doi.org/10.1038/s41598-020-63885-w).

GARCÍA, V. González; ONCO, M. A. Portal; SUSAN, V. Rubio. Review: Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 1, 55-79, 2006.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. D. C. A.; TORRES-CRUZ, T. J.; SÁNCHEZ, S. A.;

CARRILLO-GONZÁLEZ, R.; CARRILLO-LÓPEZ, L. M.; PORRAS-ALFARO, A. Microscopic characterization of orchid mycorrhizal fungi: Scleroderma as a putative novel orchid mycorrhizal fungus of *Vanilla* in different crop systems. **Mycorrhiza**, v. 28, n. 2, p. 147-157, 2018. DOI: 10.1007/s00572-017-0808-6.

HAILU, Firew Admasu; HAILU, Yodit Admasu. Agro-Ecological Importance of Nematodes (Round Worms). **Acta Scientific Agriculture**, v. 4, n. 1, 156-162, 2020.

HAUBER, F.; KONRAD, W.; ROTH-NEBELSICK, A. Aerial roots of orchids: the velamen radicum as a porous material for efficient imbibition of water. *Appl. Phys. A* 126, 885 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00339-020-04047-7>.

HAUBER, F.; KONRAD, W.; ROTH-NEBELSICK, A. Aerial roots of orchids: the velamen radicum as a porous material for efficient imbibition of water. **Applied Physics A**, v. 126, n. 885, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00339-020-04047-7>.

HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, F.; DAMON, A.; FERNÁNDEZ PAVÍA, S.P.; GUILLÉN-NAVARRO, K.; IRACHETA-DONJUAN, L.; ZARZA, E.; CASTRO-CHAN, R.A. Community Richness and Diversity of Endophytic Fungi Associated with the Orchid *Guarianthe skinneri* Infested with “Black Blotch” in the Soconusco Region, Chiapas, Mexico. **Diversity** 2023, 15, 807. <https://doi.org/10.3390/d15070807>

HERRERA, P.; SUÁREZ, J. P.; KOTTKE, I. Orchids keep the ascomycetes outside: a highly diverse group of ascomycetes colonizing the velamen of epiphytic orchids from a tropical mountain rainforest in Southern Ecuador. **Mycology**, v. 1, n. 4, p. 262-268, 2010. DOI: 10.1080/21501203.2010.526645.

HOENE, F. C. **Iconografia de Orchidaceas do Brasil**. São Paulo: Editora Gráfica Lanzara, 1949.

IDRIS, N. A.; ZAMAN, F. Qamaruz. Root mycorrhization and growth of *Paphiopedilum* plantlets during symbiosis with orchid mycorrhiza isolated from *Phaphiopedilum barbatum*. Proceedings of the 1st International Electronic Conference on Plant Science, Basel, Switzerland, MDPI, 2020. p. 1–15. DOI:10.3390/IECPS2020-08757.

JIANG, Weimei; YANG, Guanmei; ZHANG, Chulong; FU, Chenxin. Species composition and molecular analysis of symbiotic fungi in roots of *Changnienia amoena* (Orchidaceae). **Advanced Journal of Microbiology Research**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2019.

JOCA, Thais Arruda Costa; OLIVEIRA, Denis Coelho de; ZOTZ, Gerhard; CARDOSO, João Custódio Fernandes; MOREIRA, Ana Sílvia Franco Pinheiro. Chemical composition of cell walls in velamentous roots of epiphytic Orchidaceae. **Protoplasma**, v. 257, p. 103–118, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01421-y>.

KAUR J, SHARMA J. Orchid Root Associated Bacteria: Linchpins or Accessories? **Front Plant Sci**. 2021. doi: 10.3389/fpls.2021.661966. PMID: 34249034; PMCID: PMC8264303.

KUGA, U.; SAKAMOTO, N.; YURIMOTO, H. Stable isotope imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotonspélotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. **New Phytologist**, v. 202, n. 2, p. 594–605, 2014. DOI: 10.1111/nph.12700.

LEE, Ming-Chih; CHANG, Doris C. N.; WU, Chun-Wei; WANG, Yin-Tung; CHANG, Yu-Sem. *Phalaenopsis* efficiently acclimate to highlight environment through orchid mycorrhization. **Scientia Horticulturae**, v. 179, 184-190, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.033>.

MA, Xiaoya; KANG, Jichuan; NONTACHAIYAPOOM, Sureporn; WEN, Tingchi; HYDE, Kevin D. Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids. **Current Science**, v. 109, n. 1, p. 72–87, 2015.

MMA. **Portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022**. Altera os Anexos da Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014, da Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014, e da Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014, referentes à atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2022. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P_mma_148_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extincao.pdf. Acesso em: 29 abr. 2023.

OBERWINKLER, Franz; CRUZ, Darío; SUÁREZ, Juan Pablo. Chapter 12: Biogeography and ecology of *TulasnellaTulasnellaceae*. In: TEDERSOO, L. (ed.). **Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis**, p. 237-271, 2017. Serie Ecological Studies 230. DOI 10.1007/978-3-319-56363-3_12.

OLIVEIRA, E. M.; SCHMIDT, É. C.; PEREIRA, D. T.; BOUZON, Z. L.; OURIQUES, L. C. Effects of UV-B radiation on germlings of the red macroalga *Nemalion helminthoides* (Rhodophyta). **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 4, n. 2, p. 85-94, 2016.

OLIVEIRA, S. F.; BOCAYUVA, M. F.; VELOSO, T. G. R.; BAZZOLLI, D. M. S.; SILVA, C. C.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M. Endophytic and mycorrhizal fungi associated with roots of endangered native orchids from the Atlantic Forest, Brazil. **Mycorrhiza**, v. 24, p. 55–64, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0512-0>.

PARK, M. S.; EIMES, J. A.; OH, S. H.; SUH, H. J.; OH, S.-Y.; LEE, S.; PARK, K. H.; KWON, H. J.; KIM, S.-Y.; LIM, Y. W. Diversity of fungi associated with roots of *Calanthe* orchid species in Korea. **Journal of Microbiology**, v. 56, p. 49–55 (, 2018). DOI: <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7319-9>.

PEREIRA, M. C.; PEREIRA, O. L.; COSTA, M. D.; ROCHA, R. B.; KASUYA, M. C. M. Diversidade de fungos micorrízicos *Epulorhiza* spp. isolados de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciência Do do Solo**, v. 33, n. 5, 2009.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; ROLLEMBERG, C. L.; CHAER, G. M. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizotonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 2, p. 191–197, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832005000200004>.

PRIDGEON, A.M. 1983. The velamen and exodermis of orchid roots. In: ARDITTI K. (ed.). **Orchid biology. Reviews and perspectives IV**. Ithaca, NY: Cornell University Press, 139–192. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000500012>.

PRIDGEON, Alec M. The velamen and exodermis of orchid roots. **Orchid biology: reviews**

and perspectives, v. 4, p. 141-192, 1987.

RASMUSSEN, H. N.; WHIGHAM, D. F. Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. **American Journal of Botany**, v. 80, p. 1374-1378, 1993.

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

RIKKINEN, J. 2017. Cyanobacteria in terrestrial symbiotic systems. *In*: HALLENBECK, P.C., (editor.). **Modern topics in the phototrophic prokaryotes**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 243–294.

ROTH-NEBELSICK, A.; HAUBER, F.; KONRAD, W. The velamen radicum of orchids: a special porous structure for water absorption and gas exchange. *In*: GORB, S.; GORB, E. (eds.). **Functional Surfaces in Biology III**. Biologically-Inspired Systems, v. 10. Cham: Springer, 2017. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-74144-4_5.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 743–767, 2013Ann Bot. 1115:743–767.

SCHMIDT, E. C.; BEATRIZ PEREIRA, B.; RODRIGO W. DOS SANTOS, R. W.; CLAUDIANE GOUVEIA, C.; GIULIA BURLE COSTA, G. B.; GABRIEL S.M. FARIA, G. S. M.; FERNANDO SCHERNER, F.; PAULO A. HORTA, P. A.; ROBERTA DE PAULA MARTINS, R. P.; ALEXANDRA LATINI, A.; FERNANDA RAMLOV, F.; MARCELO MARASCHIN, M.; ZENILDA L. BOUZON, Z. L. Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B, **Aquatic Botany**, v. 100, p. 8-17, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2012.03.004>.

STERN, W. L. 2014. **Anatomy of the Monocotyledons**. Volume X. Orchidaceae. England: Oxford University Press, 2014.

WANG, T.; CHI, M.; GUO, L.; LIU, D.; YANG, Y.; ZHANG, Y. The diversity of root-associated endophytic fungi from four epiphytic orchids in China. **Diversity**, 2021, v. 13, n. 197, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/d13050197>.

WARSHAN, D.; LIAIMER, A.; PEDERSON, E.; KIM, S. Y.; SHAPIRO, N.; WOYKE, T.; ALTERMARK, B.; PAWLOWSKI, K.; WEYMAN, P. D.; DUPONT, C. L.; RASMUSSEN, U. Genomic changes associated with the evolutionary transitions of *Nostoc* to a plant symbiont. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 5, p. 1160–1175, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy029>Mol.

YEUNG, E. C. A perspective on orchid seed and protocorm development. **Botanical Studies**, (2017) v. 58, n. 33, 2017. DOI: 10.1186/s40529-017-0188-4.

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

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE

Os resultados do presente trabalho mostraram que as técnicas de Microscopia Confocal (MC) e Eletrônica, de Varredura (MEV) e Transmissão (MET), são ferramentas efetivas no estudo e descrição de simbioses entre plantas e microrganismos. Estas ferramentas revelam detalhes anatômicos das interações entre as células, e permitem ora a identificação de organismos, ora da dinamicidade das interações entre os simbioses.

Os protocolos desenvolvidos no presente estudo continuaram seu desenvolvimento nas incubadoras BODs, formaram plântulas com folhas e a primeira raiz. Uma parte destas plântulas está sendo aclimatada em diferentes substratos em casa de vegetação, visando a produção de plantas para futuros programas de reintrodução da *C. purpurata* em ambientes naturais.

Por fim, a preservação de *C. purpurata*, uma espécie ameaçada de extinção, mantém preservada também uma rede de interações extensa na natureza. E isso ressalta a urgência em se levantar estratégias para a sua conservação. Nesse caso, a espécie elencada pode ser considerada como uma Espécie-Bandeira (Flagship) para conservação da Floresta Ombrófila Densa (Mata-Atlântica), pois as estratégias de conservação de seu habitat podem contribuir para a preservação de toda a biodiversidade a ela associada, bem como de outras espécies sensíveis e presentes no mesmo ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDITTI, J.; GHANI, A. K. A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, v. 145, p. 367-421, 2000.
- ARDITTI, Joseph. **Fundamentals of orchid biology**. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 1992.
- BACON, Charles W.; WHITE, James F. Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. **Symbiosis**, v. 68, p. 87-98, 2016.
- CNCFlora. **Centro Nacional de Conservação da Flora**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2023. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal>. Acesso em: 30 abr. 2023.
- CONSEMA. **Resolução CONSEMA Nº 51, de 05 de dezembro de 2014**. Reconhece a Lista Oficial das Espécies da Flora Ameaçada de Extinção no Estado de Santa Catarina e dá outras providências. Disponível em: <https://www.ima.sc.gov.br/index.php/downloads/biodiversidade/flora/2436-lista-da-flora-ameacada-de-extincao-em-sc-resolucao-consema-n-51-2014>. Acesso em: 01 maio 2023.
- DEARNALEY, J. D. W.; CAMERON, D. D. Nitrogen transport in the orchid mycorrhizal symbiosis – further evidence for a mutualistic association. **New Phytologist**, v. 213, p. 10–12, 2017.
- DRESSLER, R.L. **The orchids: natural history and classification**. Cambridge MA: Harvard University Press, 1990.
- GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. D. C. A.; TORRES-CRUZ, T. J.; SÁNCHEZ, S. A.; CARRILLO-GONZÁLEZ, R.; CARRILLO-LÓPEZ, L. M.; PORRAS-ALFARO, A. Microscopic characterization of orchid mycorrhizal fungi: Scleroderma as a putative novel orchid mycorrhizal fungus of *Vanilla* in different crop systems. **Mycorrhiza**, v. 28, n. 2, p. 147-157, 2018. DOI: 10.1007/s00572-017-0808-6.
- HAUBER, F.; KONRAD, W.; ROTH-NEBELSICK, A. Aerial roots of orchids: the velamen radicum as a porous material for efficient imbibition of water. **Applied Physics A**, v. 126, n. 885, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00339-020-04047-7>.
- HOENE, F. C. **Iconografia de Orchidaceas do Brasil**. São Paulo: Editora Gráfica Lanzara, 1949.
- JIANG, Weimei; YANG, Guanmei; ZHANG, Chulong; FU, Chenxin. Species composition and molecular analysis of symbiotic fungi in roots of *Changnienia amoena* (Orchidaceae). **Advanced Journal of Microbiology Research**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2019.
- JOCA, Thais Arruda Costa; OLIVEIRA, Denis Coelho de; ZOTZ, Gerhard; CARDOSO, João Custódio Fernandes; MOREIRA, Ana Sílvia Franco Pinheiro. Chemical composition of cell walls in velamentous roots of epiphytic Orchidaceae. **Protoplasma**, v. 257, p. 103–118, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01421-y>.

MMA. **Portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022**. Altera os Anexos da Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014, da Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014, e da Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014, referentes à atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2022. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P_mma_148_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extincao.pdf. Acesso em: 29 abr. 2023.

NASCIMENTO, Marcelo V. **Orquídeas Nativas de Florianópolis**. 2ª ed. rev. amp. Florianópolis: Edição do autor, 2021.

OBERWINKLER, Franz; CRUZ, Darío; SUÁREZ, Juan Pablo. Chapter 12: Biogeography and ecology of *TulasnellaTulasnellaceae*. In: TEDERSOO, L. (ed.). **Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis**, p. 237-271, 2017. Serie Ecological Studies 230. DOI 10.1007/978-3-319-56363-3_12.

OLIVEIRA, S. F.; BOCAYUVA, M. F.; VELOSO, T. G. R.; BAZZOLLI, D. M. S.; SILVA, C. C.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M. Endophytic and mycorrhizal fungi associated with roots of endangered native orchids from the Atlantic Forest, Brazil. **Mycorrhiza**, v. 24, p. 55–64, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0512-0>.

PARK, M. S.; EIMES, J. A.; OH, S. H.; SUH, H. J.; OH, S.-Y.; LEE, S.; PARK, K. H.; KWON, H. J.; KIM, S.-Y.; LIM, Y. W. Diversity of fungi associated with roots of *Calanthe* orchid species in Korea. **Journal of Microbiology**, v. 56, p. 49–55 (, 2018). DOI: <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7319-9>.

PEREIRA, M. C.; PEREIRA, O. L.; COSTA, M. D.; ROCHA, R. B.; KASUYA, M. C. M. Diversidade de fungos micorrízicos *Epulorhiza* spp. isolados de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). **Revista Brasileira De de Ciência Do do Solo**, v. 33, n. 5, 2009.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; ROLLEMBERG, C. L.; CHAER, G. M. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 2, p. 191–197, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832005000200004>.

PRIDGEON, Alec M. The velamen and exodermis of orchid roots. **Orchid biology: reviews and perspectives**, v. 4, p. 141-192, 1987.

ROTH-NEBELSICK, A.; HAUBER, F.; KONRAD, W. The velamen radicum of orchids: a special porous structure for water absorption and gas exchange. In: GORB, S.; GORB, E. (eds.). **Functional Surfaces in Biology III**. Biologically-Inspired Systems, v. 10. Cham: Springer, 2017. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-74144-4_5.

STERN, W. L. **2014. Anatomy of the Monocotyledons**. Volume X. Orchidaceae. England: Oxford University Press, 2014.

WANG, T.; CHI, M.; GUO, L.; LIU, D.; YANG, Y.; ZHANG, Y. The diversity of root-associated endophytic fungi from four epiphytic orchids in China. **Diversity**, 2021, v. 13, n. 197, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/d13050197>.

WARCUP, J. H. The mycorrhizal relationships of Australian orchids. **New phytologist**, v. 87, n. 2, p. 371-381, 1981.

ANEXOS

ANEXO I – DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378, email: cpqib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada **"INTERAÇÕES ENTRE MICRORGANISMOS E *Cattleya purpurata*, GERMINAÇÃO SIMBIÓTICA E OUTRAS CONSIDERAÇÕES"**, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.



Documento assinado digitalmente
ELIANA DE MEDEIROS OLIVEIRA
Data: 12/07/2023 10:06:56-0300
CPF: ***.802.158-**
Verifique as assinaturas em <https://w.ufsc.br>

Assinatura: _____
Nome do(a) aluno(a): Eliana de Medeiros Oliveira

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Juliana Lischka Sampaio Mayer

Data: 30 de junho de 2023.

**ANEXO II - DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE AOS DISPOSITIVOS DA LEI Nº
9610/98**

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **INTERAÇÕES ENTRE MICRORGANISMOS E *Cattleya purpurata*, GERMINAÇÃO SIMBIÓTICA E OUTRAS CONSIDERAÇÕES**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30 de junho de 2023.



Documento assinado digitalmente

ELIANA DE MEDEIROS OLIVEIRA

Data: 12/07/2023 10:07:52-0300

CPF: ***.802.158-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Eliana de Medeiros Oliveira**

RG n.º 7704265

Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Juliana Lischka Sampaio Mayer**

RG n.º 6597161-5