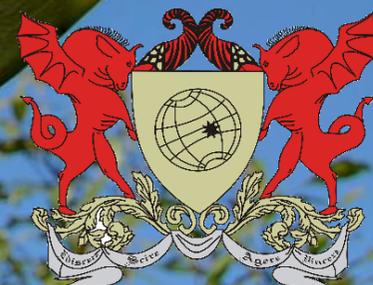


Metodologias utilizadas na pesquisa com micorrizas para conservação de orquídeas

Melissa Faust Bocayuva

Pós-doutoranda em Microbiologia Agrícola
Universidade Federal de Viçosa-MG



Introdução

Biodiversidade da família Orchidaceae

Floresta Atlântica e sua riqueza

Red List de orquídeas

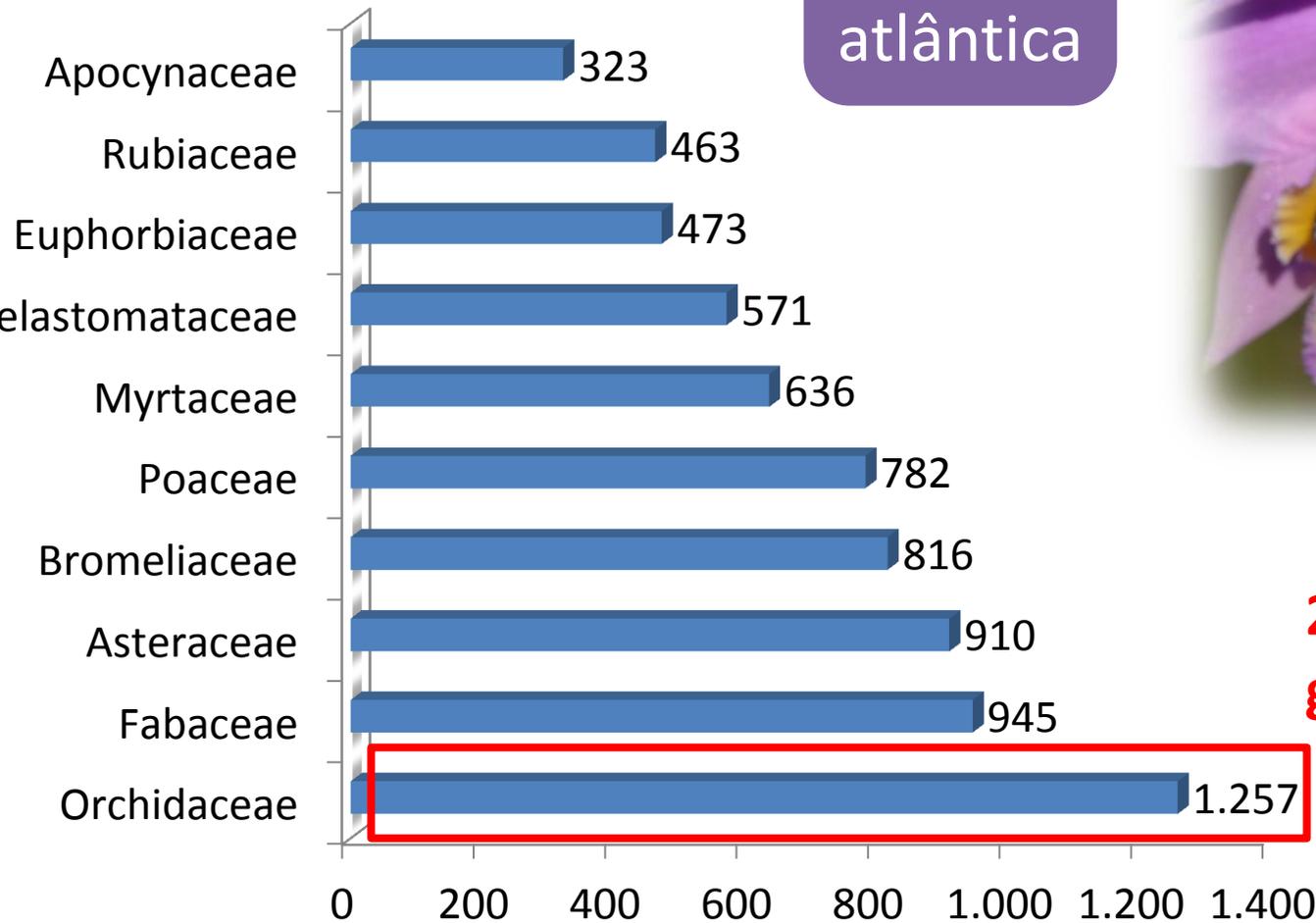
Micorrizas de orquídeas brasileiras

Distribuição de riqueza e de angiospermas no Domínio Atlântico

Riqueza

50 %
floresta
atlântica

Campos
Rupestres
Cadeia do
espinhaço



**2.419 espécies e 235
gêneros (Barros, 2010)**

Stehmann et al., 2009

Red list de orquídeas

MMA 2008 (37)

Plantas raras 2009
(72)

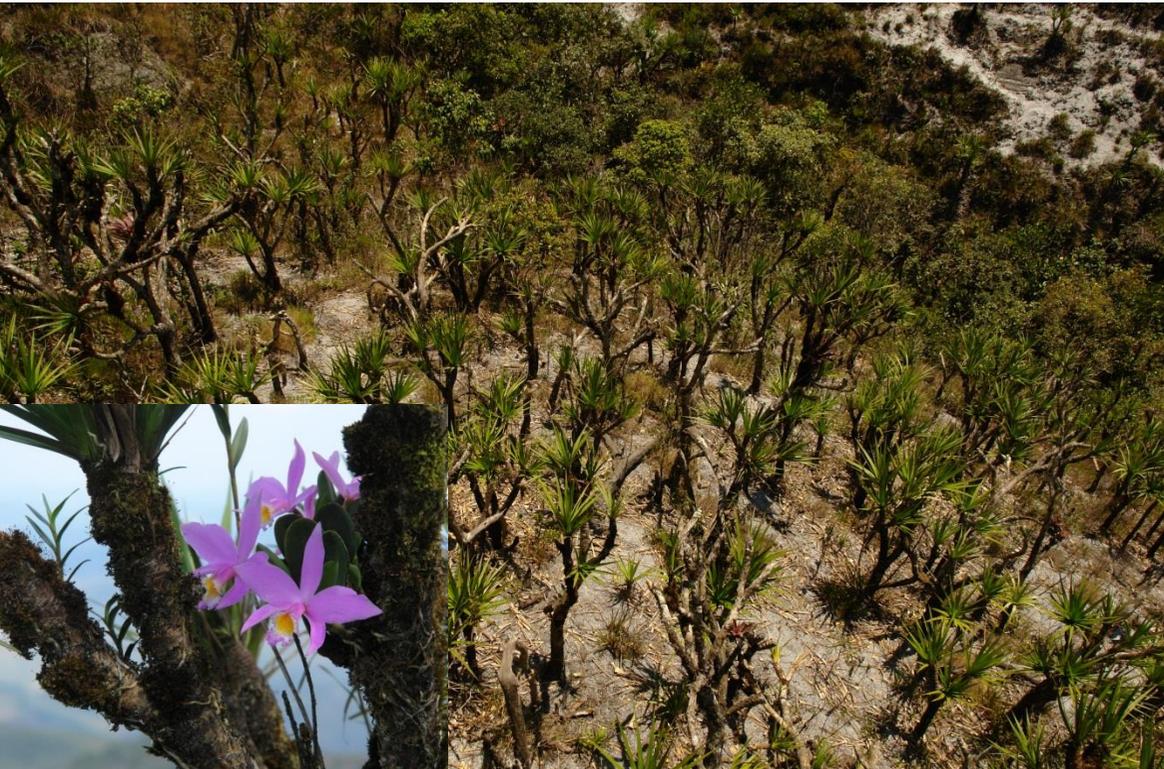
IUCN
América do Sul
(91)

Biodiversitas 2005
(67)

Biodiversitas 2008
(98)

Hadrolaelia jongheana

Parque Estadual da Serra Negra (MG):
campo de Velloziaceae



Parque Estadual da Serra do
Brigadeiro (MG): floresta
estacional semidecidual

***Hoffmannseggella cinnabarina* (Bateman ex Lindl.)**

H.G. Jones



**Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (MG):
campo rupestre de altitude (granito)**

Hoffmannseggella caulescens (Lindl.) H.G. Jones



Mina de Alegria - Mariana (MG):
campo rupestre (canga)

Levantamento de fungos micorrízicos de orquídeas brasileiras, seu respectivos hospedeiros, localidade, hábito e referências (modificado a partir de Pereira et al., 2010).

| Fungos micorrízicos | Hospedeiro | Localidade | Hábito | Referência |
|--|--|---------------------------|------------------|-------------------------------------|
| <i>Ceratorhiza</i> sp. | <i>Prosthechea vespa</i> (Vell.) W.E. Higgins | Ouro Preto, MG | Rupícola | |
| <i>Ceratorhiza</i> sp. | <i>Bifrenaria tyrianthina</i> (Loudon) Rchb.f. | Nova Lima, MG | Rupícola | Nogueira (2004) |
| <i>Epulorhiza</i> sp. | <i>Epidendrum secundum</i> Jacq. | Nova Lima, MG | Rupícola | Nogueira (2004) |
| <i>Ceratorhiza</i> sp. | <i>Oncidium blanchetti</i> Rchb.f. | Ouro Preto, MG | Rupícola | Nogueira (2004) |
| <i>Epulorhiza</i> sp. | <i>Pleurothallis limae</i> Porto & Brade | Ouro Preto, MG | Rupícola | Nogueira (2004) |
| <i>Ceratorhiza</i> sp. | <i>Gomesa crispa</i> (Lindl.) Klotzsch ex Rchb.f. | Carangola, MG | Epífita | Pereira et al. (2005 ^b) |
| <i>Rhizoctonia</i> sp. | <i>Campylocentrum organense</i> (Rchb.f.) Rolfe | Viçosa, MG | Epífita | Pereira et al. (2005 ^b) |
| <i>Ceratorhiza</i> sp. | <i>Bubophyllum</i> sp. | Viçosa, MG | Epífita | Pereira et al. (2005 ^b) |
| <i>Epulorhiza epiphytica</i> | <i>Epidendrum rigidum</i> Jacq. | Pedra do Anta, MG | Epífita | Pereira et al. (2005 ^c) |
| <i>Ceratorhiza</i> sp. | <i>Oncidium flexuosum</i> (Kunth) Lindl. | Viçosa, MG | Epífita | Pereira et al. (2005 ^c) |
| <i>Ceratorhiza</i> sp. | <i>Isochilus lineares</i> (Jacq.) R. Br. | Carangola, MG | Epífita | Pereira et al. (2005 ^c) |
| <i>Ceratorhiza</i> sp. | <i>Maxilaria marginata</i> Fenzl | Carangola, MG | Epífita | Pereira et al. (2005 ^c) |
| <i>Epulorhiza repens</i> | <i>Oceoclades maculata</i> (Lindl.) Lindl. | Viçosa, MG | Terrestre | Pereira et al. (2005 ^c) |
| <i>E. epiphytica</i> | <i>Polystachya concreta</i> (Jacq.) Garay & H.R. Sweet | Pedra do Anta, MG | Epífita | Pereira et al. (2005 ^c) |
| <i>Ceratorhiza</i> sp. | <i>Oncidium varicosum</i> Lindl. and Paxton | Viçosa, MG | Epífita | Pereira et al. (2005 ^c) |
| <i>Ceratorhiza</i> sp. | <i>Bulbophyllum weddelii</i> (Lindl.) Rchb.f. | Nova Lima, MG | Rupícola | Nogueira et al. (2005) |
| <i>Ceratorhiza</i> sp. | <i>Oncidium gracile</i> Lindl. | Nova Lima, MG | Rupícola | Nogueira et al. (2005) |
| <i>Ceratorhiza</i> sp. | <i>Pleurothallis teres</i> Lindl. | Ouro Preto, MG | Rupícola | Nogueira et al. (2005) |
| <i>Epulorhiza</i> sp. | <i>Epidendrum dendrobioides</i> Thunb. | Ouro Preto, MG | Rupícola | Nogueira et al. (2005) |
| <i>Rhizoctonia</i> sp. | <i>Sarcoglottis</i> sp. | Nova Lima, MG | Rupícola | Nogueira et al. (2005) |
| <i>Epulorhiza</i> sp. | <i>Sophronitis milleri</i> (Blumensch. Ex Pabst) C. Berg & M.V | Belo Vale, MG | Rupícola | Nogueira et al. (2005) |
| <i>Rhizoctonia</i> sp. | <i>Maxillaria acicularis</i> Herb. Ex Lindl. | Ouro Preto, MG | Rupícola | Nogueira et al. (2005) |
| <i>Epulorhiza</i> sp. | <i>Zygopetalum makaii</i> Hook. | Araponga, MG | Rupícola | Linhares (2006) |
| <i>Epulorhiza</i> sp. | <i>Epidendrum secundum</i> Jacq. | Araponga, MG | Rupícola | Pereira (2006) |
| <i>Rhizoctonia</i> sp. | <i>Oncidium</i> sp. | Araponga, MG | Rupícola | Kasuya et al. (2007) |
| <i>Epulorhiza</i> sp. | <i>Pleurothallis prolifera</i> Lindl. | Araponga, MG | Rupícola | Kasuya et al. (2007) |
| <i>Epulorhiza</i> sp. | <i>Pleurothallis teres</i> Lindl. | Araponga, MG | Rupícola | Kasuya et al. (2007) |
| <i>Rhizoctonia</i> sp. | <i>Oncidium pirarense</i> Rchb.f. | Araponga, MG | Rupícola | Oliveira et al. (2008) |
| <i>Epulorhiza</i> sp. | <i>Hadrolaelia jongheana</i> (Rchb. f.) Chiron & V.P.Castro | Araponga, Itamarandiba, M | Epífita | Torres et al. (2008) |
| <i>Epulorhiza</i> sp. | <i>Cattleya schilleriana</i> Rchb. f. | Camacan, BA | Epífita | Guimarães et al. (2008) |
| <i>Epulorhiza</i> sp. | <i>Hadrolaelia grandis</i> (Lindl. & Paxton) Chiron & V.P.Cast | Itapebi, BA | Epífita | Guimarães et al. (2008) |
| <i>Epulorhiza</i> sp. | <i>Hadrolaelia perrinii</i> (Lindl.) Chiron & V.P. Castro | Cantagalo, RJ | Rupícola/epífita | Guimarães et al. (2008) |
| <i>Epulorhiza</i> sp. | <i>Hadrolaelia tenebrosa</i> (Rolfe) Chiron & V.P.Castro | Divino São Lourenço, ES | Rupícola | Guimarães et al. (2008) |
| <i>Epulorhiza</i> sp.; <i>Opadorhiza</i> sp. | <i>Epidendrum secundum</i> Jacq. | Araponga, MG | Rupícola | Pereira (2009) |
| <i>Epulorhiza</i> sp. | <i>Hoffmannseggella cinnabarina</i> (Bateman ex Lindl.) H.G | Mariana, MG | Rupícola | Bocayuva et al. (2011) |
| <i>Epulorhiza</i> sp. | <i>Hoffmannseggella caulescens</i> (Lindl.) H.G. Jones | Mariana, MG | Rupícola | Veloso et al. (2012) |

Micorrizas orquídeas brasileiras

Tulasnella



Ceratobasidium



Thanatephorus

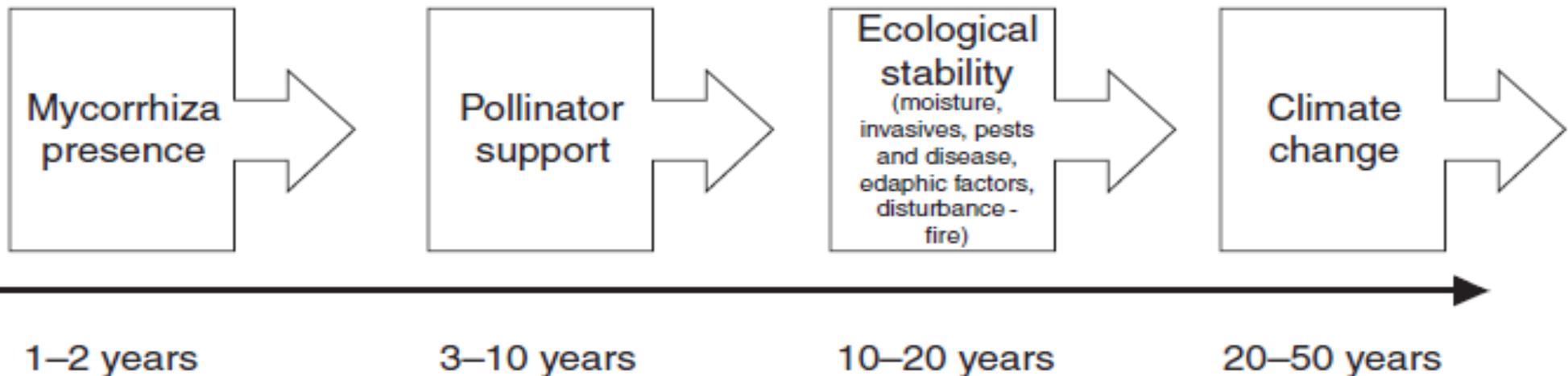


Sebacina

Epífitas
Rupícolas
Terrestres

Importância da micorriza em orquídeas

- Pode estar relacionada a fatores intrínsecos ou extrínsecos .



Desafios

Conhecer a diversidade de fungos micorrízicos associados as orquídeas estudadas

Testar a eficiência dos isolados obtidos na germinação e no desenvolvimento das plântulas

Otimizar a produção in vitro monitorando a micorrização

Elaborar os protocolos de aclimatização e reintrodução

Plano de conservação integrada para orquídeas em risco de extinção

(modificado de Swarts 2009)

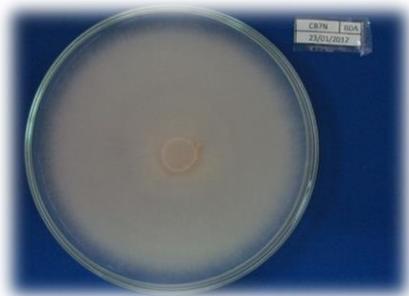
CONSERVAÇÃO *IN SITU*



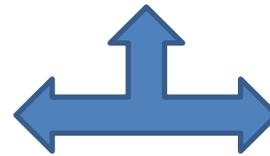
Root baiting



Reintrodução



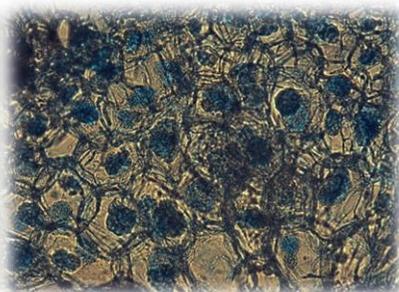
Coleções de fungos micorrízicos



Estudos de diversidade fúngica



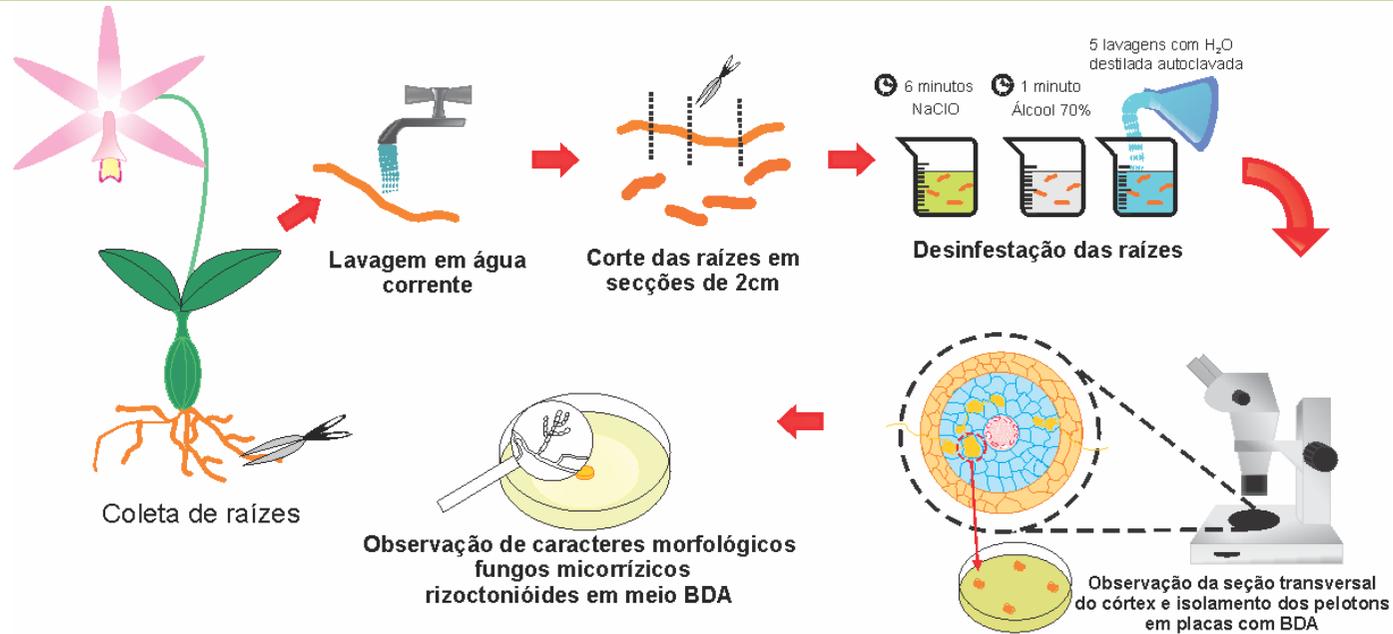
Propagação simbiótica *in vitro*



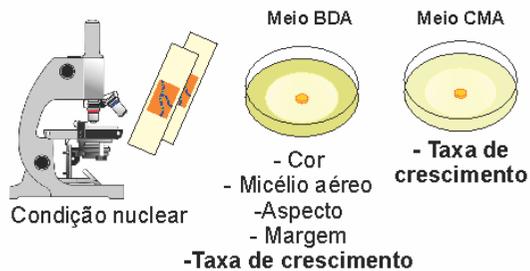
Aclimatização de mudas micorrizadas

CONSERVAÇÃO *EX SITU*

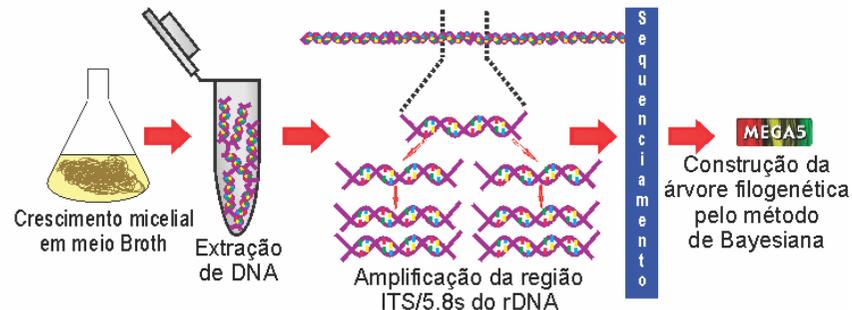
Conhecendo a diversidade de fungos micorrízicos



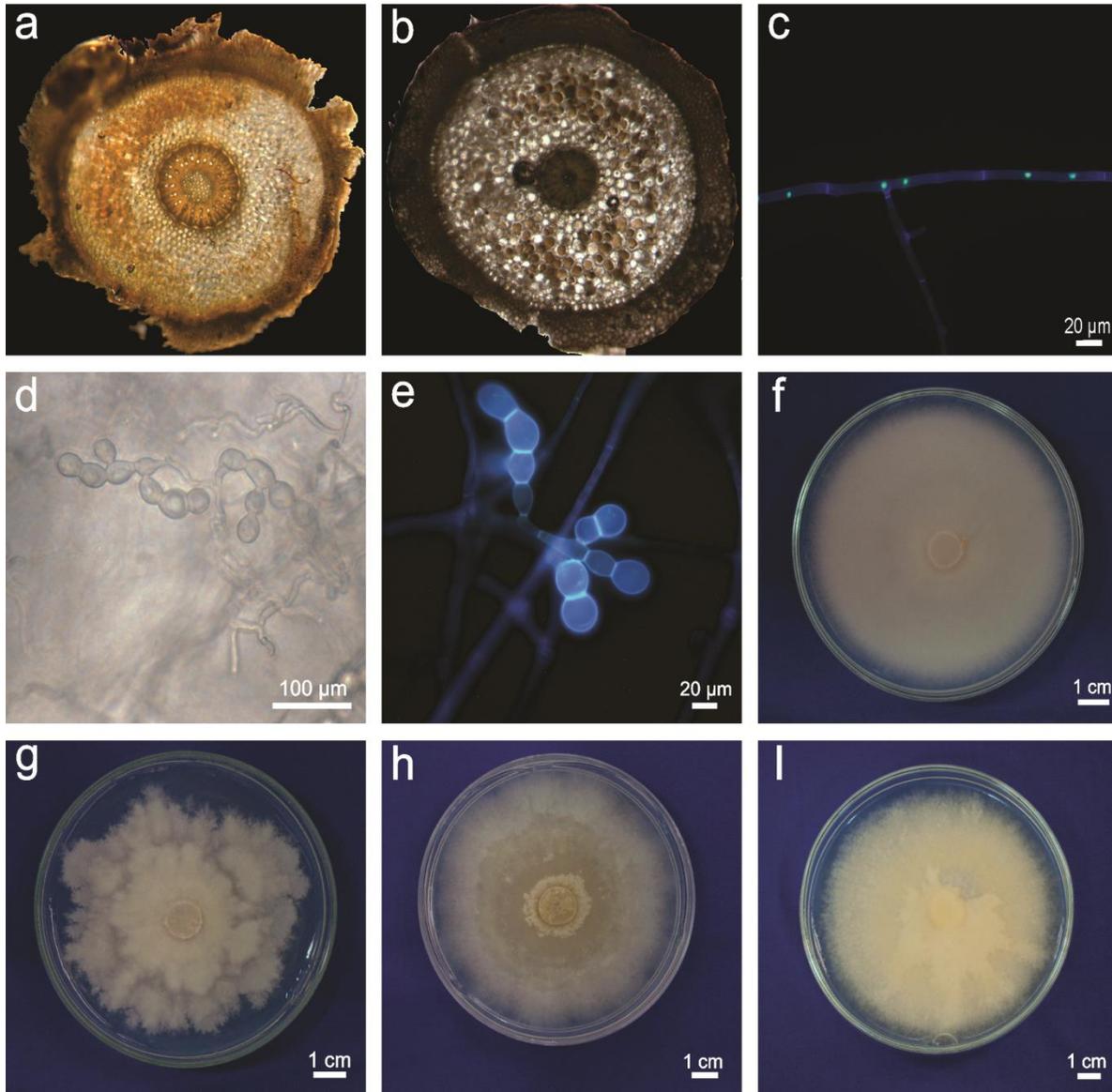
Caracterização morfológica



Caracterização molecular

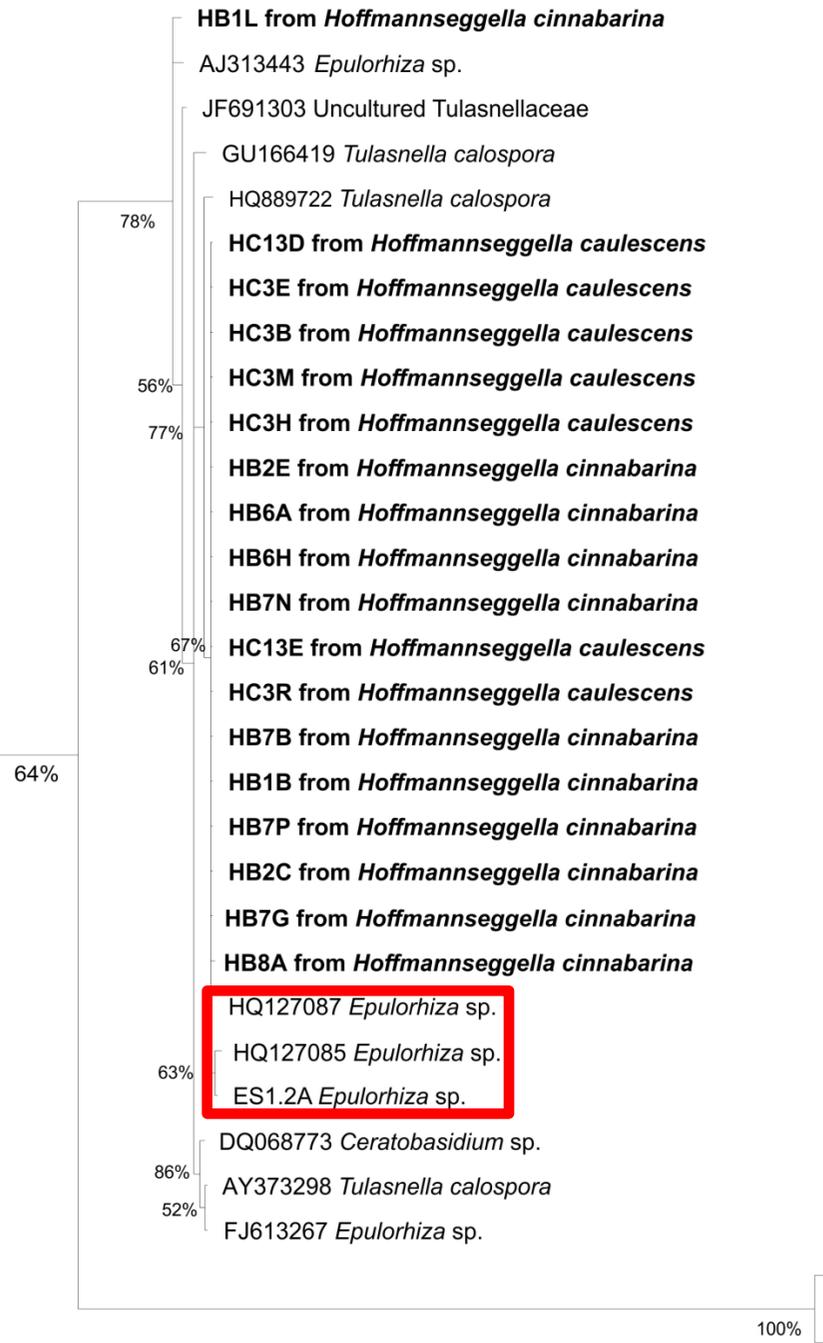


Caracterização morfológica



- Colonização 5-100% das raízes;
- Isolados binucleados;
- Células monilióides globais ou elipsoidais;
- Colônias com coloração branca a creme, margem submersa;

Maior variabilidade de características qualitativas isolados de *H. jongheana*.



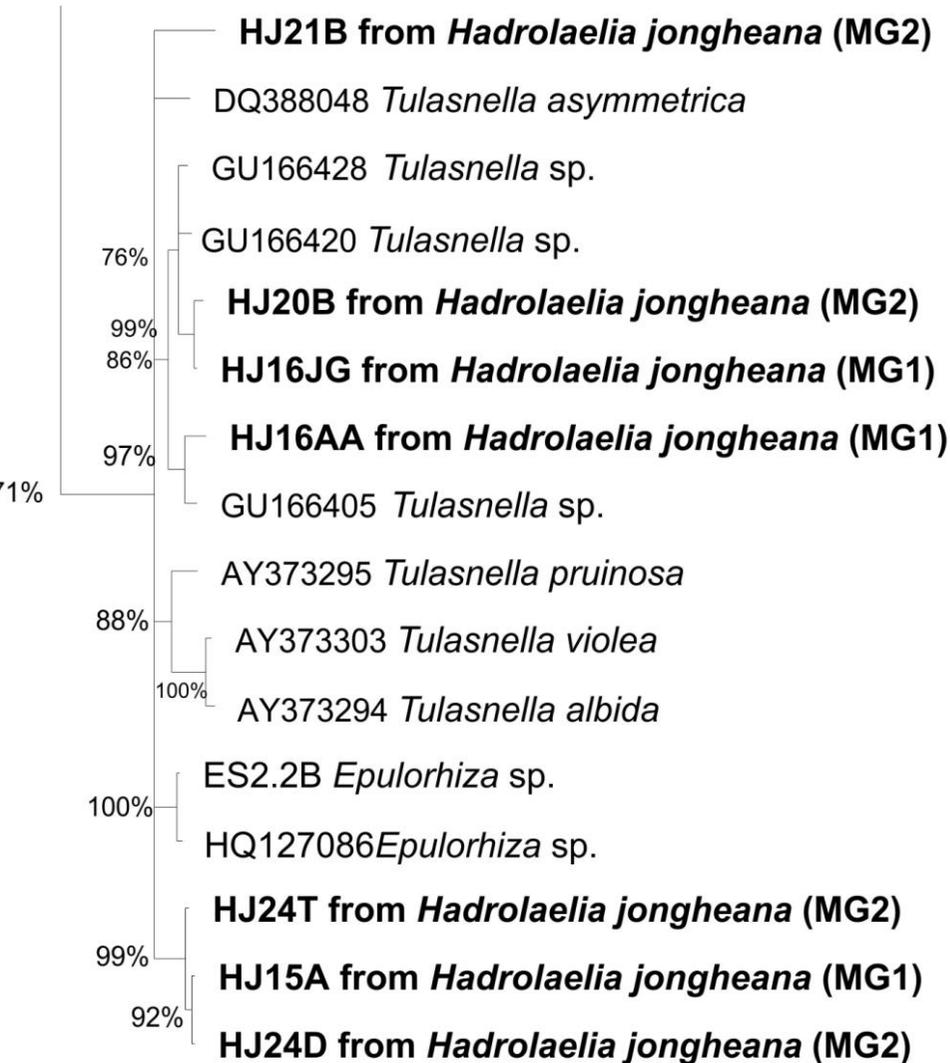
C

- Isolados das espécies rupícolas filogeneticamente relacionados a *Epulorhiza* sp. (teleomorfo *Tulasnella*);
- *Tulasnella calospora*: simbiote universal de orquídeas (Hadley, 1970);

HC3U from *Hoffmannseggella caulescens*
 HC3I from *Hoffmannseggella caulescens*
 HB6B from *Hoffmannseggella cinnabarina*

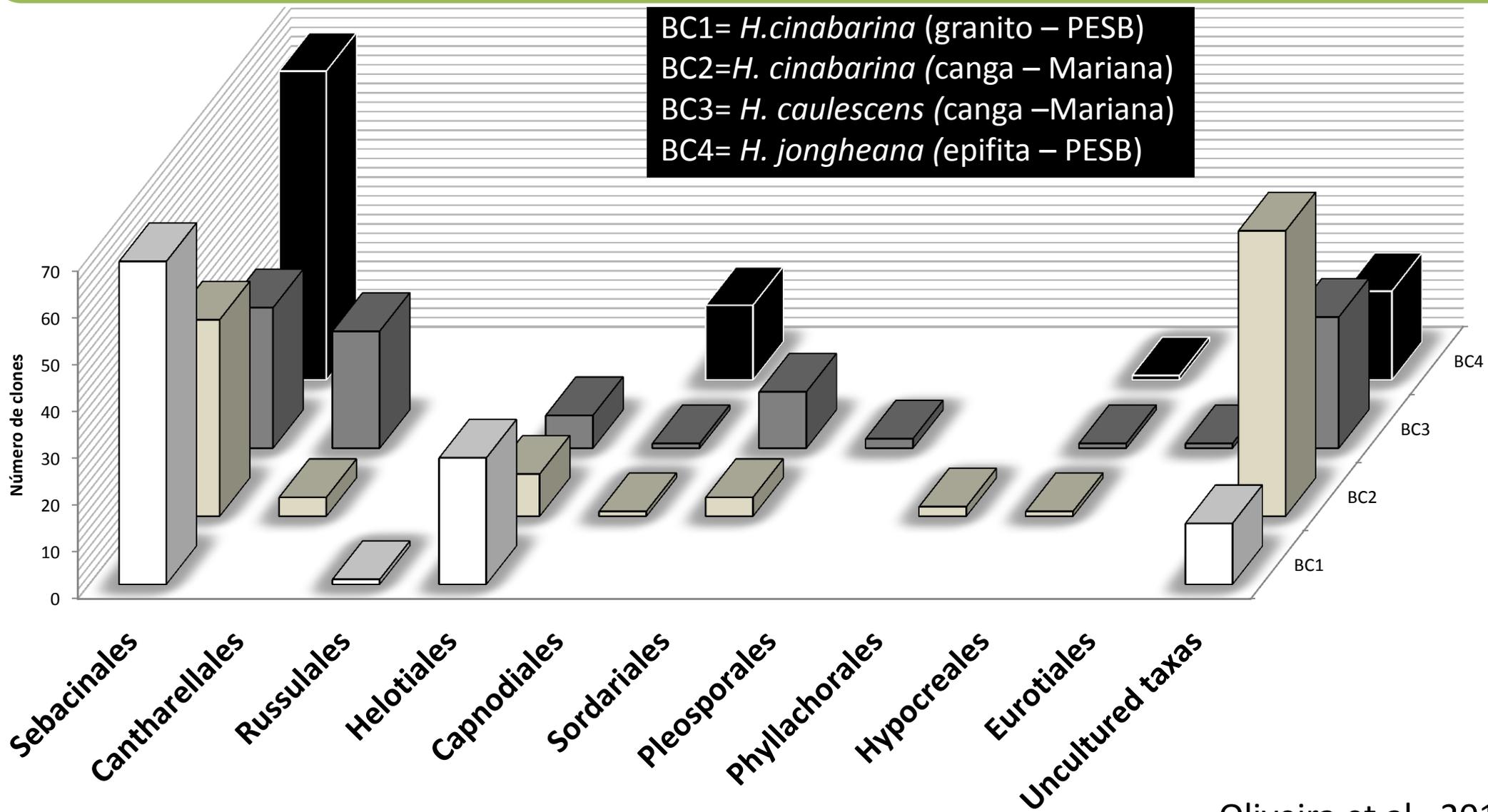
B

Isolados *Hadrolaelia jongheana*

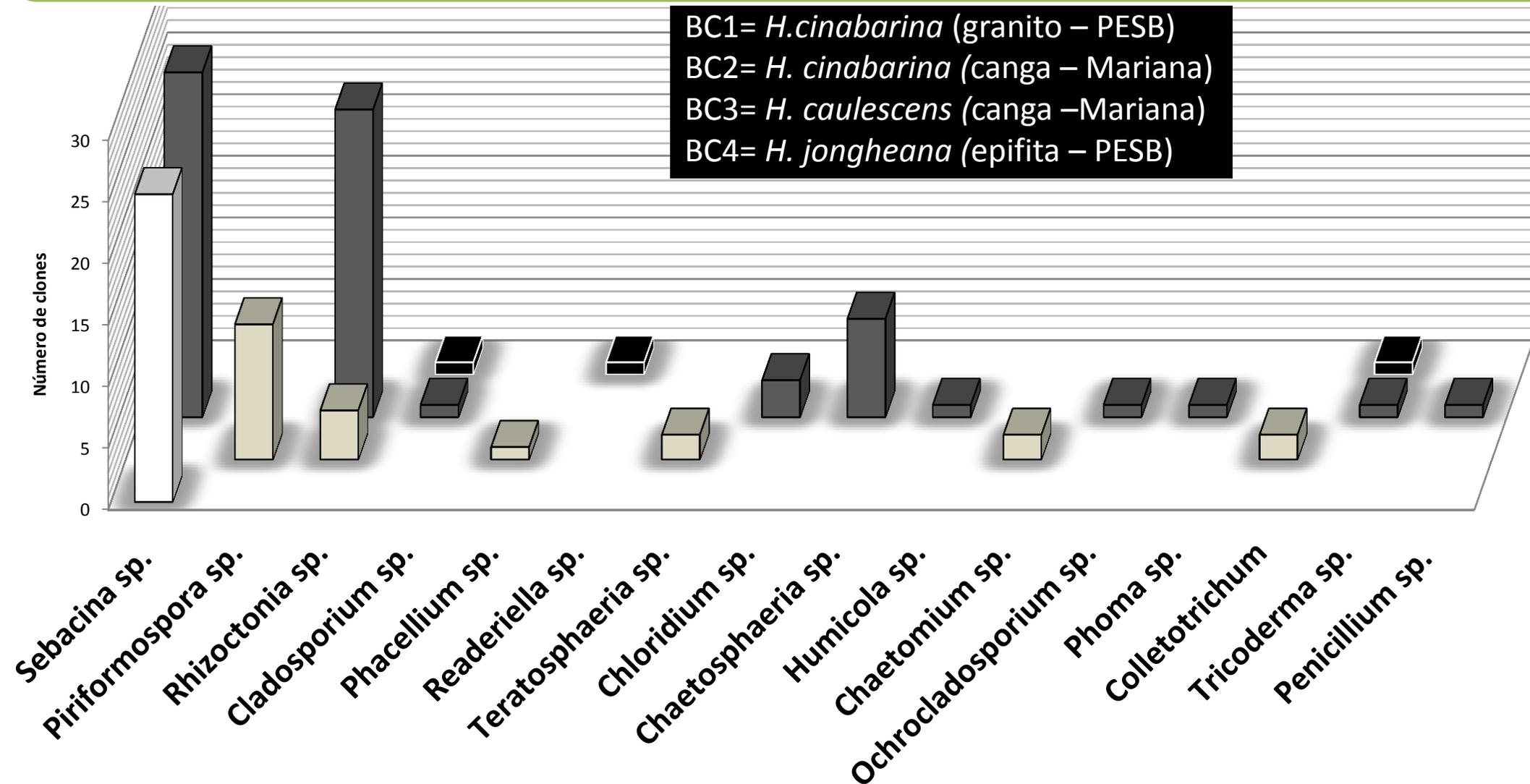


- Maior variabilidade genética que os isolados das espécies rupícolas e podem apresentar uma maior distribuição geográfica;
- As orquídeas tropicais são generalistas quanto a associação micorrízicas, podendo estar inerente ao seu habitat.
- Oliveira et al.(2014): *Tulasnella*, *Thanatephorus* e *Sebacina* através da técnica DNA *in planta*;

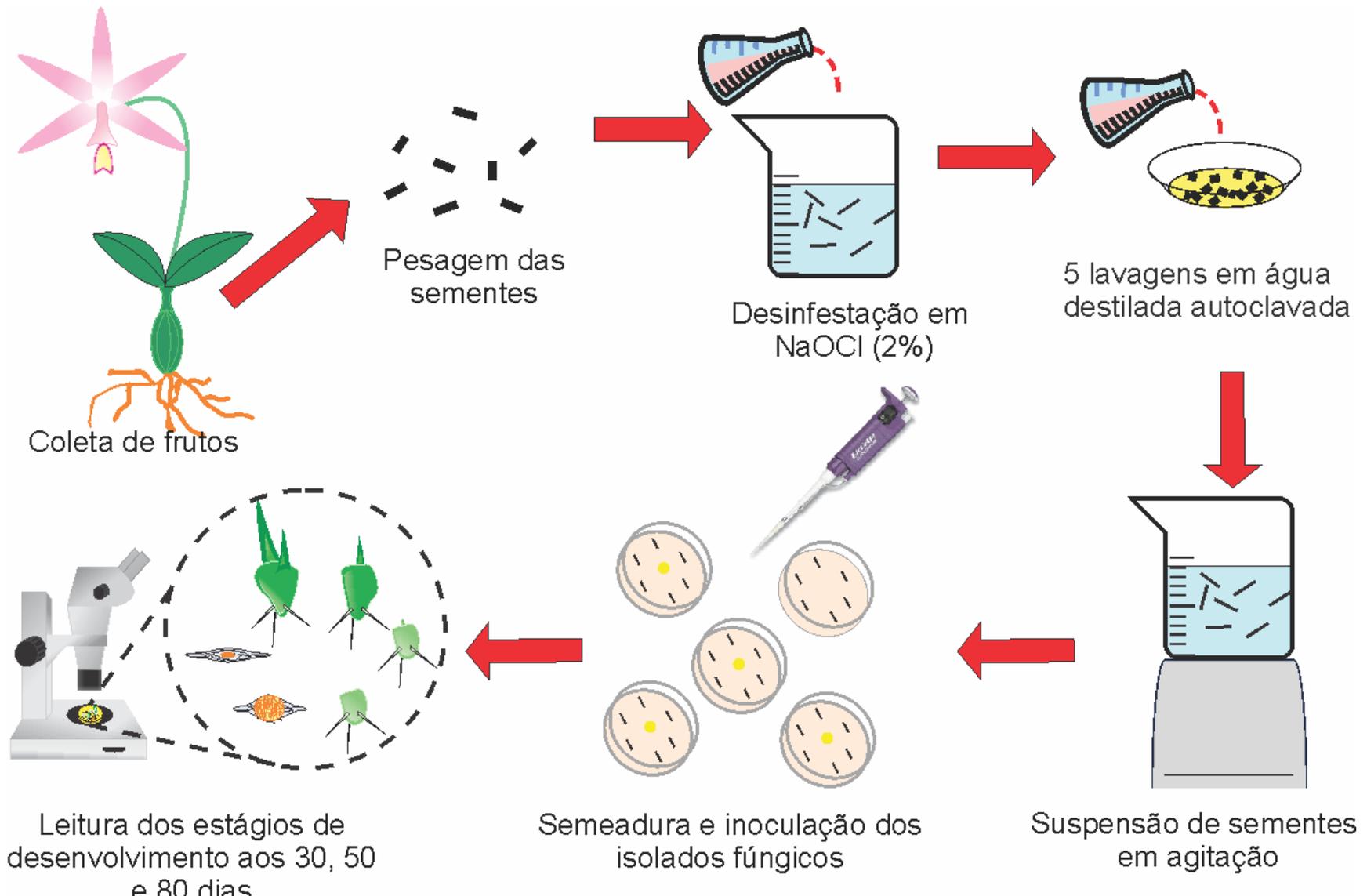
Fungos endofíticos e micorrízicos



Fungos endofíticos e micorrízicos



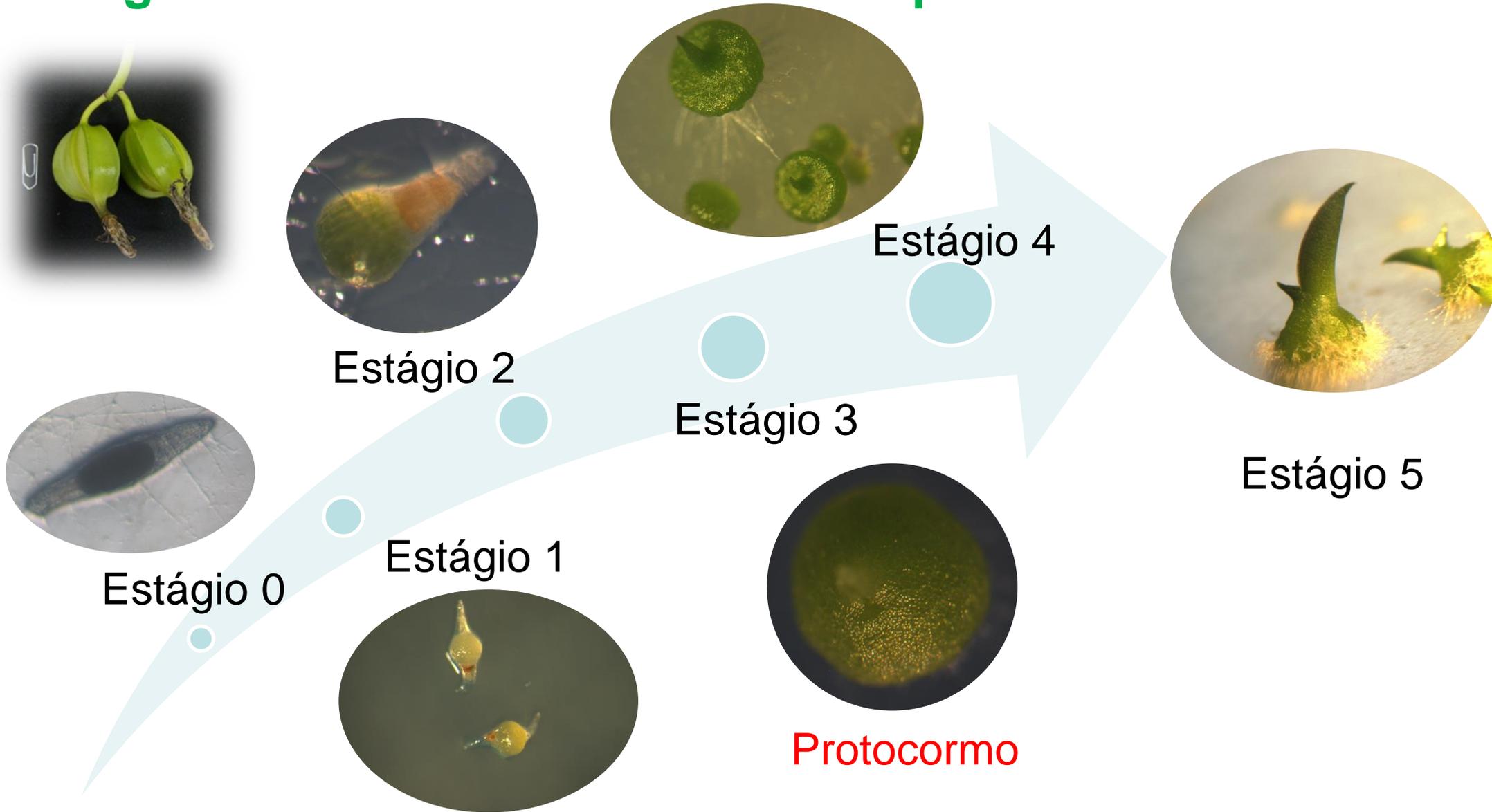
Propagação simbiótica



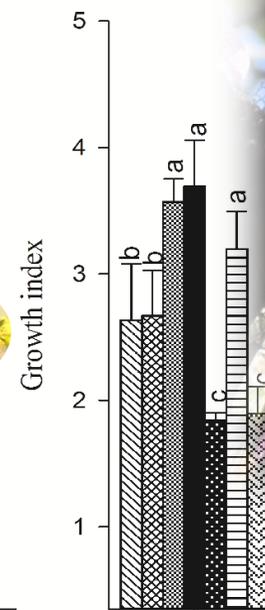
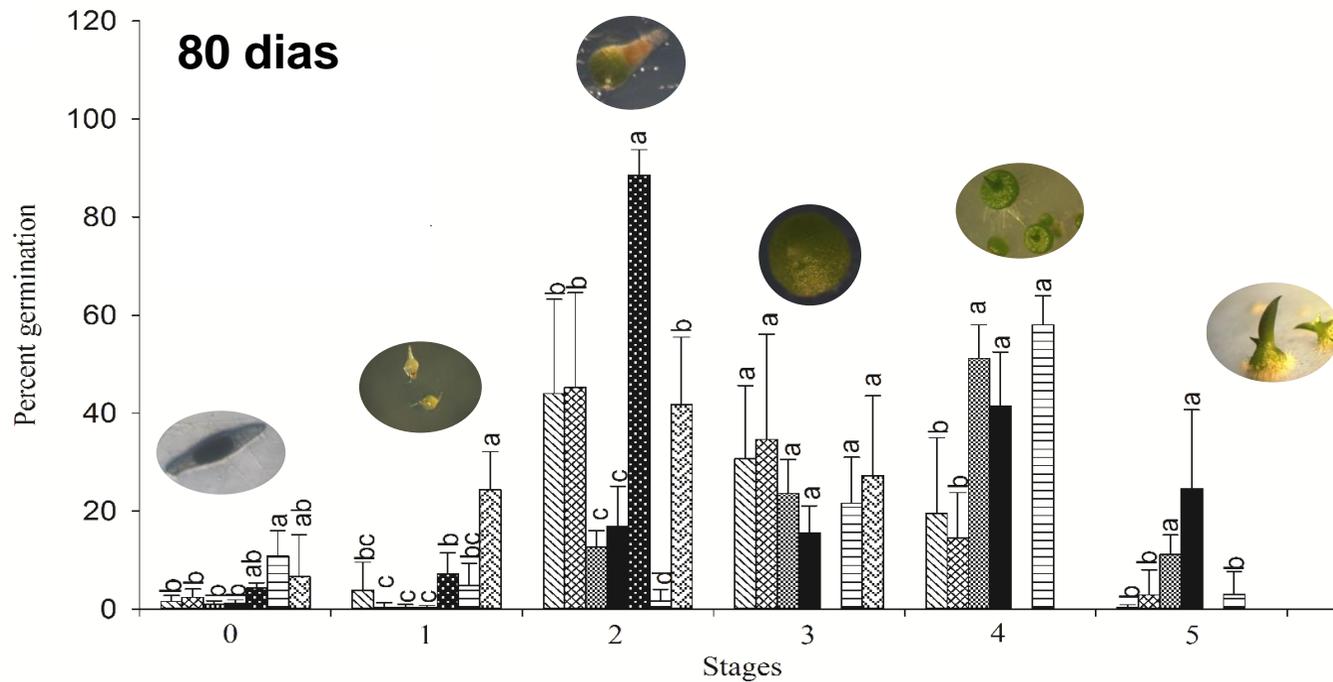
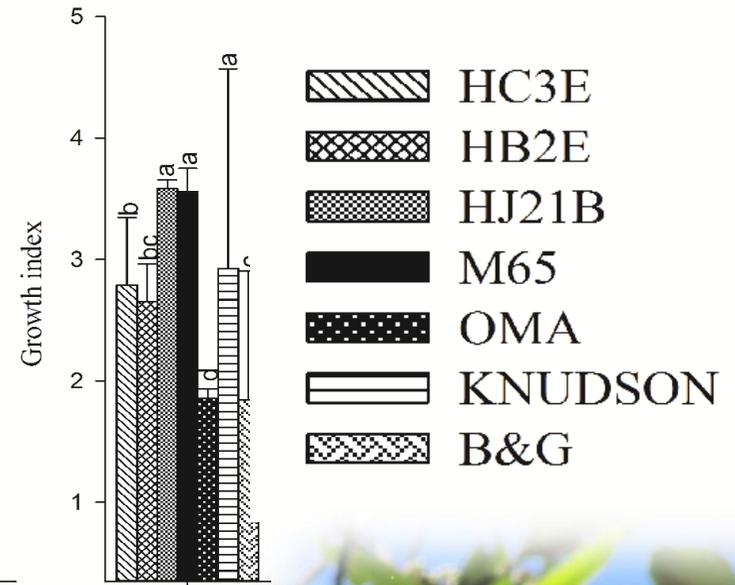
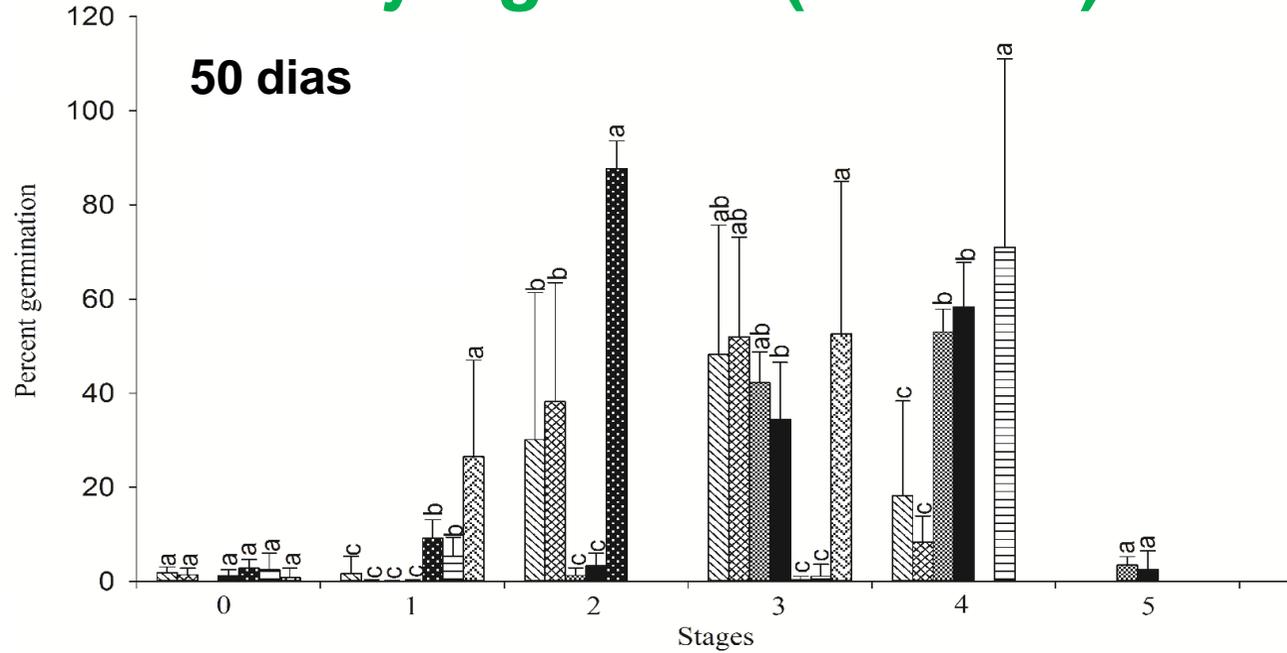
(GI)
growth
Index

Otero et
al (2004)

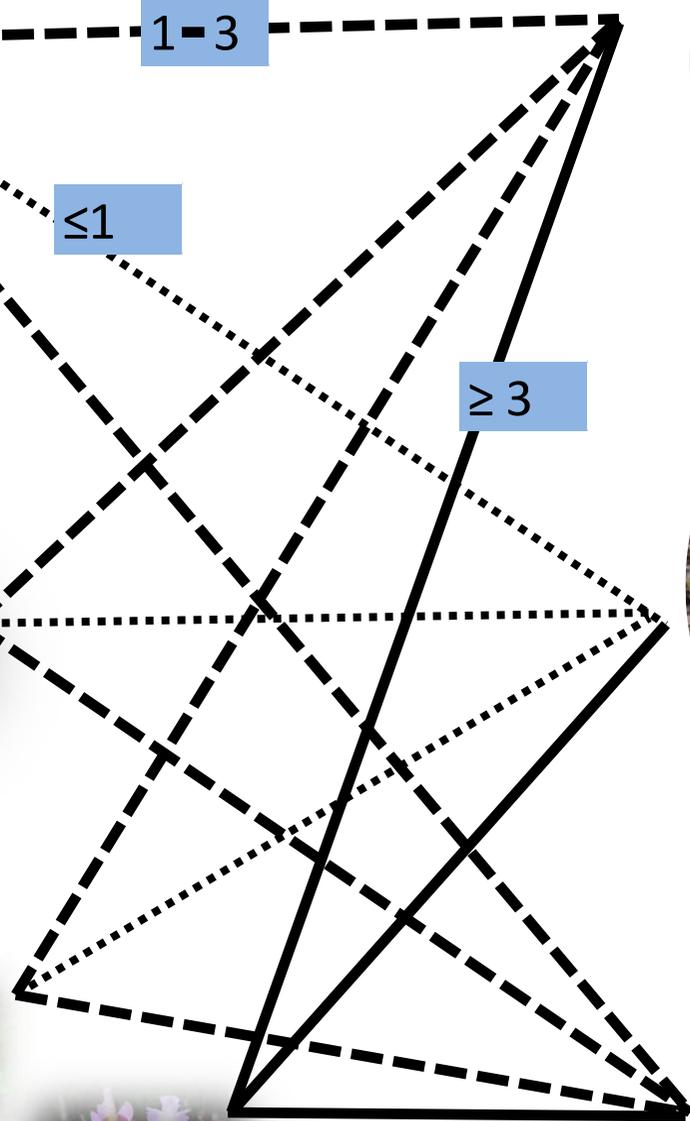
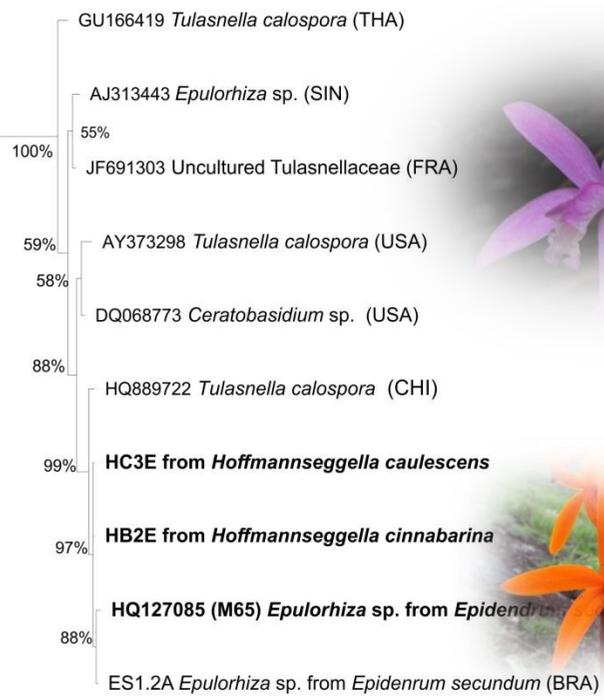
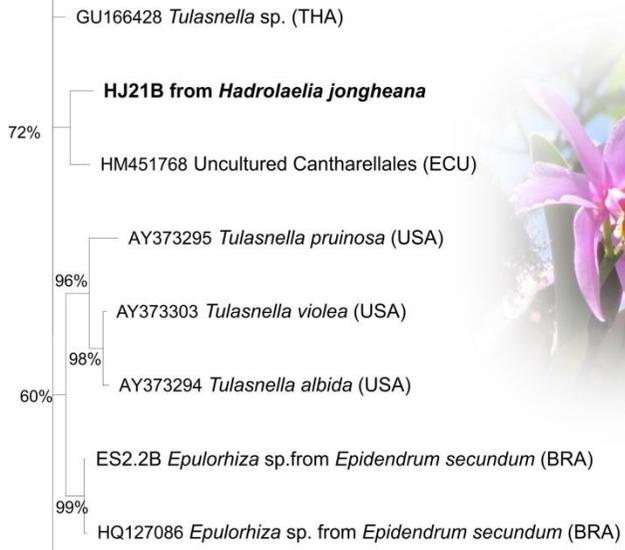
Estágios de desenvolvimento em orquídeas



Hadrolaelia jongheana (Rchb.f.) Chiron & V.P.Castro



*Teste de Duncan



0.1

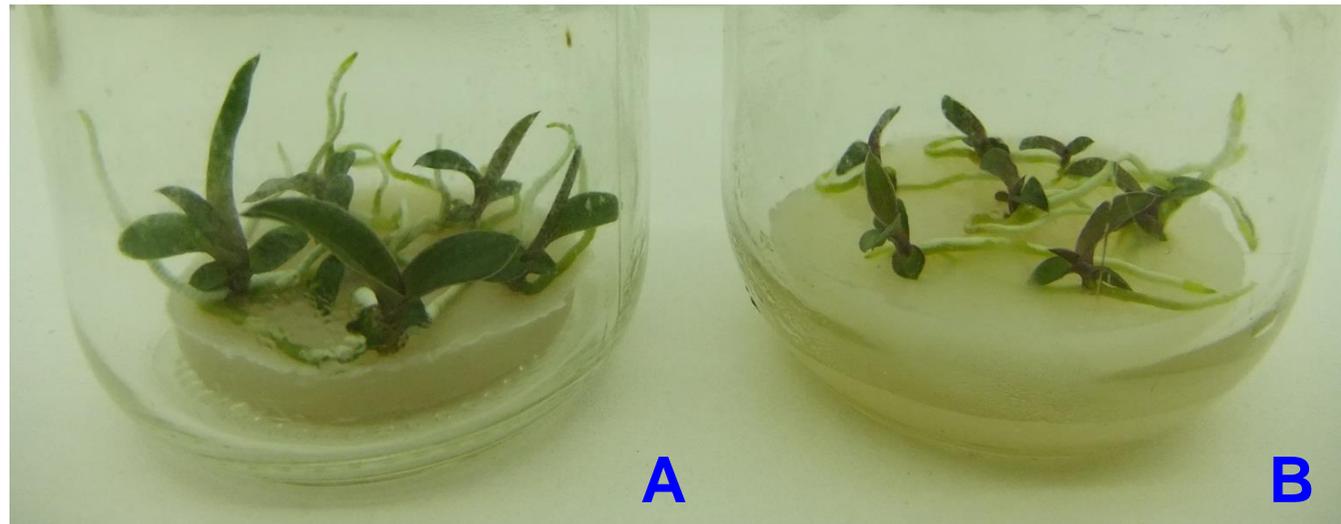
Hoffmannseggella cinnabarina
(Bateman ex Lindl.) H.G. Jones

- Controle, Kundson e B&G em placa
- Tratamento com M65 em frasco

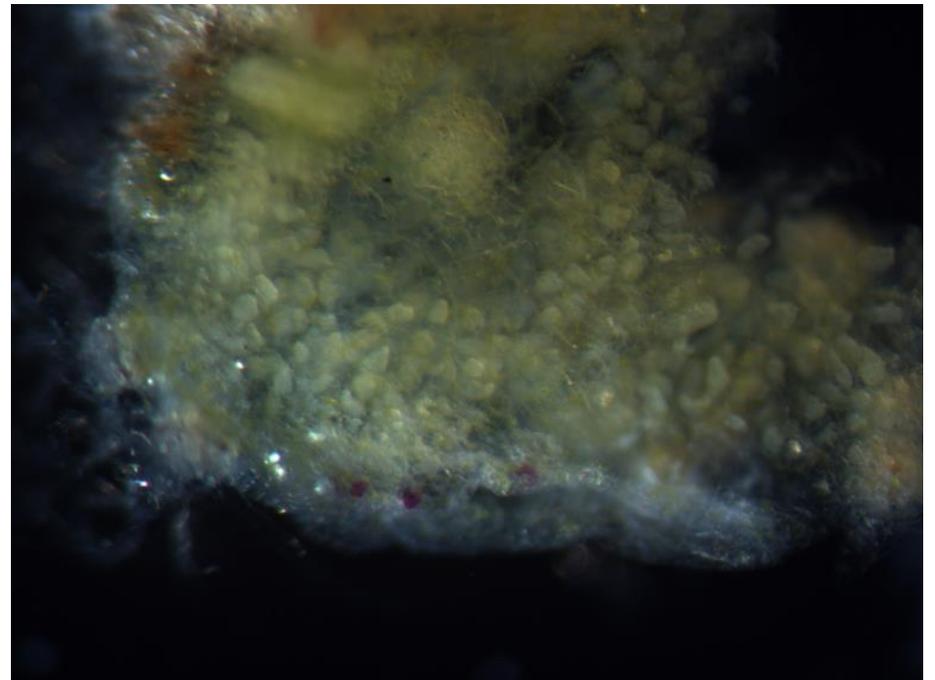
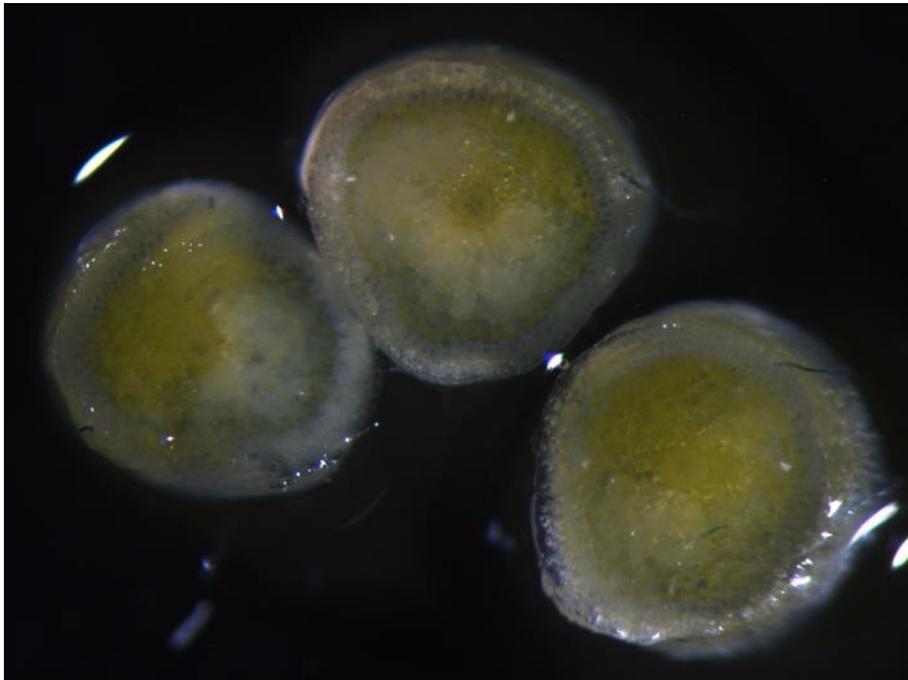


6 meses após germinação

A: Tratamento com M65; B: CC3E



Confirmando a presença de micorrizas



Observação colonização *in vitro*

Micoheteretrofia

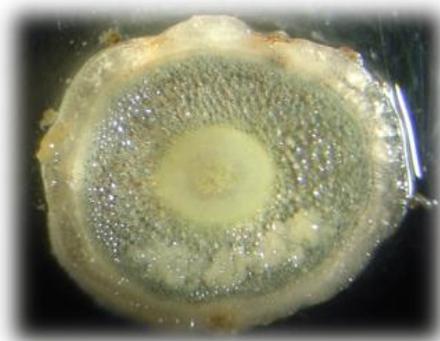
| | P | K | S | Ca | Mg |
|----------|---------------------|------|------|------|------|
| | -----µg/placa ----- | | | | |
| Knudson | 24,2 | 81,1 | 8,77 | 16,9 | 11,8 |
| OMA | 3,04 | 16,3 | 4,63 | 2,72 | 1,41 |
| B&G | 13,7 | 52,1 | 5,38 | 6 | 6,07 |
| OMA+ M65 | 34,6 | 246 | 54,2 | 36,4 | 25,3 |

3) Metabolismo mico-heterotrófico



Adaptado de Selosse et al (2006)

Aclimatização de mudas micorrizadas



➤ Número de folhas

➤ Comprimento maior folha

➤ Frequência/intensidade micorrização

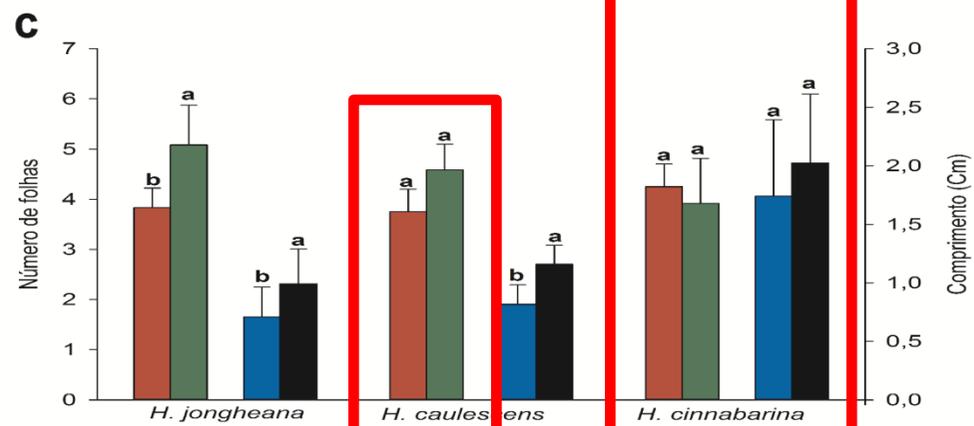
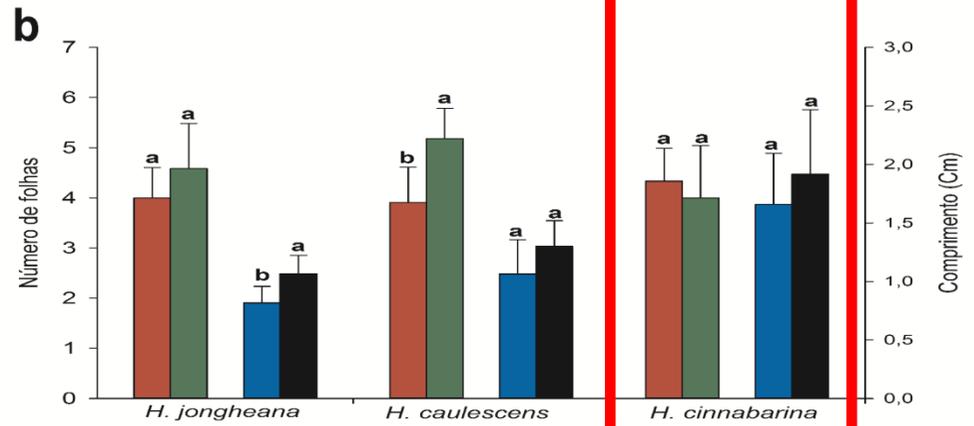
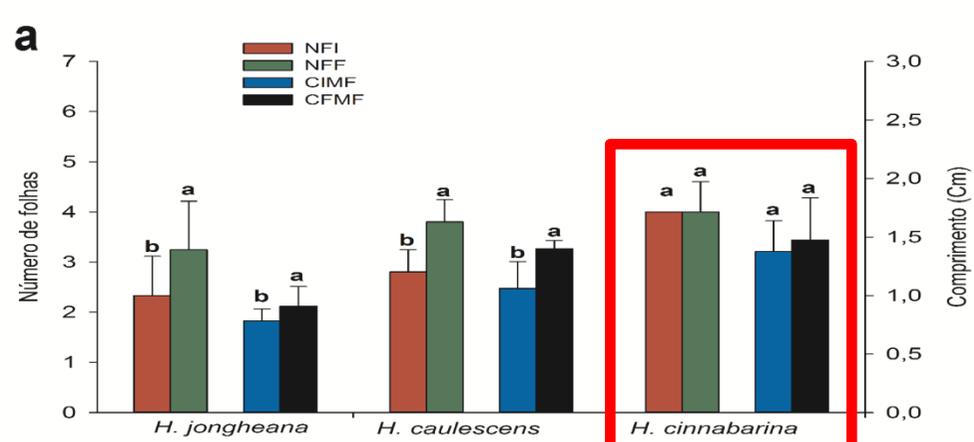
Plântulas
com > 3
meses

Frascos
com
OMA

Aclimatação
> 7 meses

Casca de eucalipto, de pinus e cascalho





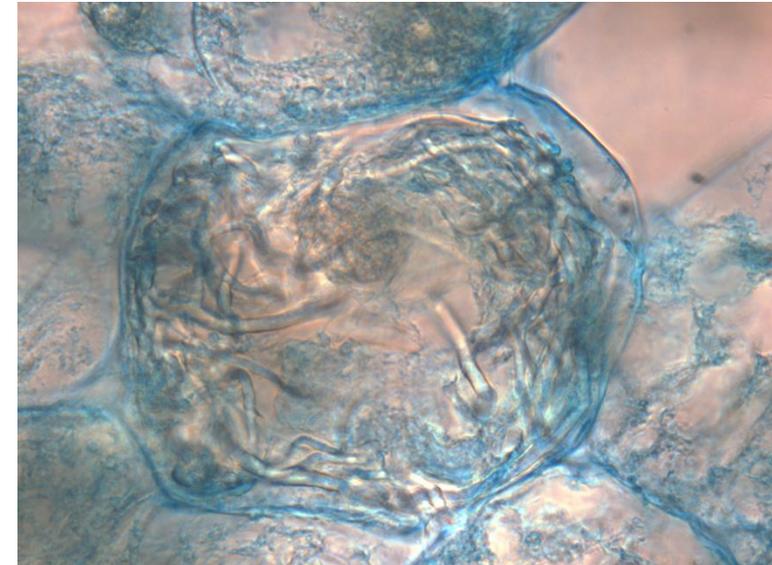
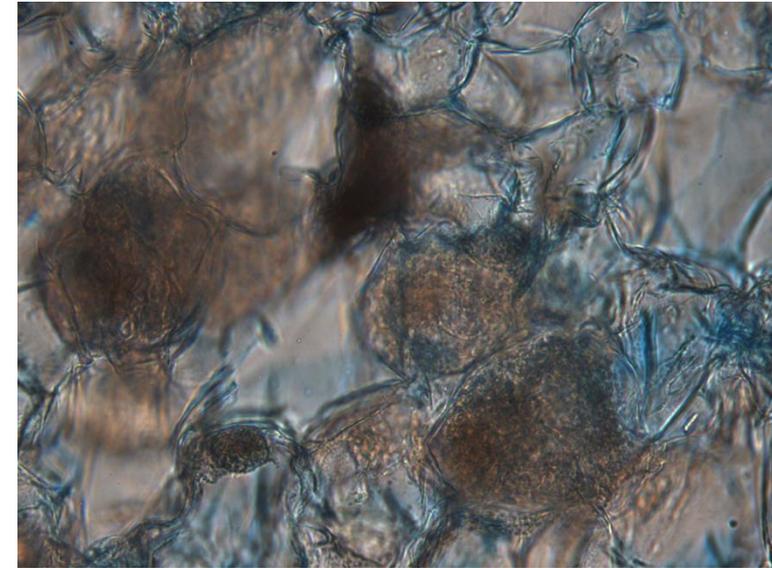
- Diferenças não significativas para todos tratamentos com cerca de sete meses (Teste de Tukey);
- Grandes porcentagens de sobrevivência para todas as espécies nos diferentes tratamentos (40%-100%);
- Grande maioria dos trabalhos de aclimatização de orquídeas com aplicação de solução nutritiva e com medidas iniciais maiores;

Micorrização mudas micorrizadas

➤ Frequência de colonização (F%) e intensidade global da colonização (M%) modificado de Trouvelot *et al.* (1986) e Tisserant *et al.* (1998). :

| | Cascalho | | Eucalipto | | Pinus | |
|-----------------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | F (%) | M (%) | F (%) | M (%) | F (%) | M (%) |
| <i>H. jongheana</i> | 39 | 4,25 | 37 | 1,8 | 34 | 2,49 |
| <i>H. cinnabarina</i> | 50 | 3,53 | 25 | 1,87 | 47 | 3,76 |
| <i>H. caulescens</i> | 9 | 0,42 | 54 | 2,13 | 9 | 1,17 |

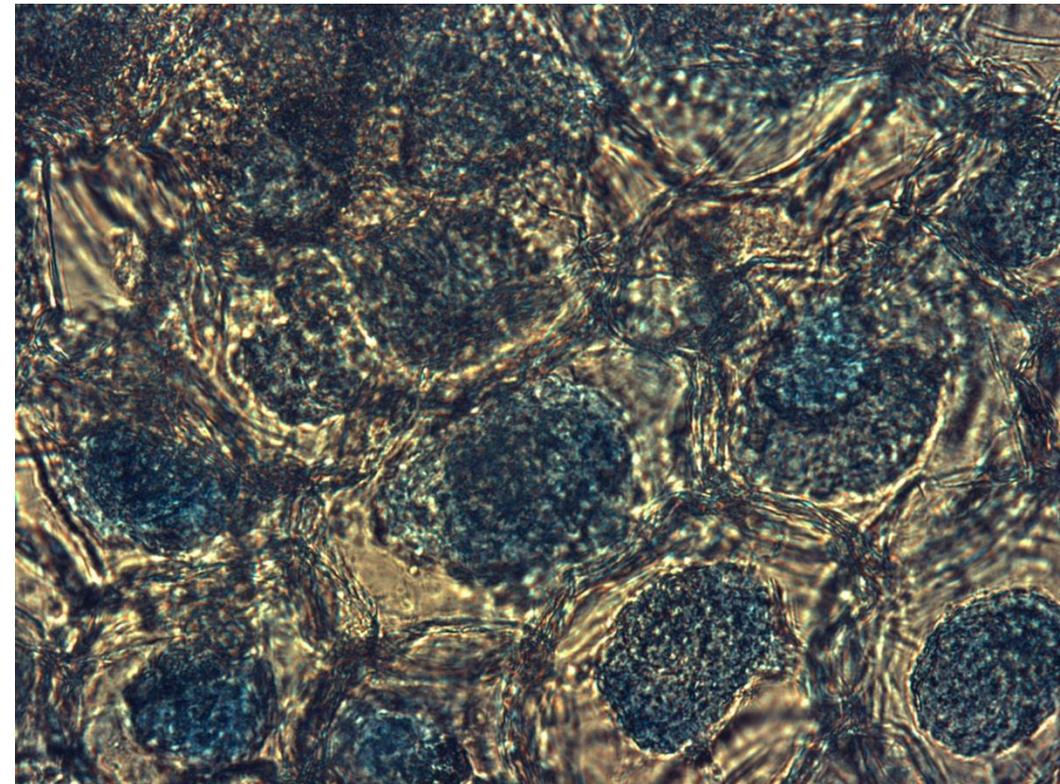
* 5 amostras por tratamento/espécie = 100 cortes



Propagação simbiótica

Segunda etapa

- Otimizar a produção utilizando o meio ágar aveia (OMA) acrescido de carvão ativado e macro e micro nutrientes (OMA+M) (2g/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; KNO_3 ; KCl ; K_2SO_4 ; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; H_3BO_3 ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)



Aclimatização de mudas micorrizadas

Segunda etapa

- Um substrato está sendo adotado: um mix de madeiras, carvão e fibra de coco;
- O plantio está sendo feito diretamente em vasos;



- Plântulas proveniente dos dois tratamentos, OMA + MACRO E MICRONUTRIENTES e OMA.

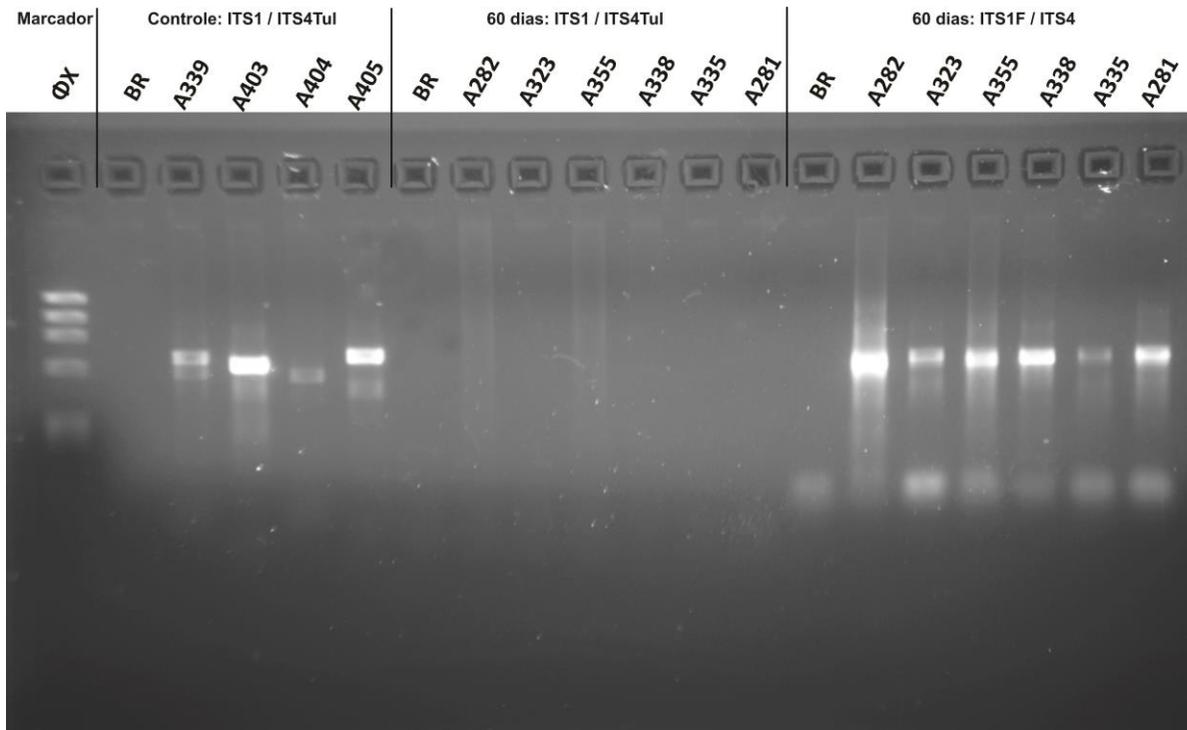
Reintrodução de *Hadrolaelia jongheana*



Rosário da Limeira, MG

- Mudas micorrizadas com dois isolados de *Tulasnella* sp. com cerca de 1 ano reintroduzidas no campo;
- 4 experimentos de reintrodução em diferentes estações (2013-2014);
- Parâmetros avaliados: número de folhas, comprimento maior folha, número de brotos e micorrização;
- Resultados obtidos: taxa de sobrevivência de cerca de 70% e desenvolvimento das mudas observado.

Sucessão fungos micorrízicos *H.jongheana*



Eletroforese em gel agarose 1,5 %.

Método

- Amostras do sistema radicular foram coletadas após 60 dias da reintrodução;
- DNA dessas amostras foram submetidos a PCR com os primers ITS1 e ITS4 Tul para Tulasnellaceae;

Resultados

- 75% apresentaram pelotons, confirmando a micorrização.
- A presença do fungo Tulasnellaceae não foi confirmada, sendo este suplantado por outros fungos na natureza.

Reintrodução de *Hoffmannseggella caulescens*

- Primeiro experimento em Julho de 2014



Fazenda Engenho d'Água, Ouro Preto, MG

Importância da micorriza em orquídeas



Editorial

Mycorrhizas and New Phytologist: une vraie histoire d'amour

Selosse & Martin 2013

'... To fully understand the nature of the symbiosis, it is essential to consider all of the temporal, spatial, and environmental conditions symbiotic partners may experience ...' Bender et al 2014



Commentary

The latest news from biological interactions in orchids: in love, head to toe

Selosse 2014



“orquídeas são... excelentes modelos para investigar a ecologia e a evolução das interações biológicas”

Plano de conservação integrada para orquídeas em risco de extinção

(modificado de Swarts 2009)

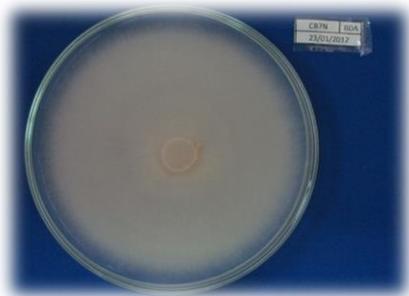
CONSERVAÇÃO *IN SITU*



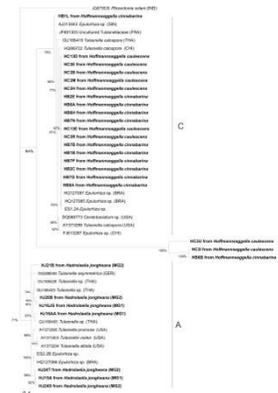
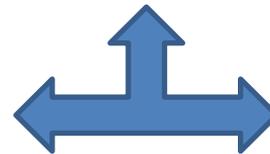
Root baiting



Reintrodução



Coleções de fungos micorrízicos



Estudos de diversidade fúngica



Propagação simbiótica *in vitro*



Aclimatização de mudas micorrizadas

CONSERVAÇÃO *EX SITU*

OBRIGADA !!!

melissabocayuva@hotmail.com

Maria Catarina Megumi Kasuya (DBV-UFV)

Wagner Campos Otoni (DBV-UFV)

Olinto Liparini Pereira (DFP-UFV)

Denise Mara Soares Bazzolli (DMB-UFV)

Marc André Selosse (MHN –Paris- França)

Conrado Augusto Vieira (Doutorando DBV-UFV)

Tomás Gomes Reis Veloso (Mestrando DBV-UFV)

Emiliane F. Silva Freitas (IC Agronomia -UFV)

Jamille De Souza (IC Agronomia -UFV)



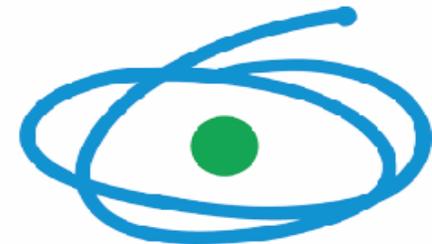
American Orchid Society



Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico



FAPEMIG



CAPES