

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Cattleya warneri concolor*
(ORCHIDACEAE) POR ÁCIDOS HÚMICOS

MARIA ALICE COSTA DA SILVA

VILA VELHA
AGOSTO / 2012

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Cattleya warneri concolor*
(ORCHIDACEAE) POR ÁCIDOS HÚMICOS

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Mestre em Ecologia.

MARIA ALICE COSTA DA SILVA

VILA VELHA
AGOSTO / 2012

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S586c Silva, Maria Alice Costa.

Crescimento de plântulas de *Cattleya warneri concolor* (*Orchidaceae*) por ácidos húmicos / Maria Alice Costa Silva. – 2012.

39 f.: il.

Orientador: Leonardo Barros *Dobbss*.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2012.

Inclui bibliografias.

1. Substâncias húmicas. 2. *Orchidaceae* – efeitos fisiológicos. I. *Dobbss*, Leonardo. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 581.4

MARIA ALICE COSTA DA SILVA

**CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Cattleya warneri concolor*
(ORCHIDACEAE) POR ÁCIDOS HÚMICOS**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Aprovada em 22 de agosto de 2012

Banca Examinadora:



Prof.^a. Dr.^a. Tatiane da Costa Barbé - FAETEC - RJ



Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos - UVV - ES



Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss - UVV - ES

DEDICATÓRIA

A Deus onipotente que me guiou e me deu forças e luz para chegar até
ao fim deste trabalho.

Ao falecido Coronel Otto e a Sr^a. Elva Maria que me deram a vida.

A Mohamed - meu filho, incentivo de construção de vida.

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que estiveram ao meu lado com boas e claras intenções, ações, gestos e palavras e que incondicionalmente me ajudaram a ultrapassar todas as dificuldades que se apresentaram durante o percurso do meu projeto. Meu forte reconhecimento.

Ao professor e coordenador do PPGEE, Sr. Dr. Alessandro Coutinho, por me escutar e atender com atenção, clareza e propriedade a todo o momento durante o período de mestrado.

Ao meu ex-orientador professor Ary Gomes que atuou de maneira fundamental para o entendimento e reavaliação das minhas escolhas. Também colaborou marcadamente para o desenvolvimento da minha autoestima e esclarecimento sobre os novos valores que adotei determinadamente para a efetivação dos meus objetivos finais no PPGEE da Universidade Vila Velha.

Ao orientador professor Dr. Leonardo Dobbss, por me orientar com atenção, disponibilidade e principalmente honestidade. Obrigada por acreditar nos meus esforços e trabalho, me transmitir confiança, tranquilidade e informações preciosas para a efetivação do meu projeto. Eternamente grata.

A professora Dra. Zilma por me ensinar com atenção, paciência, dedicação e carinho. Obrigada por todo apoio dispensado.

Aos professores: Dra. Renata Diniz, Dr. Charles Duca, Dr. Moretti, Dr. Paulo Dias Ferreira Jr, Dr. James Ropper, Dr. Levy Carvalho Gomes e Dra. Adriana Chipari, pela transmissão de informações e conhecimentos diversos.

Renata: as palavras cruas determinam por vezes, a saúde do alimento que nos nutre. Obrigada.

Charles: os embates intensos e contrários também coroam as apreciações que se confirmam no final. Obrigada.

James: My strange Brazilian and French signs of one only personality makes part of my integrity. Thanks for your straight and respectable behaves with me since our first contact.

A FUNADESP pela concessão do concessão de assistente de pesquisa.

Obrigada Sra. Luciana Dantas e Sra. Dra. Daniele de Oliveira Bresciani, pelos momentos de atenção e compreensão dispensados.

A todos os amigos de mestrado, em especial aqueles do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia - LMAB: Juliano Barbirato, Fernanda Pavesi, Rômulo Félix Boldrine, Wolmen Oliveira que contribuíram diretamente com o enriquecimento do meu trabalho.

Aos eternos amigos: Angelo Gonçalves, Antonio Cordeiro, Carlos Roberto Rangel, Eugênio Criste, Giovana de Albuquerque, Juliana Stein, Rita Corsini, pelo apoio e conversas tranquilizadoras nos momentos difíceis.

Ao funcionário Sr. Edson, que sempre me atendeu com atenção, profissionalismo e polidez nas rotinas da secretaria do mestrado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Área de abrangência do Corredor Ecológico ou Corredor Central da Mata Atlântica. A Gazeta Especial (2005), adaptada pelo autor.	7
Figura 2 - <i>Cattleya warneri</i>	12
Figura 3 - A - <i>Cattleya warneri</i> T Moore, semi- Alba, Machado (2008), adapt. pelo autor. B - <i>Cattleya warneri</i> concolor, Moraes (2009), adaptado pelo autor.	13
Figura 4 - Curvas de regressão quadrática para a massa fresca das folhas e raízes (A e B) e massa seca das folhas e raízes (C e D).....	24
Figura 5 - Imagem das plântulas de <i>Cattleya warneri</i> coletadas no final do experimento (imagem da esquerda) e após secas em estufa a 60° C (imagem da direita).	25
Figura 6 - Efeito dos ácidos húmicos (4,16 mM C L ⁻¹) isolados de vermicomposto sobre a massa fresca da parte aérea (A) e massa fresca radicular (B) de plântulas de <i>Cattleya warneri</i> . Os valores representam a média de 20 plantas ± desvio padrão e foram normalizados em relação ao controle (controle=100%). Médias seguidas de letras diferentes nas colunas são estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey (P<0,05).	26
Figura 7 - Efeito dos ácidos húmicos (4,16 mM C L ⁻¹) isolados de vermicomposto sobre a massa seca da parte aérea (A) e massa seca radicular (B) de plântulas de <i>Cattleya warneri</i> . Os valores representam a média de 20 plantas ± desvio padrão e foram normalizados em relação ao controle (controle=100%). Médias seguidas de letras diferentes nas colunas são estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey (P<0,05).	26
Figura 8 - Efeito dos ácidos húmicos (4,16 mM C L ⁻¹) isolados de vermicomposto sobre o número de folhas (A) e raízes (B) de plântulas de <i>Cattleya warneri</i> . Os valores representam a média de 20 plantas ± desvio padrão e foram normalizados em relação ao controle (controle=100%). Médias seguidas de letras diferentes nas colunas são estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey (P<0,05).	27
Figura 9 - A) Medida de pH da solução contendo plântulas de <i>Cattleya warneri</i> após tratamento com a melhor dose de AH obtida no ensaio preliminar de dose resposta (4,16 mM C). B) Extrusão de H ⁺ pela massa seca de raízes de <i>Cattleya warneri</i> após tratamento com a melhor dose de AH obtida no ensaio preliminar de dose resposta.....	29

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Descrição dos tratamentos.....	21
Quadro 2 - Composição elementar (livre de água e cinzas) e relações atômicas das substâncias húmicas estudadas.....	23
Quadro 3 - Modelo de dose-resposta, coeficiente de correlação (R^2), desvio-padrão da regressão (DP), número de unidades que integram a amostra (n), nível de significância da regressão (valor- p) e ponto de inflexão (dose ótima) para a massa fresca das raízes (MFR), massa fresca das folhas (MFF), massa seca das raízes (MSR) e massa seca das folhas (MSF) de plântulas de <i>Cattleya warneri</i> após tratamento com AH.	24

RESUMO

SILVA, M.A.C. CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE ORQUIDEA (*Cattleya warneri* concolor) POR ÁCIDOS HÚMICOS ISOLADOS DE VERMICOMPOSTO. Orientador: Dr. Leonardo Barros Dobbss.

A *Cattleya warneri* (Orchidaceae) é uma epífita ameaçada de extinção com potencial econômico ornamental e bioindicador, que regula a biodiversidade e promove a manutenção das interações biológicas. No presente trabalho, estudou-se o crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya warneri* em diferentes doses de ácidos húmicos isolados de vermicomposto. Para isso, explantes de plantas adultas foram cultivadas durante 90 dias em condições controladas de temperatura e fotoperíodo. A avaliação de mudanças no crescimento promovidas pelos ácidos húmicos foi realizada por meio da contagem do número de folhas e número de raízes, pela obtenção da massa fresca e massa seca das folhas e das raízes e de estimativas da atividade H^+ -ATPase através de medidas da acidez em solução. Os resultados obtidos indicam que o material húmico utilizado oriundo de vermicomposto foi capaz de incrementar o crescimento da espécie estudada. Além de induzirem o aumento do número de raízes e folhas, foram capazes de proporcionar aumentos na massa fresca e seca das folhas e raízes, bem como, estimular a atividade da H^+ -ATPase em relação ao controle. Estabelece-se assim, uma tecnologia inovadora na produção de mudas *Cattleya warneri* tratadas com bioestimulantes a base de substâncias húmicas.

Palavras chaves: Efeitos fisiológicos, bioatividade, substâncias húmicas, *Orchidaceae*.

ABSTRACT

SILVA, M.A.C. FOSTERING GROWTH OF SEEDLING *Cattleya warneri* *concolor* BY HUMIC ACIDS ISOLATED FROM VERMICOMPOST. Advisor: Dr. Leonardo Barros Dobbss.

Cattleya warneri (Orchidaceae) is an epiphyte in endangered extinction situation. It has economic potential as ornamental and bioindicator, and also regulates the biodiversity and promotes the biological interactions maintenance. In this study was observed the *in vitro* growing of *Cattleya warneri* seedlings. The seedlings was exposed to differents concentrations of humic acids isolated from vermicompost. For this, explants of mature plants were grown for 90 days under controlled conditions of temperature and photoperiod. The evaluation of changes in growth promoted by humic acids was performed by counting the number of leaves and number of roots, by measurement of the fresh weight and dry weight of leaves and roots, and by estimation of H⁺-ATPase activity through the measures acid solution. The results indicate that the humic acid was capable to enhance the *Cattleya warneri* plant growth. Beyond increased the number of roots and leaves, humic acids promoted addition in fresh weight and dry weight, and stimulated H⁺-ATPase activity in comparison with the control experiment. Thus there is established an innovative technology for the production of *Cattleya warneri* seedlings that was treated with biostimulants bases on humic substances.

Keywords: Physiological effects, bioactivity, humic substances, *Orchidaceae*.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	vi
AGRADECIMENTOS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO LITERARIA.....	3
2.1 Mata Atlântica	3
2.2 Família Orchidaceae	8
2.3 Orchidaceae no Brasil.....	10
2.4 O gênero Cattleya e a espécie warneri no Espírito Santo.....	13
2.5 A importância da bioatividade da matéria orgânica para os sistemas de produção de orquídeas.....	15
3 HIPOTESE E OBJETIVOS.....	19
3.1 HIPÓTESE:.....	19
3.2 OBJETIVOS:.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS:.....	20
4.1 Obtenção, isolamento e purificação das Substâncias Húmicas	20
4.2 Composição elementar	20
4.3 Bioatividade dos Ácidos Húmicos	20
4.3.1 Ensaio de dose resposta - Crescimento in vitro de plântulas de orquídeas e tratamento com os materiais húmicos.....	20
4.3.2 Medida de acidez em solução possivelmente associada à atividade das SH sobre as H ⁺ -ATPases	21
4.4 Análise Estatística	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23

5.1	Análise elementar e relações atômicas dos ácidos húmicos	23
5.2	Atividade Biológica dos Ácidos Húmicos	23
5.3	Medida da acidez em solução - atividade da H ⁺ -ATPase	27
6	CONCLUSÕES	30
7	REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

A bioestimulação de plântulas de espécies do Bioma Mata Atlântica (Rodrigues & Leitão-Filho, 2000) é fundamental para a reintrodução destas após um início de processo de extinção. A utilização de soluções contendo substâncias húmicas (SH) visando o estímulo ao desenvolvimento vegetal já tem sua eficiência comprovada em diferentes espécies de interesse agrícola (Adani *et al.*, 1998; Busato *et al.*, 2010; Dobbss *et al.*, 2010).

O composto de minhoca (vermicomposto ou húmus de minhoca) condiciona a fertilidade do solo pelo aumento da oferta de nutrientes e da capacidade física do solo (Landgraf *et al.*, 1999). As minhocas aumentam significativamente a velocidade da decomposição dos resíduos orgânicos (Vinceslas-Akpa & Loquet, 1997) e também produzem uma série de substâncias húmicas com atividade biológica elevada (Cacco & Dell'Agnola, 1984; Nardi *et al.*, 1996; Masciandaro *et al.*, 1999; Dell'Agnola & Nardi, 1987; Muscolo and Nardi, 1997; Muscolo *et al.*, 1999; Façanha *et al.*, 2002; Canellas *et al.*, 2002; Quaggiotti *et al.*, 2004; Canellas *et al.*, 2006; Rodda *et al.*, 2006a,b; Zandonadi *et al.*, 2007). Essas substâncias têm atividade parecida com a dos hormônios vegetais e aumentam a absorção de nutrientes e o crescimento vegetal (Vaughan & Ord, 1985; Chen & Aviad, 1990; Nardi *et al.*, 2002). Desde o início do século passado já se conhecia que os ácidos húmicos (AH) podiam apresentar uma atividade de estimulação do crescimento quando usados em concentrações relativamente pequenas (Bottomley, 1917).

O efeito das substâncias húmicas sobre o metabolismo das plantas foi resumido por Nannipieri *et al.* (1993) como resultado (i) da influência positiva sobre o transporte de íons facilitando a absorção; (ii) do aumento da respiração e da velocidade das reações enzimáticas do ciclo de Krebs, resultando em maior produção de ATP; (iii) do aumento no conteúdo de clorofila; (iv) do aumento na velocidade e síntese de ácidos nucleicos; (v) do efeito seletivo sobre a síntese proteica e (vi) do aumento ou inibição da atividade de diversas enzimas.

O papel das substâncias húmicas (SH) na sustentação da vida no planeta origina-se de sua importância na bioquímica do carbono orgânico e relação com a emissão de CO₂ atmosférico, no destino de poluentes e no crescimento vegetal (Piccolo, 1996; Piccolo *et al.* 2004). Cerca de 95% da matéria orgânica (MO)

acumulada na superfície do planeta é constituída de SH (Hayes *et al.*, 2001), as quais não possuem características bioquímicas definidas.

Utilizou-se neste trabalho uma pequena fração solúvel da matéria orgânica oriunda de vermicompostagem (os ácidos húmicos), sobre o estímulo ao crescimento de plântulas de *Cattleya warneri concolor*, visando uma posterior análise de viabilidade da reincorporação desta espécie ao seu habitat natural.

2 REVISÃO LITERARIA

2.1 *Mata Atlântica*

Desde 1500, a história do Brasil e a destruição da Mata Atlântica são explicadas, simultaneamente, pelas consequências resultantes dos interesses exploratórios das riquezas naturais, visadas inicialmente pela coroa portuguesa. Com o desenrolar da colonização, os saques iniciais foram substituídos por ciclos de práticas agrícolas e pecuárias e extrações minerais ao longo dos séculos XVII, XVIII e XIX que, também trouxeram uma relação destrutiva (Mata Atlântica e Biodiversidade, 2005).

Durante o século XX, os diversos modelos adotados pelas ações políticas governamentais para um desenvolvimento econômico e modernizador da agricultura brasileira foi seletivo e excludente, gerando no final extremas desigualdades sociais e um “passivo ambiental” preocupante para as futuras gerações. (Canellas & Santos 2005).

Atualmente no Brasil, as imagens de satélites mostram um ritmo acelerado no crescimento de empreendimentos agropecuários e expansão urbana, além das explorações predatórias ilegais. Tais imagens denunciam a substituição desorganizada e alarmante das áreas de preservação das diversas florestas (Lagos & Muller, 2007).

A mata Atlântica é um bioma presente na maior parte do território brasileiro, abrangendo ainda o território do Paraguai e da Argentina. As florestas atlânticas são ecossistemas que apresentam árvores com folhas largas e perenes.

De acordo com o Decreto Federal 6660/2008, que rege a proteção à vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, lê-se: Art. 1 O mapa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, previsto no art. 2º da Lei nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006 contempla a configuração original das seguintes formações florestais nativas e ecossistemas associados: Floresta Ombrófila Densa e Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual, manguezais, restingas, campos salinos e áreas aluviais, refúgios vegetacionais, áreas de tensão ecológica, brejos interioranos e encaves florestais, áreas de estepes, savana e savana-estépica, vegetações nativas das ilhas costeiras e oceânicas (Decreto Federal, 2008).

A expressão Mata Atlântica, indica simplesmente a proximidade da floresta com o Oceano Atlântico e, segundo a classificação de Köeppen, o clima ao longo de sua área, varia entre tipo tropical (Aw), tropical de altitude (Wa) e subtropical (CF). As temperaturas médias variam entre 14 e 21°C e pode chegar a máxima de aproximadamente 35°C. A pluviosidade média varia entre 1500 a 2000 mm/ano em função da região geográfica e, em particular, do relevo (Mata Atlântica e Biodiversidade, 2005).

A floresta se apresenta como um continuum espacial dotado de formas de relevo apresentando famílias de solos específicos e coberturas vegetacionais extensivas (Ab'Saber, 1984). O solo da Mata é de baixa fertilidade e coberto com espessa biomassa (Lepsch, 2002).

A considerável diversidade ambiental do Bioma pode ser causa da diversidade de espécies e do alto grau de endemismo. Segundo Silva e Castelli (2005) os fatores que explicam parte da extraordinária diversidade de espécie da região são: a importância do eixo de 27 graus de variação latitudinal, os consequentes gradientes altitudinais (nível do mar até 2.700m) e a variação longitudinal.

A biota da Mata Atlântica é extremamente diversificada e abriga uma parte significativa da biodiversidade brasileira. Mesmo com suas extensas áreas ainda pouco conhecidas, do ponto de vista biológico, acredita-se que a região abrigue até 8% da biodiversidade mundial (Silva & Castelli, 2005).

A Mata Atlântica é a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano, que originalmente estendia-se de forma continua ao longo da costa brasileira (Tabarelli *et al*, 2005). Como paisagem foi radicalmente alterada restando cerca de 7% da cobertura inicial (Mata Atlântica e Biodiversidade, 2005). A região abriga um contingente de aproximadamente 70% da população brasileira e o precário equilíbrio da biodiversidade das áreas florestais remanescentes é ameaçado pela manutenção desta população e pelos impactos desta ocupação (Lagos & Muller, 2007). Esses remanescentes florestais são fragmentados e espalhados em uma matriz prejudicial à sobrevivência deles. As destruições dessas florestas implicam principalmente na ruptura de processos ecológicos e evolutivos únicos e perdas das áreas de endemismo com a supressão de linhagens evolutivas singulares que se evidencia pelo grande numero de espécies (Lagos & Muller, 2007).

Apesar de inúmeras leis de proteção já existentes, o bioma encontra-se em grande risco e é considerado um dos “Hot Spot” mundiais, ou seja, área de grande biodiversidade e ameaçada de extinção (Conservation International do Brasil, *et al.* 2000).

Muitas espécies perdem-se sem serem descobertas e conhecidas pela ciência. Em 2005, a Fundação Biodiversitas, por meio de um convênio com o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais- IBAMA e o Ministério do Meio Ambiente- MMA, foi responsável pela revisão da Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção no Brasil. Foram avaliadas 5212 taxas e resultaram na identificação de 1495 espécies ameaçadas de grandes riscos às espécies com ampla distribuição geográfica e, principalmente àquelas de distribuição restrita, muitas vezes endêmica de determinada área (Pereira, 2007).

Investimentos monetários e estudos científicos contínuos e sistematizados são de importância fundamental para que se possa reverter este triste cenário. Faz-se necessário conhecer as particularidades da biodiversidade existentes para que se definam os potenciais ameaçados, trazendo-se respostas e diminuindo-se as lacunas para a proteção e conservação do Bioma. A participação do Brasil, como signatário da Conservação sobre Biodiversidade Biológica - julho 1992, na ocasião da Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento - CUNUMAD, no Rio de Janeiro em 1992- RIO-92 (Goldemberg, 2012) e ratificada pelo Congresso Nacional em fevereiro 1994 fez produzir algumas pesquisas, projetos e programas que já contribuem para o alcance da redução da perda da biodiversidade.

O Espírito Santo tem seu território em meio ao Corredor Central da Mata Atlântica e possui uma área de 45.597 km² que representa cerca de 5% do território brasileiro encravado na faixa litorânea na região sudeste (Machado, 2008). A linha costeira possui 370 km de comprimento (Mota, 1991) e ao adentrar aproximadamente 25 km de terras planas surgem rapidamente as montanhas que podem atingir altitudes superiores a 600 metros (Machado, 2008). A floresta Atlântica não é de formação homogênea e, nesta área é composta por três grupos distintos: as matas de planície litorânea, as matas de encosta e as matas de altitude.

As regiões sul e sudeste, com exceção do Estado do Espírito Santo (Sudeste), predomina a floresta de encosta (Rizzini,1979). Na região nordeste predomina a floresta de terras baixas. O Estado do Espírito Santo abriga uma flora

intermediária entre as duas regiões (Siqueira, 1994) e apresenta um elevado grau de endemismo observado em alguns grupos vegetais. Ademais, constata-se uma elevada riqueza de espécies e diversidade florística (Tabarelli & Montovani, 1999). Esta megadiversidade é resultado da interação de vários fatores bióticos e abióticos, geográficos, climáticos, altímetros e geomorfológicos.

A Secretaria Estadual do Meio Ambiente do Espírito Santo em parceria com o Ministério do Meio Ambiente (MMA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Hídricos Renováveis (IBAMA), implementou o Projeto Corredores Ecológicos, que tem como objetivo contribuir com a reversão da fragmentação da Mata Atlântica, para a conservação da biodiversidade e promoção do desenvolvimento sustentável (Ayres *et al.*, 2005).

Pelo Decreto lei nº 2529-R (Diário Oficial dos Poderes do Estado do ES, 2010) todo o território do Espírito Santo está incluído na área do Corredor Ecológico ou Corredor Central da Mata Atlântica, inclusive a plataforma continental (**Figura 1**).

Elaboraões de estudos e estratégias para a recuperação e proteção da Mata Atlântica e sua biodiversidade são urgentes e justificados pelos estudos já efetuados pelo Instituto de Pesquisa da Mata Atlântica (IPEMA), na coordenação da elaboração da lista de espécies da fauna e da flora ameaçadas de extinção no Estado do Espírito Santo (Biodiversitas, 2012).

Consciente dos valores essenciais da diversidade biológica além dos valores ecológicos, genéticos, social, econômico, científica, educacional, cultural, recreativo e estético da diversidade biológicas, a Lista de Flora e Fauna Ameaçada de Extinção no Espírito Santo foi declarado no Diário Oficial em 16 de junho de 2005 como Decreto lei nº 1499-R, de 13 de junho de 2005.

A publicação do livro “Flora Ameaçada de Extinção no Espírito Santo” lançado em novembro de 2007 pela Companhia do Vale do Rio Doce (CVRD) e constam 753 espécies de flora ameaçada de extinção (Simonelli & Fraga, 2007).



Figura 1 - Área de abrangência do Corredor Ecológico ou Corredor Central da Mata Atlântica. A Gazeta Especial (2005), adaptada pelo autor.

A necessidade de estudos procura determinar características originárias do ecossistema para poder-se entender as suas funções naturais e econômicas que oferecem benefícios e serviços ambientais inestimáveis (Projetos Corredores Ecológicos, 2005). Tais estudos são determinantes para o conhecimento dos valores dos serviços ambientais proporcionados pela biodiversidade, principalmente àqueles valores oferecidos pelas espécies endêmicas (Simonelli & Fraga, 2007). Da mesma forma, os conhecimentos dos danos ambientais oriundos do antropismo se fazem importantes para o estabelecimento de políticas públicas. Ambos os grupos de informações tornam-se estratégicos se aprofundado conjuntamente e possibilitam incentivar e subsidiar pesquisas e projetos de restauração, preservação ou conservação das espécies vegetais.

Entre tantas famílias ocorrentes na Mata Atlântica, a Orchidaceae é uma das mais diversas e presentes nas Florestas Ombófilas do Espírito Santo (Simonelli & Fraga, 2007), no entanto as espécies são comumente retiradas de seus habitats e são alvo de constante exploração por meio de coletas indiscriminadas (Moraes *et al.*, 2009), justamente pela grande importância econômica no agronegócio florícola mundial e devido a ampla capacidade de combinação genética, beleza e formas de suas flores (Zanenga - Godoy & Costa 2003).

A Família Orchidaceae desempenha papel importante na regulação da biodiversidade e manutenção das interações biológicas (Zampirolo *et al.*, 2011), portanto podem ser consideradas como exemplares refletores das dinâmicas dos processos ecológicos. Estes vegetais podem auxiliar no desenvolvimento de novos modelos produtivos sustentáveis configurados da natureza (Silva *et al.* 2001).

2.2 Família Orchidaceae

Há aproximadamente 4.000 anos, o oriente já cultivava e apreciava orquídeas por sua beleza, formas e cores, além da fragrância. Preparo de bebidas, remédios, cosméticos e alimentação tem sido mencionado desde então. (Araujo, 2004). Atualmente, além do valor ornamental e na culinária (Robert & Dixon, 2008; Chen *et al.*, 2008), as espécies de orquídeas são apreciadas na medicina tradicional, sendo estas utilizações validadas por meio de estudos farmacólogos para a etnobotânica (Barreto & Parente, 2006; Mahendran & Bai, 2009).

No Reino *Plantae*, a Família *Orchidaceae*, esta classificada na divisão *Magnoliophyta*; na Classe das *Liliopsida* e Ordem *Asparagales*. Tal família é cientificamente reconhecida como uma das mais numerosas e diversas no mundo (Silva & Swedeller, 2009). Em 2003, Chase *et al.* citaram a existência de cerca de 800 gêneros e 24.190 espécies espalhadas pelo mundo. Em trabalhos mais recente, Zampirolo *et al.* (2011) mencionaram 35.000 espécies. Existem ainda híbridos naturais e anualmente são registrados híbridos produzidos em laboratórios (Dressler, 1993).

A *Orchidaceae* ocorre em distribuição geográfica irregular desde o norte da Suécia até os países da América do Sul (Storti, 2007). Os exemplares são plantas herbáceas perenes, por vezes trepadeiras ou arbustos apresentando variações quanto ao habitat: terrestres, litofitas, epífitas e raramente aquáticas ou subterrâneas (Waechter, 1992).

O epifitismo é uma associação ecológica onde um vegetal hospedeiro (forofito) disponibiliza apenas suporte mecânico a outra planta (epífita) que o utiliza durante todos os seu ciclo de vida, ou pelo menos parte dele, sem a absorção direta de nutrientes (Giongo & Waechter, 2004).

Abrangendo 70% do numero total de epífitos vasculares típicos de florestas tropicais e subtropicais úmidas, são fortemente influenciadas pelas mudanças de condições ecológicas ao longo do gradiente latitudinal. Na Região

Tropical, esta parte da Família que se adaptou no hábito epifítico, pode ocorrer desde o nível do mar até aproximadamente 4.000 metros de altitude. Seu aparecimento mais numeroso se encontra de 500 a 2000 metros de altitude (Dressler, 1981).

As orquídeas são plantas geralmente autotróficas, excepcionalmente saprófitos (aclorofiladas) ou microfitas, mas nunca parasitas. Trata-se de organismos extremamente especializados que ocupam uma variação de habitat, e para tal, apresentam também um amplo aspecto de adaptações plásticas e ecológicas (Waechter, 1992). Nesse contexto, as comunidades mais ricas em epífitas são encontradas nas florestas tropicais e subtropicais úmidas (Nieder *et al.*, 2000).

Numa comunidade florestal, as epífitas desempenham importante papel na manutenção da diversidade biológica e no equilíbrio interativo (Kersten & Silva, 2001), e são consideradas como organismos biomonitores, podendo ser utilizados para avaliar impactos da poluição atmosférica em ecossistemas, graças a sua capacidade em acumular elementos químicos retirados diretamente da atmosfera (Elias *et al.*, 2006). No entanto, há um reconhecimento crescente de que a sobrevivência e a manutenção de muitas espécies com potencial econômico para exploração comercial e a perda ou redução dos habitats devido à remoção ou fragmentação das florestas são as principais causas das reduções da população de epífitas (Mania & Monteiro, 2010; Unemoto *et al.*, 2007; Colombo *et al.*, 2004).

Diversa análise de resultados de pesquisas científicas sobre as adaptações anatômicas foram obtidas em experimentos *in vitro* e evidenciaram a plasticidade foliar de exemplares epífitos *Orchidaceae*, ao ambiente (Dignar *et al.*, 2009; Unemoto *et al.*, 2007), bem como outras capacidades de alterações quando utilizadas as técnicas de cultura de tecidos (Khan *et al.*, 2002; Serret & Trillas, 2000).

As folhas e raízes das orquídeas podem apresentar estratégias plásticas para adaptações marcantes. Além das funções de fixação e absorção de água com organização relativamente estável, é atribuído também o armazenamento de água e substâncias orgânicas, síntese de hormônio, aeração, assimilação fotossintética, entre outros (Canellas & Santos, 2005).

A presença de abundantes ramificações de raízes é fundamental para o crescimento da planta. Essa atividade do sistema de raízes é essencial para adaptações no Meio Ambiente (Dobbss, 2007). As mudanças na arquitetura e fisiologia da planta afetam a absorção de água e nutrientes (Silva & Dellatorre, 2009;

Hodge, 2004). A especialização de algumas raízes ocorreu, em muitos casos, posterior a adaptação morfológica, como é o caso observado em raízes aéreas (Tissot, 1991), comum aos hábitos epifíticos (Silva *et al.*, 2010; Pita & Menezes, 2007).

Entre tantas adaptações morfológicas e funcionais do epifitismo podem ocorrer a presença de epiderme multisseriada nas raízes, o velame capaz de absorver água e sais minerais com redução da transpiração e uma proteção mecânica (Dressler, 1981; Prindgeon, 1986; Benzig, 1987). Também ocorrem pseudobulbos que armazenam água e auxiliam na manutenção do balanço hídrico da planta em situações de pouca ou não disponibilidade de água (Braga, 1987; 1977). Em espécies que carecem de pseudobulbos, o mesófito aparece possuindo células com espessamento espiralado armazenando água e evitando o colapso do tecido durante o período de dessecação (Scatena & Nunes, 1996)

As adaptações fisiológicas podem ser de comum ocorrência do Metabolismo do Acido das Crassulaceas (CAM), que representam um eficiente mecanismo de economia hídrica (Braga, 1987; Sanders, 1979; Coutinho, 1970).

Devido ao grande numero de espécies torna-se difícil estabelecer características comuns a todas as orquídeas. Na tentativa do agrupamento, Dressler (1993) mostrou características florais e vegetativas usados em estudos anteriores e , desta forma dividiu a Família em cinco subgrupos baseado principalmente no numero e posição da antera: *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Spiranthoideae*, *Orchidoideae* e *Epidendroideae*.

A partir do estudo de Dressler e do advento de estudos moleculares, atuais pesquisas têm tido foco nos relacionamentos evolucionários da Família *Orchidaceae*. Recentes estudos do DNA (Chase et al, 2003) apresentaram outras informações solidas para as classificações das relações existentes entre o grupo de orquídeas. Segundo esta pesquisa, cinco subgrupos, são aceitos: *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Vanilloideae*, *Orchidoideae* e *Epidendroideae*.

2.3 *Orchidaceae* no Brasil

A chegada da Família Real Portuguesa, em 1808 e a abertura dos portos possibilitaram a exploração botânica, no Novo Mundo, trazendo diversos naturalistas, botânicos, desenhistas e pintores, pesquisadores e viajantes que

participaram de expedições por diferentes regiões com o objetivo de coletar informações e materiais diversos, sobretudo àqueles que tivessem valor medicinal e econômico (Perleberg, 2009). Portanto muitos vegetais da flora brasileira desconhecida e novos para a Ciência foram descritos e as suas exsicatas depositadas em herbários na Europa.

Os viajantes que estiveram no Brasil no século 19 podem ser classificados em cinco categorias. A primeira é a dos comerciantes, mineradores e outros homens de negócio. A segunda é a dos nobres, diplomatas, militares e funcionários de governo. A terceira categoria é a dos cientistas, integrantes das inúmeras expedições que percorreram o país nesse período. O quarto grupo é o dos pintores e paisagistas. O quinto e último é composto por aventureiros, curiosos e gente que chegou ao país quase por acaso.

Em cada um desses grupos houveram pessoas envolvidas direta ou indiretamente com as plantas exóticas, entre as mais belas, a Família *Orchidaceae*.

Dentre a categoria de cientistas que percorreram o país no período, os mais famosos botânicos foram o francês St. Hilaire e os bávaros Karl Frienderick Phillip Von Martius e Johann Batista Von Spix. Estudos e retiradas de exemplares eram permitidas para diversos estudos (Gomes, 2007).

Pabst & Dung (1977) citaram algumas renomadas expedições: Van Langsdorf, Friendrich Sellow, August St. Hilaire, Carl Axel Magnus Lindman, Barbosa Rodrigues. Essas expedições proporcionaram estudos e obras literárias de grande valor e importância, ainda hoje, referências para pesquisas científicas.

O mais completo estudo, ricamente ilustrado, sobre orquídeas foi a obra *Flora brasiliensis*, publicada em 1845 por Carl Phillip Von Martius (**Figura 2**), ainda atual fonte de identificação de diversas espécies para epifitólogos e base para estudos taxonômicos da Família (Kersten, 2010).

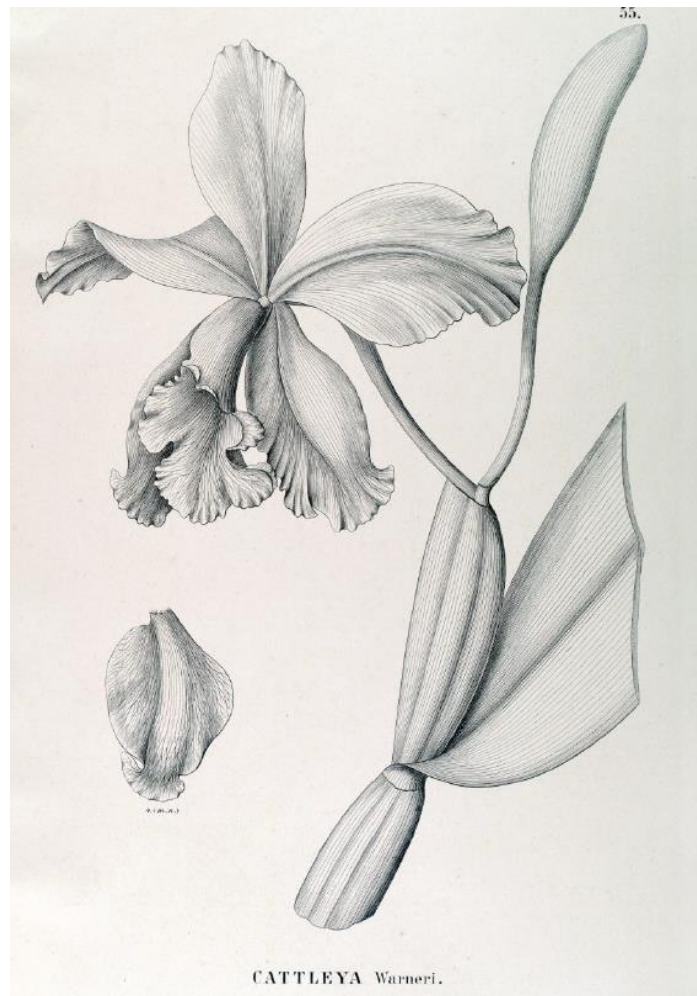


Figura 2 - *Cattleya warneri*

Orchidaceae brasiliensis foi o ultimo grande trabalho publicado no Brasil em 1975 e 1977 por Pabst e Dung, com citação e ilustração de 198 gêneros e cerca de 2.350 espécies brasileiras (Pabst & Dungs, 1975; 1977). Apesar de o Brasil se destacar dentre os países com a maior ocorrência de *Orchidaceae* muitas das pesquisas brasileiras atuais, abordam floras regionais e, sobretudo, na Região Sudeste foram efetuadas em Unidades de Conservação- U.C.

Em 2008, O Instituto Brasileiro Geográfico e Estatístico- IBGE fez 62 levantamentos da flora epífita incluídos nos estudos das epífitas da Mata Atlântica ocorrente no Espírito Santo (Kersten, 2010). Esse trabalho possui valiosas informações sobre quantidade, espécies e localização da flora, que servem como subsídios para estudos mais aprofundados e necessários para o domínio do conhecimento da diversidade e da riqueza da Família *Orchidaceae* e dos serviços ecossistêmicos proporcionados.

2.4 O gênero *Cattleya* e a espécie *warneri* no Espírito Santo.

A *Cattleya* é o gênero mais característico conhecido de toda a Família *Orchidaceae* sem dúvida pelo seu tamanho de flores, beleza de formas e imagem de “rainha das flores”. O nome *Cattleya* é uma homenagem ao horticultor inglês William Cattley, que no século XX, conseguiu que um exemplar da planta produzisse flor na Europa, a *Cattleya labiata* (Chadwick & Arthur, 2006).

O Gênero *Cattleya Lindl* pertence a subfamília *Epidendroideae* (Chase *et al*, 2003) e apresenta aproximadamente 50 espécies distribuídas nos trópicos da América do Sul e Central. O Brasil é o centro da diversidade onde ocorre mais da metade das espécies (Brito & Cribbs, 2005).



Figura 3 - A - *Cattleya warneri* T Moore, semi- Alba, Machado (2008), adapt. pelo autor. B - *Cattleya warneri concolor*, Moraes (2009), adaptado pelo autor.

A orquídea *Cattleya warneri* T. Moore (**Figura 3**) é uma erva epífita que ocorre nos remanescentes de Mata Atlântica do Espírito Santo, Minas Gerais, Norte do Rio de Janeiro e Sul da Bahia, onde as temperaturas variam entre 13° e 30°C (Cruz *et al.*, 2003). A Zona tropical úmida oscila entre 400 e 800 metros de altitude, tem terras acidentadas, fertilidade variada e é a área ideal para o pleno desenvolvimento desta espécie (Machado, 2008).

O conhecimento desta riqueza orquidofila deve-se à Estrada de Ferro Leopodina, Rede Federal, que faz ligação entre Rio de Janeiro e Vitória. O trem passava por muitos locais nas montanhas capixabas ou próximas a estas. Em outubro, época da principal floração da *Cattleya warneri*, os viajantes podiam admirar e comprar estas plantas, que ficavam expostas em arbustos de pomares, xaxins e nos vasos de plantas das janelas das casas. Em pouco tempo, a notícia da existência desses exemplares de grande beleza e cores, chegaram ao Rio de Janeiro e São Paulo e a procura pelas plantas aumentaram. O Porto de Vitória, nas

décadas de 20 e 30, também favoreceu a venda e compra das orquídeas aos tripulantes alemães e italianos, por meio de vendedores mais ou menos estabelecidos (Machado, 2008).

Segundo as pesquisas de Machado (2008), as características da *Cattleya warneri* são os pseudobulbos atarracados que afinam mais bruscamente perto do rizoma, afirmando que o porte mais esparramado pode ficar mais compacto com auxílio de tutores.

Keller (2008) afirma que as *Cattleyas* se dividem em três grupos quanto ao padrão de enraizamento dos pseudobulbos: Grupo A – *Cattleyas* que enraízam o psdeudobulbos antes da floração; Grupo B - *Cattleyas* que enraízam o psdeudobulbos depois da floração; e Grupo C – *Cattleyas* sem padrão de enraizamento do psdeudobilbo. A espécie *warneri* pertence ao Grupo B enraizando os pseudobulbos após a floração e, portanto sofre pressão de seu maior peso neste período. As folhas ovaladas com comprimento superior a largura fazem ângulos com os pseudobulbos. A brotação é em junho e a floração principal é no mês de outubro. A flor pode apresentar a forma labeloide ou trilabelo e pode atingir até 25 cm de diâmetro. A variedade e classificação são apresentadas pela diferenciação da flor, em função do tipo ou padrão, quer quanto ao colorido, às nuances, os desenhos ou falta dos mesmos. Podem ser Albinas (Alba, Pseudo-alba, Albacens, Alba-punctata, Alba-striata, Alba-venos, Amoena, Amesiana, Amestistina), ou Coloridas (Concolor ou Unicolor, Punctata, Striata, Venosa, Marginata, Integra, Pálidas ou Suaves, Orlata).

As orquídeas, no seu ambiente natural, vêm sofrendo grande exploração devido à destruição de seu habitat e ao seu potencial econômico e ornamental. Algumas espécies estão atualmente ameaçadas de extinção (Colombo, 2004).

Inicialmente os cultivadores e comerciantes fizeram tentativas de cruzamento entre espécies (hibridização), com parcela significativa de participação do Espírito Santo quando se diz respeito a espécie *warneri*. Esta espécie é muito utilizada quando o intuito é o aumento do tamanho das flores (Machado, 2008).

Atualmente são desenvolvidas pesquisas de fundo científico, com exemplares de *Cattleyas*, devido ao seu importante papel na regulação da biodiversidade e manutenção das interações biológicas (Waechter, 1992), além de um maior conhecimento e obtenção de subsídios necessários para a sua

manutenção, ajustes fisiológicos nos eventos de alteração da luz e do clima e evitar a sua extinção (Unemoto, 2007; Zampirolo, 2011).

2.5 A importância da bioatividade da matéria orgânica para os sistemas de produção de orquídeas

Magdof (1992) definiu matéria orgânica (MO) em sentido amplo como organismos vivos, resíduos de plantas e animais pouco ou bem decompostos que variam consideravelmente em estabilidade, susceptibilidade ou estágio de alteração. A MO produz muitos benefícios para o solo, melhorando suas propriedades físicas, químicas e biológicas.

Considerando esses aspectos extremamente relevantes relacionados a dinâmica da MO e a função do solo como de sustentação da atividade biológica, diversidade e produtividade, é observada uma elevada correlação entre a matéria orgânica do solo e a sua fertilidade. Segundo Herrick e Wander (1998) a matéria orgânica contribui para a fertilidade servindo de fonte de nutrientes para as plantas, providenciando superfícies de trocas e ainda pela sua capacidade de agir como tampão de pH. Em sistemas com baixa entrada ou os sem uso de fertilizantes o fornecimento de Nitrogênio (N), Fósforo (P), Enxofre (S) e micronutrientes pode ser fortemente dependente da mineralização de tecidos de plantas e animais. A disponibilidade de cátions também é influenciada pela matéria orgânica e sua Capacidade de Troca de Cations (CTC). Além disso, a matéria orgânica influencia a absorção de nutrientes, altera a morfologia das raízes e regula a expressão gênica (Canellas *et al.*, 2002). Ou seja, a sempre citada relação positiva entre matéria orgânica e qualidade do solo é consistente com os mais de cem anos de pesquisa em estações experimentais e com os milhares de anos de observação e experimentação dos agricultores (Herrick & Wander, 1998). Essa relação está baseada na contribuição da matéria orgânica como constituinte do solo na função do solo como meio de crescimento das plantas, regulação e compartimentalização dos fluxos de água e energia e de tampão ambiental (Franzluebbers, 2002).

A quantidade de matéria orgânica não é o único fator que contribui para as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo. A natureza química é importante para Capacidade de Troca de Cátions (CTC), agregação, estabilidade estrutural e persistência dos compostos orgânicos no solo. Após a adição de matéria orgânica ao solo, muitos processos biológicos são ativados envolvendo fauna,

microrganismos e enzimas resultando na estabilização dos compostos orgânicos. Esse processo é genericamente definido como humificação e durante seu curso o conteúdo de compostos facilmente biodegradáveis (como alguns polissacarídeos) diminui enquanto a proporção de lipídeos e compostos de natureza aromática aumenta. A humificação tem sido considerada como um mecanismo complexo envolvendo a quebra de biomacropolímeros até constituintes menores e sua subsequente recombinação até formar (bio)quimicamente geopolímeros complexos (Senesi & Loffredo, 1999).

Alguns trabalhos mais recentes, tais como os de Adani *et al.* (2009) e Papa *et al.* (2010) têm sugerido que os mecanismos de estabilização da matéria orgânica e, por conseguinte, os de humificação, passam mais pela preservação dos biopolímeros em sítios de difícil acesso as exo e endoenzimas do que pela degradação e ressíntese microbiana. Assim, a matéria húmica seria melhor descrita quimicamente como misturas complexas de biopolímeros identificáveis (Kelleher & Simpson, 2006) e o mecanismo de humificação poderia ser entendido como o conjunto de processos químicos, físicos e biológicos que levem a preservação através da organização de biopolímeros de plantas e microrganismos no solo. Nesse contexto, a estabilização dos biomacropolímeros no solo contra a biodegradação se daria pela preservação seletiva devido a *recalcitrância química* e *proteção contra degradação* (Christensen, 1992). A recalcitrância proveniente a natureza química do material é uma propriedade intrínseca da estrutura molecular (como exemplo as longas cadeias alquílicas nos lipídeos e as estruturas aromáticas em compostos aromáticos e fenólicos), mas também devido a formação de ligações entre os biopolímeros (organização entre os constituintes). O domínio hidrofóbico da matéria orgânica formado pelas forças fracas de natureza hidrofóbica que estabilizam as unidades moleculares pode também contribuir com a estabilização da matéria orgânica pela incorporação de novas moléculas e pela exclusão da água dificultando acesso de enzimas de degradação (Piccolo *et al.*, 1999).

Segundo Cordeiro e colaboradores (2010), além de fornecer nutrientes para as plantas através da mineralização, as SH podem estimular diretamente o crescimento e a produtividade das plantas. Os efeitos das SH sobre o desenvolvimento vegetal são dependentes da fonte de obtenção, das doses utilizadas e da espécie da planta estudada (Vaughan & Malcolm, 1985). Nannipieri *et al.* (1993), resumiram os efeitos fisiológicos das SH como resultado: (i) da influência

positiva sobre o transporte de íons facilitando a absorção; (ii) do aumento da respiração e da velocidade das reações enzimáticas do ciclo de Krebs resultando em maior produção de ATP; (iii) do aumento no conteúdo de clorofila; (iv) do aumento na velocidade e síntese de ácidos nucleicos; (v) do efeito seletivo sobre a síntese protéica e (vi) do aumento ou inibição da atividade de diversas enzimas. Atualmente, na literatura, trabalhos evidenciam os benefícios gerados pelas substâncias húmicas e pelas suas frações sobre diferentes cultivares, promovendo tanto efeitos diretos, como indiretos sobre o desenvolvimento vegetal (Dobbss *et al.*, 2007; Canellas *et al.*, 2008).

As substâncias húmicas, assim como suas frações, são capazes de promover incrementos positivos sobre o crescimento das plantas, causando efeitos similares aos dos hormônios vegetais (Dobbss *et al.*, 2007; Canellas *et al.*; 2008). Estudos salientam que as SH aumentam o desenvolvimento das raízes de uma maneira semelhante ao processo promovido pela auxina, (Canellas *et al.*, 2002; Quaggiotti *et al.*, 2004; Nardi *et al.*, 2005), fitormônio intimamente relacionado ao crescimento vegetal (Cordeiro & Souza, 2010).

O processo se dá com a ativação da bomba de prótons (H^+) da plasmalema (Canellas *et al.*, 2002; Quaggiotti *et al.*, 2004), e da bomba de H^+ do vacúolo (Zandonadi *et al.*, 2007) pelas substâncias húmicas. Essas enzimas transmembranares hidrolisam ATP, gerando energia e gradiente eletroquímico, que está intimamente relacionado a dois mecanismos essenciais ao desenvolvimento e crescimento vegetal: a energização de sistemas secundários e translocação de íons fundamentais para a absorção de macro e micronutrientes; e o aumento da plasticidade da parede celular, possibilitando o crescimento vegetal (Rodda *et al.*, 2006).

A ativação das bombas faz aumentar a concentração de H^+ no espaço intracelular, reduzindo o pH apoplástico e aumentando a plasticidade da membrana celular, permitindo o seu alongamento. Este processo é denominado de “crescimento ácido” (Rayle & Cleland, 1992; Hager, 2003; Cordeiro & Souza, 2010), que em raízes tratadas com SH, podem promover maior desenvolvimento, e consequentemente, maior absorção de nutrientes pela planta (Canellas & Santos, 2005).

O estudo da ação direta das SH sobre o metabolismo e o crescimento das plantas tem-se concentrado na fração húmica considerada de menor massa

molecular (Vaughan & Malcolm, 1985) em função do modelo de concepção estrutural das SH (Canellas & Santos, 2005). O fato de uma substância do tamanho dos AH (na ordem de micrômetros) atravessarem poros ou espaços aparentes no apoplasto (na ordem de nanômetros) não era concebido (Cameron *et al.*, 1972). No entanto, baseando-se na concepção emergente do arranjo supraestrutural das SH, compostos de reconhecida capacidade de regulação e estimulação do crescimento vegetal, tais como os hormônios vegetais, podem estar fracamente unidos à supraestrutura das SH e serem liberados para a solução do solo e para a absorção das plantas por uma simples variação de pH na interface das raízes, decorrente por exemplo, da exsudação de ácidos orgânicos, como experimentado por Façanha *et al.* (2002).

3 HIPOTESE E OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESE:

H0: uma pequena fração solúvel da matéria orgânica oriunda de vermicomposto (os ácidos húmicos) promove marcadamente o estímulo ao crescimento de plântulas de *Cattleya warneri*, podendo ser utilizado como bioestimulante vegetal,

H1: Não promove crescimento.

3.2 OBJETIVOS:

Estudar o crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya warnery* em diferentes doses de ácidos húmicos isolados de vermicomposto;

Estabelecer a melhor dose para o crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya warner*;

Avaliar o efeito dos AH sobre a enzima bioindicadora H⁺-ATPase em plântulas de *Cattleya warnery* a partir da proposta de um novo método (medida da acidez em solução).

4 MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 Obtenção, isolamento e purificação das Substâncias Húmicas

As substâncias húmicas foram extraídas e purificadas como relatado em outros trabalhos (Stevenson, 1994; Canellas *et al.*, 2002). Resumidamente, 200 g da amostra de vermicomposto foram secas ao ar e peneiradas (peneira de malha de 2 mm). A extração das SH foi realizada com NaOH 0,5 mol L⁻¹, na razão vermicomposto: solvente de 1:10 (m:v) em atmosfera inerte de N₂. A separação dos ácidos húmicos foi conseguida com o abaixamento do pH da solução até 1,0-1,5 com HCL 6 mol L⁻¹ seguido de centrifugação (5000 g / 20 min). A redissolução e a precipitação foram repetidas três vezes. Em seguida, adicionou-se 200 mL de uma solução de ácido fluorídrico (HF) / clorídrico (HCl) 0,3 mol L⁻¹ submetendo as amostras à agitação durante 8 horas. Após centrifugação (5000 g por 15 min), o precipitado (AH) foi repetidamente lavado (3 a 4 vezes) com água deionizada até teste negativo com AgNO₃, dialisado contra água deionizada utilizando-se membranas com poros de 1000 Da (Thomas Scientific, Inc) e secos por liofilização.

4.2 Composição elementar

A composição elementar dos AH foi obtida após análise em auto-analisador CHN Perkin Elmer (14.800) com amostras de 4 mg de AH em triplicata. O teor de oxigênio foi obtido por diferença e o de cinzas pela incineração de 50 mg dos materiais húmicos por 700° C durante 8 h. 50 mg do AH obtido foi mineralizado com uma solução de HNO₃/HClO₄. Tais soluções foram distribuídas em balões volumétricos de 20 mL, e posteriormente analisadas por espectrometria de absorção atômica (Perkin-Elmer AAS Analyst 700) onde não foram encontrados vestígios de potássio (K) e algumas espécies de metais (Fe, Mn, Cu, Al).

4.3 Bioatividade dos Ácidos Húmicos

Ensaio de dose resposta - Crescimento in vitro de plântulas de orquídeas e tratamento com os materiais húmicos.

O material vegetal utilizado como fonte de explantes foi constituído de plântulas de orquídea (*Cattleya warnery*), medindo aproximadamente 1,0 cm, obtidas por meio da germinação assimbiótica *in vitro*. O meio de cultura básico utilizado foi constituído pelos sais e vitaminas de Knudson modificado, acrescido de

carvão ativado (2,5 g L⁻¹), sacarose (20 g L⁻¹), polpa de banana nanica (150 g L⁻¹) e ágar (6 g L⁻¹). Após a mistura de todos os nutrientes o pH foi ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem a 121 °C e 1 atm, por 20 minutos.

O cultivo foi realizado em frascos de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio de cultura e quatro explantes, sendo os tratamentos descritos no **Quadro 1**. O meio acrescido teve a mesma constituição acima mencionada. A adição das diferentes concentrações de ácidos húmicos (AH) foi realizada com uma seringa graduada estéril e filtro milipore.

Quadro 1 – Descrição dos tratamentos

T0 - cultivo por 90 dias sem adição de ácidos húmicos (controle)
T1 - cultivo por 90 dias com adição de 0,5 mM de C AH aos 15 dias de cultivo
T2 - cultivo por 90 dias com adição de 1,0 mM de C AH aos 15 dias de cultivo
T3 - cultivo por 90 dias com adição de 2,0 mM de C AH aos 15 dias de cultivo
T4 - cultivo por 90 dias com adição de 4,0 mM de C AH aos 15 dias de cultivo
T5 - cultivo por 90 dias com adição de 8,0 mM de C AH aos 15 dias de cultivo

Foi obtida uma curva de resposta para a massa fresca e seca das raízes e folhas, utilizando-se as concentrações de 0, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 e 8,0 mM de C do AH. Após o procedimento da análise de regressão um novo experimento foi montado utilizando-se desta vez a dose ótima de AH obtida pelo ensaio preliminar de dose. As plântulas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 60 μmolm⁻²s⁻¹. Após 90 dias de cultivo, foram avaliadas em todos os tratamentos as seguintes características: número de folhas, número de raízes, massa fresca e massa seca das folhas e das raízes. A massa seca foi obtida pela secagem do material em estufa a 60° C, durante 72 horas.

Medida de acidez em solução possivelmente associada à atividade das SH sobre as H⁺-ATPases

A estimativa da atividade da H⁺-ATPase foi avaliada pela medição de acidez em solução (Dobbss *et al.*, 2008) contendo plântulas de *Cattleya warneri* tratadas com AH. Utilizou-se a melhor dose de AH obtida no ensaio preliminar de dose resposta. Nesse experimento, o meio mínimo (CaCl₂ 2 mM) foi utilizado a fim de evitar qualquer influência dos nutrientes, que poderiam funcionar de maneira

sinérgica com as AH, estimulando o desenvolvimento radicular e o metabolismo das plântulas. As plantas foram submetidas ao tratamento com e sem AH durante 48 horas. Após este período, foram transferidas para um recipiente com 50 mL de uma solução de CaCl_2 2mM a pH 7. A medida da acidez (pH) da solução foi medida com auxílio de um pHmetro durante 150 minutos. As raízes foram digitalizadas e secas em estufa de ar forçado, e a quantidade de H^+ foi expressa em extrusão de H^+ por grama de massa seca de raiz.

4.4 Análise Estatística

Os dados coletados foram analisados com o emprego do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Para todas as características avaliadas, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo cada tratamento representado por cinco repetições.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise elementar e relações atômicas dos ácidos húmicos

A composição elementar e as razões atômicas dos AH isolados de vermicomposto estão listadas no **Quadro 2**. As características elementares são frequentemente utilizadas para relacionar características químicas dos AH com a gênese e/ou propriedades da origem de extração (Stevenson, 1994) e neste trabalho foi usada basicamente para obtenção das doses de AH (em mM de C L⁻¹) que foram utilizadas nos experimentos preliminares de dose resposta.

Quadro 2 - Composição elementar (livre de água e cinzas) e relações atômicas das substâncias húmicas estudadas.

AH	C	H	N	O	C/N	H/C	O/C
	g kg ⁻¹				-----		
VERMICOMPOSTO	446,0	45,1	37,5	471,4	13,88	1,21	0,79

Os valores encontrados no presente trabalho apresentam similaridades com a de outros trabalhos em que a fonte de AH também foi o vermicomposto (Dobbss *et al.*, 2010 e Aguiar *et al.*, 2012). De um modo geral, pode-se observar que o teor de carbono (C) dos AH isolados de vermicomposto é relativamente mais baixo e o de oxigênio (O) é elevado em relação à composição elementar média de outros AH (Rice & MaCarthy, 1991). O teor de nitrogênio (N) encontrado nos AH foi elevado, indicando os AH como uma importante fonte de compostos nitrogenados armazenados no vermicomposto. O teor relativamente elevado de nitrogênio (N) e baixo de carbono (C) nos AH confere valores baixos para a relação C/N dos AH.

5.2 Atividade Biológica dos Ácidos Húmicos

Conforme se pode observar nas FigurasFigura 4, Figura 5 e Figura 6 os AH isolados de vermicomposto apresentaram habilidade para estimular o crescimento de plântulas de *Cattleya warneri*. As curvas de regressão quadrática para a massa fresca e massa seca das folhas e raízes de plântulas de *Cattleya warneri* tratadas com diferentes doses (**Quadro 1**) dos ácidos húmicos se encontram ilustradas na **Figura 4**. O **Erro! Fonte de referência não encontrada.** indica o modelo de dose-resposta, mostrando a dose-ótima do material húmico estudado.

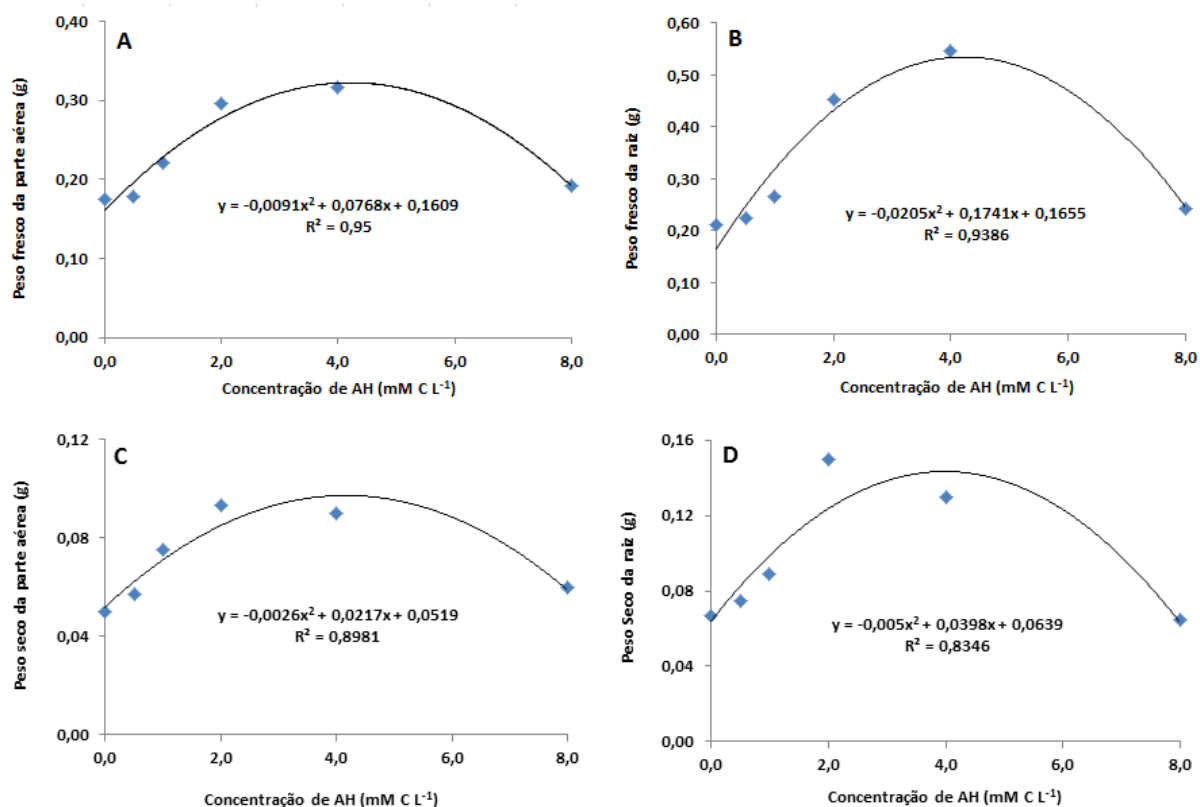


Figura 4 - Curvas de regressão quadrática para a massa fresca das folhas e raízes (A e B) e massa seca das folhas e raízes (C e D).

Quadro 3 - Modelo de dose-resposta, coeficiente de correlação (R^2), desvio-padrão da regressão (DP), número de unidades que integram a amostra (n), nível de significância da regressão (valor-p) e ponto de inflexão (dose ótima) para a massa fresca das raízes (MFR), massa fresca das folhas (MFF), massa seca das raízes (MSR) e massa seca das folhas (MSF) de plântulas de *Cattleya warneri* após tratamento com AH.

MATERIAL HÚMICO	Equação ($y = b_2x^2 + b_1x + b_0$)	R^2	Desvio Padrão	N	P	Dose ótima (dx/dy): $b_1 + 2(b_2)x = 0$
MFR (B)	$y = -0,0205x^2 + 0,1741x + 0,1655$	0,94	1,26	20	<0,0001	4,25
MFF (A)	$y = -0,0091x^2 + 0,0768x + 0,1609$	0,95	1,17	20	<0,0001	4,22
MSR (D)	$y = -0,005x^2 + 0,0398x + 0,0639$	0,83	2,84	20	<0,0001	3,98
MSF (C)	$y = -0,0026x^2 + 0,0217x + 0,0519$	0,90	1,68	20	<0,0001	4,17
					MÉDIA	4,16

O crescimento das plântulas de *Cattleya warneri* foram significativamente alteradas pela adição de AH ao meio de cultura, e os resultados são apresentados nas **Figura 4**, **Figura 5** e **Figura 6**. Imagens das plântulas coletadas no final do experimento mostram claramente a influência positiva dos AH sobre as plântulas (**Figura 5**).



Figura 5 - Imagem das plântulas de *Cattleya warneri* coletadas no final do experimento (imagem da esquerda) e após secas em estufa a 60° C (imagem da direita).

O resultado do incremento da massa fresca da parte aérea e das raízes em relação ao controle na concentração correspondente a 100% do estímulo, obtida pela primeira derivada da regressão quadrática do efeito da concentração dos ácidos húmicos é mostrada na **Figura 6**. Resultados semelhantes podem ser encontrados nos trabalhos de Canellas *et al.* (2002), Dobbss *et al.* (2007; 2010) e Aguiar *et al.* (2009). A adição de AH ao meio de cultura proporcionou um aumento 81 e 159 % em relação ao controle para a massa fresca da parte aérea e das raízes respectivamente (**Figura 6**).

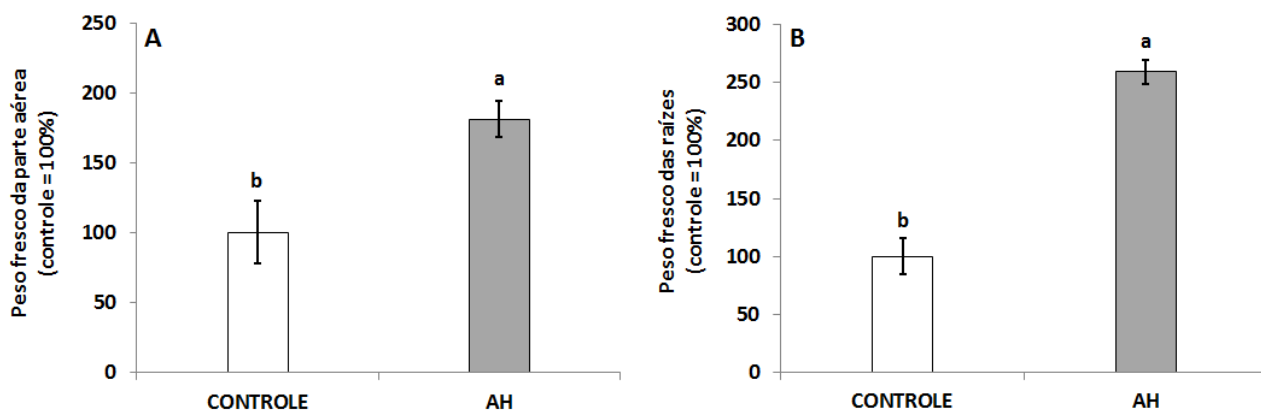


Figura 6 - Efeito dos ácidos húmicos ($4,16 \text{ mM C L}^{-1}$) isolados de vermicomposto sobre a massa fresca da parte aérea (A) e massa fresca radicular (B) de plântulas de *Cattleya warneri*. Os valores representam a média de 20 plantas \pm desvio padrão e foram normalizados em relação ao controle (controle=100%). Médias seguidas de letras diferentes nas colunas são estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

Com relação à massa seca das raízes (**Figura 7**) também foram observados incrementos significativos tanto nas massas da parte aérea quanto das raízes, indicativo do aumento da área foliar e radicular promovido pelos AH (Rima *et al.*, 2011).

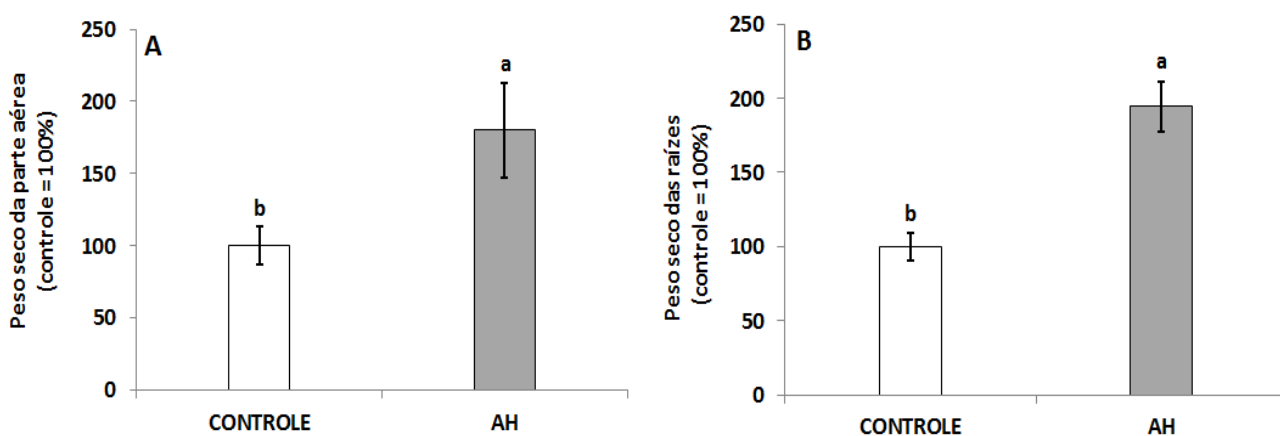


Figura 7 - Efeito dos ácidos húmicos ($4,16 \text{ mM C L}^{-1}$) isolados de vermicomposto sobre a massa seca da parte aérea (A) e massa seca radicular (B) de plântulas de *Cattleya warneri*. Os valores representam a média de 20 plantas \pm desvio padrão e foram normalizados em relação ao controle (controle=100%). Médias seguidas de letras diferentes nas colunas são estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

O incremento ao número de folhas e raízes pode ser observado na **Figura 8**. Com relação ao número de folhas por plântula foi observado incrementos de 17% quando se procede a comparação com as plântulas controle. Já com

relação ao número de raízes este número aumenta (adição de AH ao meio de cultura proporcionou 32% de aumento em relação às plântulas controle).

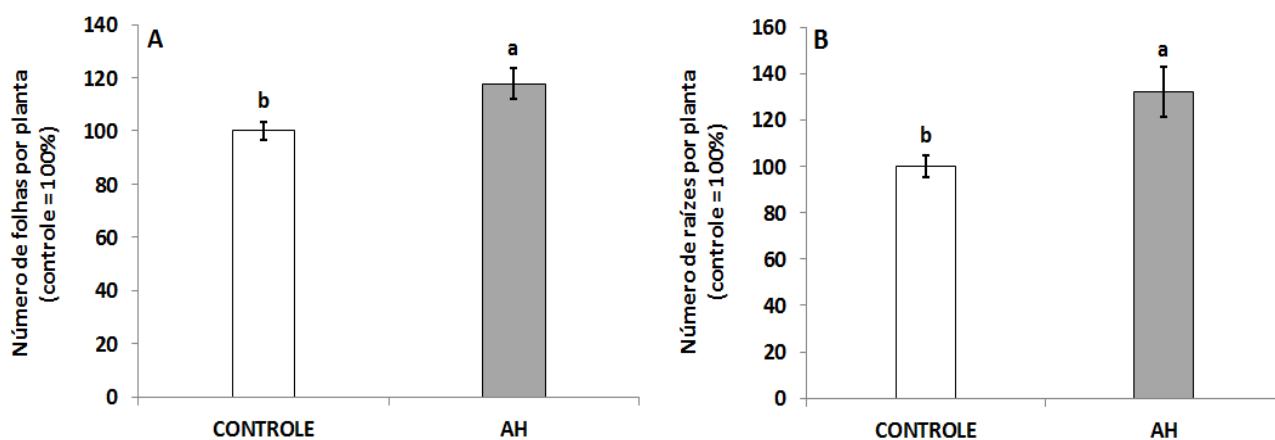


Figura 8 - Efeito dos ácidos húmicos ($4,16 \text{ mM C L}^{-1}$) isolados de vermicomposto sobre o número de folhas (A) e raízes (B) de plântulas de *Cattleya warneri*. Os valores representam a média de 20 plantas \pm desvio padrão e foram normalizados em relação ao controle (controle=100%). Médias seguidas de letras diferentes nas colunas são estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os AH estimularam significativamente tanto o número de raízes e folhas (**Figura 8**) quanto à massa seca e fresca da parte aérea e das raízes (**Figura 6** e **Figura 7**). O maior efeito em magnitude dos AH sobre as plântulas de *Cattleya warneri* foi observado na massa fresca das raízes, onde foram observados acréscimos de até 159% em relação ao controle (**Figura 6**).

Há muito tempo pesquisadores têm encontrado na matéria orgânica humificada substâncias fisiologicamente ativas com capacidade de influenciar positivamente o desenvolvimento das plantas (Bottonley, 1917). Geralmente, é observado um forte estímulo no desenvolvimento radicular (bem mais do que na parte aérea) com concentrações relativamente pequenas de materiais húmicos em solução e inibição do crescimento em doses maiores, semelhante à curva normalmente obtida nos ensaios com hormônios vegetais (Vaughan & Malcolm, 1985).

5.3 Medida da acidez em solução - atividade da H^+ -ATPase

A **Figura 9** apresenta as medidas de acidez (pH) do meio contendo plântulas de *Cattleya warneri* tratadas com AH extraídos de vermicomposto. O aumento da acidez da solução foi observado nos tratamentos com AH. Tais

resultados corroboram com os obtidos por Dobbss *et al.*, (2008), onde também foram observados aumentos na acidez das soluções contendo plântulas de *Arabidopsis* tratadas com materiais húmicos extraídos do Rio Paraíba do Sul. Segundo Aguiar *et al.* (2011), o aumento da acidez do meio pode ser principalmente associado a dois fatores principais: i) produção de CO₂ pela respiração radicular, ou seja, durante a respiração há a produção de CO₂ que ao se dissolver no meio causa redução do pH e ii) aumento da extrusão de H⁺, possivelmente associado a atividade das SH sobre as H⁺-ATPases.

Conforme observado recentemente por estes mesmos autores, apesar da acidez proporcionada pela exposição das plântulas aos AH não ser exclusivamente devido ao estímulo nas bombas de H⁺, possivelmente pode-se sugerir que este método simplificado pode ser usado no estudo de substâncias húmicas fisiologicamente ativas. Tais resultados obtidos já eram esperados visto que o mecanismo de promoção do crescimento celular é mediado pelas H⁺-ATPases num processo conhecido como “a teoria do crescimento ácido”. O processo de ativação das H⁺-ATPases que culmina com o alongamento celular se inicia com a geração do gradiente de H⁺ e abaixamento do pH, proporcionado pelo acúmulo de H⁺ no lado externo à célula (Canellas & Santos., 2005).

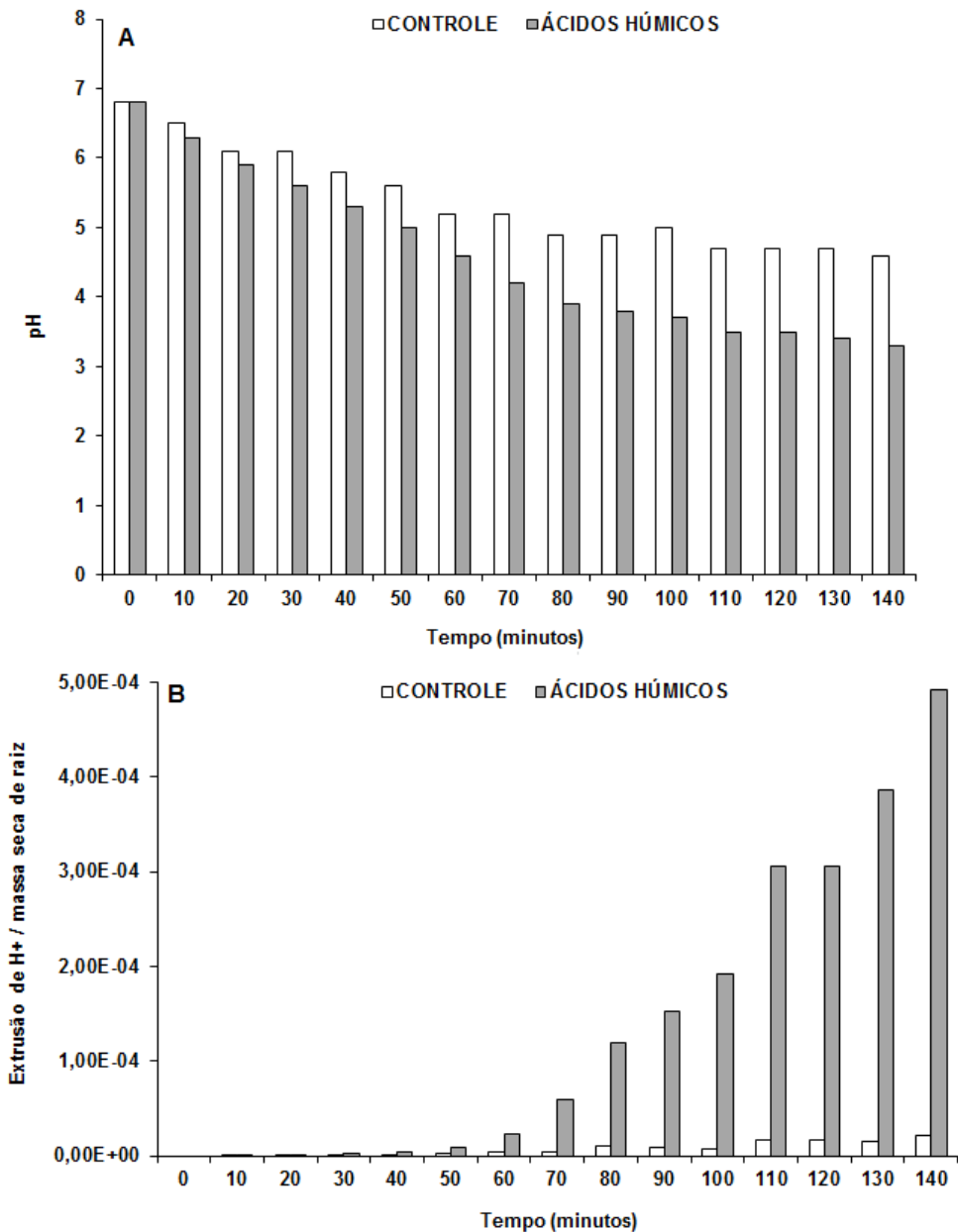


Figura 9 - A) Medida de pH da solução contendo plântulas de *Cattleya warneri* após tratamento com a melhor dose de AH obtida no ensaio preliminar de dose resposta (4,16 mM C). B) Extrusão de H⁺ pela massa seca de raízes de *Cattleya warneri* após tratamento com a melhor dose de AH obtida no ensaio preliminar de dose resposta.

Portanto através dos dados obtidos pode-se se afirmar, pelo menos em parte, que a medida da acidez da solução contendo plantas tratadas com AH provavelmente está relacionada com a atividade da H⁺-ATPase (aumento da extrusão de H⁺) de membrana plasmática.

6 CONCLUSÕES

A ideia de que materiais húmicos podem atuar no metabolismo vegetal não é recente. No entanto, estudos utilizando materiais húmicos oriundos de vermicomposto sobre a biostimulação de plantas de orquídeas (em nosso caso plântulas de *Cattleya warneri*) são praticamente inexistentes, ainda mais quando o proposto é potencializá-las para uma posterior reintrodução ao seu habitat natural. A partir dos resultados obtidos com este trabalho, foi possível concluir que:

- Os AH isolados de vermicomposto apresentaram capacidade de induzir o crescimento de plântulas de *Cattleya warneri*, induzindo o aumento no número de folhas e raízes, e da massa fresca e seca das mesmas;
- Os AH, quando em solução, puderam atuar como reguladoras do crescimento, uma vez que foram capazes de aumentar a atividade da H⁺-ATPase através de ensaios de medidas de acidez em solução;
- Os AH, devido às suas características químicas, afetou marcadamente o estímulo ao crescimento de plântulas de *Cattleya warneri* e pode ser utilizado como uma tecnologia inovadora de bioestimulação vegetal para posterior reincorporação deste tipo de vegetação ao seu habitat natural.

7 REFERÊNCIAS

As citações e referências bibliográficas desta dissertação foram realizadas seguindo as normas da REVISTA CERES, disponíveis no site: <http://www.ceres.ufv.br/ceres/visao/site/home.php?l=1&d=18>

Ab'Saber AN (1984) Ecossistemas continentais. SEMA, Relatório de Qualidade do Meio Ambiente, Sinopse. Brasília, p.171-218.

Adani F, Genevini P & Zaccheo P (1998) The effect of commercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition. *J. Plant Nutr.*, 21:561-575.

Adani F, Salati S, Spagnol M, Tambone F, Genevini P, Pilu R & Nierop, KGJ (2009) Nanometer-scale structure of alkali-soluble bio-macromolecules of maize plant residues their recalcitrance in soil. *Chemosphere*, 76:523-528.

Aguiar O, Canellas LP, Dobbss LB, Zandonadi D, Olivares F & Façanha R, (2009) Distribuição de massa molecular de ácidos húmicos e promoção de crescimento radicular. *Rev. Bras. Cien. Solo*, 33: 1613-1623.

Aguiar, NO (2011) Características Químicas e Bioatividade de Ácidos Húmicos isolados de vermicompostos em diferentes estádios de maturação. Dissertação de mestrado (Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF) Campos dos Goytacazes - RJ. 86p.

Aguiar, NO, Olivares, FL, Novotny, EH, Dobbss, LB, Balmori, DM, Santos-Júnior, LG, Chagas, JG, Façanha, AR, Canellas, LP. (2012) Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant and Soil* (Print). DOI: 10.1007/s11104-012-1277-5.

Araujo GHS, Almeida R & Guerra AJT (2005) Gestão Ambiental de Áreas Degradadas. Rio de Janeiro, Bertrand Brasil. 320p.

Araujo, D. Brazilian Orchids. (2004) Disponível em <<http://www.delfinadearaujo.com/page2br.htm>>. Acessado em: 04 de dezembro de 2012.

Ayres JM, Fonseca G, Rylands A, Queiroz H, Pinto L, Masterson D & Cavalcanti R (2005) Os Corredores Ecológicos das Florestas do Brasil; Belém, Para. Sociedade Civil Mamirauá-SCM, 256 p.

Barreto DW & Parente JP (2006) Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*. *Carbohydrate Polymers*, Barking, 64:287-291.

Barthlott W, Schim-Neuerburg V, Nieder J & Engwalds S. (2001) Diversity and abundance of vascular epiphytes: a comparison of secondary vegetation and primary montane rain forest in the Venezuelan Andes. *Plant Ecology*, 152:145- 156.

Benzig DH (1987) Vascular epiphytism: taxonomy participation and adaptative diversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 74:183-204.

Biodiversitas (2012 a) Lista de extinção flora brasileira de 2005. Disponível em:< www.biodiversitas.org.br>. Acessado em: 27 de março de 2012.

Bottomley WB (1917) Some effects of organic-promotion substances (auximones) on the growth of *Lema minor* in mineral cultural solutions. *Proceedings of the Royal Society of London Series B. Biological Sciences*, 89:481-505.

Braga PIS (1977) Orquídeas : Entrada e dispersão na Amazônia. *Ciência hoje*, 5 (28): 44-51 e 53-55.

Braga PIS (1987) Aspectos ecofisiológicos de Orchidaceae da Amazônia II. Anatomia Ecológica foliar de espécie com metabolismo CAM de uma campina da Amazônia central. *Acta Amazonian*, 7:1-89.

Brito AT & Cribbs, P (2005) Orquídeas da Chapada Diamantina. Ed.Nova Fronteira, 399 p.

Busato, JG, Zandonadi DB, Dobbss L B, Façanha A R & Canellas L P (2010) Humic substances isolated from residues of sugar cane industry as root growth promoter. *Scientia Agricola*, 67:206-212

Cacco G & Dell'Agnola G (1984) Plant growth regulator activity of soluble humic complexes. *Canadian Journal of Soil Science*, 64:225-228.

Cameron, RS, Thornton, BK, Swift, RS, Posner, AM. (1972) Molecular weight and shape of humic acids from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts. *J. Soil Sci.*, 23: 394-408.

Canellas LP & Santos GA (2005) Humosfera- Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas, Campos de Goytacazes, L.P. Canellas & G.A. Santos 309p.

Canellas LP, Olivares FL, Korokova- Façanha AL,1 Façanha AR (2002) Humic Acids Isoleted from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H⁺ -ATPase Activity in Maize Roots. *Plant Physiolllogy*, 1951-1957.

Canellas LP, Santos GA, Rumjanek VM, Moraes AA, Guridi F (2001) Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. *Pesq. agropec. bras.*, 36:1529-1538.

Canellas LP, Teixeira-junior LRL, Dobbss L, Silva CA, Medici LO, Zandonadi D & Façanha AR (2008) Humic acids crossinteration with root and organnic acids. *Ann. Appl. Biol.*, 153:157-166.

Canellas LP, Zandonadi DB, Olivares FL & Façanha AR (2006) Efeitos fisiológicos de susbtâncias húmicas – o estímulo às H⁺-ATPases. In: Fernandez MS (Eds), *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo Nutrição, p. 175-200.

Chadwick AA & Arthur E (2006) *The Classic Cattleyas*, Portland OR, Timber Press. p 25-41. Disponível em:< <http://chadwickorchids.com> >; Acessado em: 16 de agosto de 2012.

Chase MW, Cameron KM, Barret RL, Freudenstein JV (2003) DNA data and *Orchidaceae* systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barret RL & Cribb PJ (Eds.) *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu, Natural History Publication. p. 69-90.

Chen Y & Aviad T (1990) Effects of humic substances on plant growth. In: Maccarthy P, Capp CE, Malcolm RL & Bloom PR (eds). *Humic substances in soil and crop sciences: selected readings*. Madison, American Society of America. p. 161-186.

Chen Y , Liu Y, Jiang J, Zhang Y & Yin B (2008) *Dendronone* a new phenanthrenequinone from *Dendrobium cariniferum*. *Food Chemistry*, London, 111:11-12.

Christensen BT (1992) Physical fractionation of soil organic matter in primary particles and density separates. *Adv. Soil Sci.*, 20:2-90.

Colombo LA, Faria RT, Carvalho JFP, Assis AM & Fonseca ICB (2004) Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* e duas espécies de orquídeas brasileiras. *Acta Scientiarum*, Maringá, 6:253-258.

Conservação Internacional do Brasil, Fund. SOS Mata Atlântica, Fund. Biodiversitas, Inst. Pesquisas Ecológicas, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de S.Paulo-SEMAD & Instituto Estadual de Floresta de M.G. (2000) Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Floresta Atlântica e Campos Sulinos . Brasília/MMA/SBF.

Cordeiro, FC & Souza,SR (2010) Influência dos ácidos húmicos no metabolismo vegetal pode ser considerada uma resposta auxínica? *Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Vida. Seropédica*, RJ, EDUR, 30: 1-19.

Coutinho LM (1970) Sobre assimilação noturna de CO² em orquídeas e bromélia. *Ciências e Cultura* , 22:364-368.

Cruz DT, Bobba EL & Van Der Berg C (2003) O gênero *Cattleya* Lindl (*Orchidaceae*) no Estado da Bahia, Brasil. *Sitientibus - Ciência Biológicas*, 351/2: 2634.

Dell'Agnola, G.; Nardi, S. (1987) On overview of earthworm activity in the soil. In: Bonvicini Pagliai A.M., Omodeo P. (Eds.), *On earthworms selected symposia and monographs. Part 2*. Mucchi Editore, Modena, Italy, p. 103-112.

Diário Oficial Dos Poderes do ES-2010, Decreto-lei nº 2529- R de 02 de junho de 2010. Disponível em: <www.coredoresecolgicos.es.gov.br/publicacoes/decreto.pdf>. Acessado em: 28 de março de 2012.

Dignar SL, Castro EM, Pasqual M., Ferronato A, Braga FT & Paiva R (2009) Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana* . *Lavras* , *Ciência Agritec*, 33: 780-787.

Dobbss LB, Medici LO, Pino Nunes LE, Peres LEP & Rumjanec VM, Façanha AR & Canellas LP (2007) Changes in root development of *Arabidopsis* promoted by organic matter from oxisoils. *Ann. Appl. Biol.*, 151:149-211.

Dobbss LB, Baldotto MA, Zandonadi DB, Canellas LP, Façanha AR, Rezende CE (2008) River organic matter affects *Arabidopsis thaliana* root architecture and proton extrusion. In: SBBQ 2008, Águas de Lindóia - SP. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.

Dobbss LB, Canellas LP, Olivares FL, Aguiar NO, Peres LEP, Azevedo M, Spaccini R, Piccolo A & Façanha AR (2010) Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 58:3681-3688.

Dressler RL (1981) *Orchid: natural history and classification*. Harvard: Harvard University Press. 331p.

Dressler RL (1993) *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Portland, Dioscorides Pres. 314 p.

Elias C, De Nadai FEA, França EJ & Bacchi MA (2006) Seleção de epífitas acumuladora de elementos químicos na Mata Atlântica. 6° ed. Campinas, Biota Neotropica. Disponível em: <[HTTP://www.biotaneotropica.org.br/v6n1/pt/fullpaper?bn02106012006+pt](http://www.biotaneotropica.org.br/v6n1/pt/fullpaper?bn02106012006+pt)>. Acessado em: 04 de julho de 2012.

Estado do Espírito Santo (2012). Disponível em: <www.biodiversitas.org.br/floraBr/ES-especies_ameacadas.pdf>. Acessado em 28 de março de 2012.

Façanha AR, Façanha ALO, Olivares FL, Guridi F, Santos GA, Velloso ACX, Rumjanek VM, Brasil F, Schripsema J, Braz R, Oliveira MA & Canellas LP (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre as bombas de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 1301-1310.

Ferreira DF (2000) Análises estatísticas por meio do SISVAR parawindows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45, São Carlos. Anais, São Carlos. 225-258p.

Franzluebbers AJ (2002) Soil organic matter stratification ratio as an indicator of soil quality. *Soil Till. Res.*, 66:95-106.

Giongo C & Waechter JL (2004) Composição florística de componente epifítico vascular em floresta de galeria na depressão central do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Botânica*, 27: 563-572.

Goldemberg J (2012). Rio 92: dez anos depois. Disponível em <www.livrogratis.com.br/arquivos_livros/mre000104.pdf>. Acessado em: 28 de março de 2012.

Gomes L (2007) 1808: Como uma rainha louca, um príncipe medroso e uma corte corrupta enganaram Napoleão e mudaram a história de Portugal e do Brasil. Edição Planeta Brasil, São Paulo. 141p.

Hager A (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. J. Plant Res., 116: 483-505.

Herrick JE & Wander MM (1998) Relationships between soil organic carbon and soil quality in cropped and rangeland soils: The importance of distribution, composition, and soil biological activity. In: Lal R, Kimble JM, Follet RF & Stewart BA (Eds) Soil processes and the carbon cycle. Boca Raton, CRC Press, p. 405-425.

Hodge A (2004) The plastic plant: roots responses to heterogeneous supplies of nutrients. New Phytologist, Cambridge, 162:9-24.

Kelleher BP & Simpson AJ (2006) Humic substances in soils: are they really chemically distinct. Environ. Sci. Technol., 40:4605-4611.

Keller C (2008) Padrão de enraizamento dos Pseudobulbos de Cattleya. Disponível em: <www.geologicpublication.com>. Acessado em 23 de março de 2012.

Kersten A (2010) Epífitas vasculares: Histórico, participação taxonômica e aspectos relevantes com ênfase na Mata Atlântica. Hoehne, 37 (1): 9-38.

Kersten R & Silva SM (2001) Composição florística do componente epifítico vascular em floresta da planície litorânea na Ilha do Mel, Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Botânica, 24:213-226.

Khan PSSV, Kozai T, Nguyen QT, Kubota C & Dhavan V (2002) Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. Plant Cell, 71: 141-146.

Lagos AR & Muller BLA (2007) Hotspot Brasileiro: Mata Atlântica, Saúde e Ambiente em Revista. Duque de Caxias, 2: 35-45.

Landgraf, M.D.; Alves, M.R.; da Silva, S.C.; Rezende, M.O.D. (1999) Characterization of humic acids from vermicompost of cattle manure composting for 3 and 6 months. Quim. Nova, 22:483-486.

Lepsch IF (2002) Formação e Conservação dos Solos. São Paulo, Oficina de Textos, 178 p.

Machado EF (2008) História do Patrimônio Natural do Espírito Santo- Orquídeas. Rio de Janeiro, Editora Documenta Histórica, 120 p.

Magdoff F (1992) Building soils for better crops: Organic Matter Management. USA, Lincoln:University of Nebraska Press, 433p.

Mahendran G & Bai VN (2009) Mass propagation of *Satyrium nepalense* D.Don: A medicinal orchid via seed culture. Scientia Horticulturae, 119:203-207.

Mania LF & Monteiro R (2010) Florística e ecologia de epífitas vasculares em um fragmento de floresta de restinga, Ubatuba, São Paulo- Brasil. *Rodriguesia*, 61:705-713.

Masciandaro G, Ceccanti B; Garcia, C (1999) Soil agroecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. *Biores. Technol.*, 59: 199-206.

Mata Atlântica e Biodiversidade (2005) Franke CR, Rocha PLB, Klein W, Gomes SL (org), Joe Lopes Ed. Salvador, Edufba. 461p.

Moraes CP, Santambrosio S, Massaro R ,Cordeiro GM & Leal TS (2009) Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya Tigrina* A. *Richard* (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. *Ensaio e Ciência*, 13:57-65.

Mota EVR (1991) Identificação de novas unidades de conservação no Estado do Espírito Santo utilizando o Sistema de Análise Geo-ambiental/ SAGA. Dissertação de mestrado. Unidade Federal de Viçosa, Viçosa, 140p.

Muscolo A & Nardi S(1997) Auxin or auxin-like activity of humic matter. In: Drozd J, Gonet SS, Senesi N & Weber J (eds.) *The Role of Humic Substances in the Ecosystems and Environmental Protection*. Wroclaw-Poland, Polish Society of Humic Substances. p. 987–992.

Muscolo A, Bovalo F, Gionfriddo F.& Nardi S (1999) Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biol. Biochem.*, 31:1303–1311.

Nannipieri P, Grego S, Dell'agnola G & Nardi S (1993) Proprietà biochimiche e fisiologiche della sostanza organica. In: Nannipieri P (ed.) *Ciclo della sostanza organica nel suolo: aspetti agronomici, chimici, ecologici y selvicoltureali*. Bologna, Patron. p. 67-78.

Nardi S, Concheri G & Dell'Agnola G (1996) Biological activity of humus. In: Piccolo A (ed.) *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. New York, Elsevier. p. 361–406.

Nardi S, l'Osoni M, Pizzeghello D, Provenzano Mr, Cilenti A, Sturaro A, Rella R, Vianello A (2005) Chemical characteristics and biological activity of organic substances extracted from soils by root exudates. *SoilSci. Soc. Am.*, 369: 312-2019.

Nardi S, Pizzeghello D, Muscolo A & Vianello A (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology & Biochemistry*, 34:1527-1536.

Nieder J, Engwald S, Klavun M & Barthlott W (2000) Spatial distribution of vascular epiphytes (including hemiepiphytes) in a lowland amazonian rain forest (Surumoni Crane Plot) of southern Venezuela. *Biotropica*, 32:385-396.

Pabst GFJ & Dung F (1977) *Orchidaceae Brasiliensis*. Hildsheim, Brucke- Verlag, Kurt Schmiersow, 418p.

Pabst GFJ & Dung F (1975) *Orchidaceae Brasiliensis*. Hildsheim, Brucke- Verlag, Kurt Schmiersow, v.1, 408p.

- Papa G, Spagnol M, Tambone F, Pilu R, Scaglia B & Adani F (2010) Micropore surface area of alkali-soluble plant macromolecules (humic acids) drives their decomposition rates in soil. *Chemosphere*, 78:1036-1041.
- Pereire OJ (2007) Formações pioneiras: restinga. In: Simonelli M & Fraga CN (org). Espécie de flora ameaçada de extinção do Estado do Espírito Santo. Vitória, IPEMA, p. 27-32.
- Perleberg TD (2009) A Família *Orchidaceae* no Moro do Quilogongo Pelotas, RGS, Brasil. Dissertação de Mestrado. UFEPEL, Pelotas - RS, 157p.
- Piccolo A (1996) Humus and soil conservation. In: Piccolo A (Ed) *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Amsterdam-Netherlands, Elsevier. p. 225-264.
- Piccolo A, Spaccini R, Haberhauer G & Gerzabek MH (1999) Increased sequestration of organic carbon in soil by hydrophobic protection,. *Naturwissenschaften*, 86:496-499.
- Piccolo A, Spaccini R, Nieder R & RICHTER J 2004. Sequestration of a biologically labile organic carbon in soils by humified organic matter. *Climatic Change*, 67:329-343.
- Pita PB & Menezes NL (2007) Anatomia da raiz de espécie de *Dyckia Schult.f. e Enchorlirium Mart.ex. Schult. & Schult.f. (Bromeliaceae, Pitncairnioideae)* da Serra do Cipo_ M. Gerais, Brasil, com especial referência ao velame. *Revista Brasil Bot.*, 25:25-34.
- Prindgeon AM (1986) Anatomical adaptations in *Orchidaceae*. *Lindleyana*, 1: 90-101.
- Projetos Corredores Ecológicos (2005). Síntese dos Encontros Regionais realizados com os Municípios do Estado do Espírito Santo. Projeto Corredores Ecológicos. Cariacica: 52p.
- Quaggiotti S, Rupert B, Pizzeghello D, Francioso O, Tugnoli V.& Nardi S (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays L.*). *Journal of Experimental Botany*, 55:803-813.
- Rayle DL, Cleland RE (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99:1271-1274.
- Rice JA, Macarthy P (1991) Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Org. Geochem.*, 17: 635-648.
- Rizzini CT (1979) Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos sociológicos e florísticos. São Paulo, EDUSP e Editora HUCITEC, 374p.
- Roberts DL & Dixon KW (2008) Orchids, *Current Biology*.18 (8):325-329.
- Rodda MRC, Canellas LP, Façanha AR, Zandonadi DB, Guerra JGM, Almeida DL & Santos GA (2006a) Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de

alface tratadas com humatos de vermicomposto: I - Efeito da concentração. R. Bras. Ci. Solo, 30:649-656.

Rodda MRC, Canellas LP, Façanha AR, Zandonadi DB, Guerra JGM, Almeida DL & Santos GA (2006b) Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. II - efeito da fonte de vermicomposto. R. Bras. Ci. Solo, 30:657-664.

Rodrigues RR & Leitão-Filho HF (2000) Matas ciliares: conservação e recuperação. São Paulo, EDUSP- FAPESP, 320 p.

Sanders DJ (1979) *Crussulacean* Acid Metabolism and its possible occurrence in the plant family *Orchidaceae*. American Orchid Society Bulletin, 48:796- 798.

Scatena VL & Nunes AC (1996) Anatomia de *Fleurothallis rupestris* Lindl (*Orchidaceae*) dos campos rupestres. Boletim de Botânica USP, 15:35-43.

Senesi N & Loffredo E (1999) The Chemistry of Soil Organic Matters. In: Sparks WJA (Ed.) Soil Physical Chemistry. Soil Physical Chemistry. Boca Raton- USA, CRC Press, p. 239-370.

Serret MD & Trillas MI (2000) Effect of light and sucrose levels on the anatomy ultra structure and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* leaflets cultured *in vitro*. International Journal of Plant Sciences, 161:281-289.

Silva A & Dellatorre C (2009) Alterações na arquitetura de raiz em resposta a disponibilidade de fósforo e nitrogênio. Ver. Cien. Agroveterinarias, Lages, 8:152-163.

Silva ENS & Swdeller VV (orgs) (2009) Biotupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sócio- Cultural do Baixo Rio Negro- Amazônia Central , volume 2, Manaus, UEA Edições, Manaus, 206p.

Silva MC & Castelli CHN (2005) Estado da biodiversidade da Mata Atlântica Brasileira In: Galindo-Leal C & Câmara IG (Eds) Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaça e Perspectiva. Belo Horizonte, Fundação SO Mata Atlântica- Conservação Internacional do Brasil, 43-59.

Silva RAM, Agrizzi EJ & Bernabe L(org) (2001) Seminário Técnico de Meio Ambiente: Questões ambientais de atualidade- Programa de Comunicação Ambiental, CST, Serra, E.S. s/n p.

Silva V, Meira RMS & Azevedo AA. (2010) Anatomia se raízes de espécie *Orchidaceae* no Parque Estadual da Serra dos Brigadeiros, Minas Gerais. Hoehnea, 37:147- 161.

Simonelli M & Fraga CN (org.) (2007) Espécie de flora ameaçada no Estado do Espírito Santo. Vitoria, Ipema. 144p.

Stevenson FJ (1994) Humus chemistry; genesis, composition, reactions. New York: John Wiley & Sons, 496p.

Storti E.F (2007) Dinâmica Populacional e Biológica Reprodutiva de *Cattleya el dourado Linden (Orchidaceae)*. Tese de doutorado. Universidade Federal do Amazonas-UFAM/Instituto de Pesquisa do Amazonas- INPA, Manaus. 82p.

Tabarelli M & Montovani W (1999) A riqueza de espécies arbóreas na Floresta Atlântica de encosta no Estado de S.Paulo –Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 22:217-223.

Tabarelli M, Aguiar AV, Grillo, A, Santos A (2006) Fragmentação e perda de habitat na floresta Atlântica ao norte do Rio São Francisco. In: Siqueira f & Leme EMC (org). *Fragmentos da Mata Atlântica do nordeste: Biodiversidade, conservação e suas bromélias*; 1° Ed.;, Rio de Janeiro., Andrea Jacobson Estudio Editorial Idta. V.1 p 89-99; Disponível em: < http://florida.academia.edu/AntonioVenceslauAguiar/Books/1195181/Fragmentacao_e_perda_de_habitat_na_floresta_Atlantica_ao_norte_do_Rio_Sao_Francisco >. Acessado em/ 16 de agosto de 2012.

Tissot ML (1991) Anatomia de Raízes de Orquídeas Terrestres Nativas no Morro do Santana, Porto Alegre, RS. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal do Rio Grande Sul, Porto Alegre, RS, 158 p.

Unemoto LK, Faria RT, Vieira AOS & Dalo RGD (2007) Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. *Revista Brasileira de Agrociência*, 3: 267-269.

Vaughan D & Malcolm RL (1985) Soil organic matter and Biological Activity, Dordrecht, Martinus Nijhoff/Junk W.

Vaughan D & Ord B G (1985) Influences of humic substances on biochemical process in plants. In: Vaughan D & Malcolm RL (Ed) Soil organic matter and Biological Activity. Dordrecht, Martinus Nijhoff & Junk W. p.1-34.

Vinceslas-Akpa M, Loquet M. (1997) Organic matter transformations in lignocellulosic waste products composted or vermicomposted (*Eisenia fetida* Andrei): chemical analysis and ¹³C CPMAS NMR spectroscopy. *Soil Biol Biochem.*, 29: 751–758.

Waechter JL (1992) O epifitismo vascular na planície costeira do Rio Grande do Sul. Tese Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 163p.

Zampirolo JB, Pinheiros CL, Silva DM & Falqueto AR (2011) Resistência a fotoinibição fotoquímica em *Cattleya warneryi T.Moore (Orchidaceae)* ao estresse de luz. Sociedade de Ecologia do Brasil-SEB. Disponível em: < www.seb-ecologia.org.br/xceb/resumos/479.pdfw >. Acessado em 3 de julho de 2012.

Zandonadi DB, Canellas LP, Façanha AR (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*. 225:1583-1595.

Zandonadi DB, Santos M, Dobbss LB, Olivares F, Canellas L, Binzel M, Okorokova-Façanha A & Façanha A (2010) Nitric oxide mediates humic acid-induced root development and plasma membrane H⁺ ATPase activation. *Planta*, Springer-Verlag , 231 (5):1025-36.