

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

**INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS RIZOCTONIÓIDES E SUBSTÂNCIAS  
HÚMICAS E SUA INFLUÊNCIA NO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS  
DE *Brassavola tuberculata***

**NÁGILA TEIXEIRA SIMOURA**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO / 2015**

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

**INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS RIZOCTONIÓIDES E SUBSTÂNCIAS  
HÚMICAS E SUA INFLUÊNCIA NO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS  
DE *Brassavola tuberculata***

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

**NÁGILA TEIXEIRA SIMOURA**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO / 2015**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S611i Simoura, Nágila Teixeira.

Interação entre fungos rizoctonióides e substâncias húmicas e sua influência no crescimento de plântulas de *Brassavola tuberculata* / Nágila Teixeira Simoura. – 2015.  
55 f : il.

Orientador: Leonardo Barros Dobbss.

Dissertação (mestrado Ecologia de Ecossistemas) –  
Universidade Vila Velha, 2015.  
Inclui bibliografias.

1. Fungos do solo. 2. Crescimento (Plantas). 3. Orquídea. I,|  
Dobbss, Leonardo Barros. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 579.5

NÁGILA TEIXEIRA SIMOURA

INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS RIZOCTONIÓIDES E  
SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E SUA INFLUÊNCIA NO  
CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Brassavola tuberculata*

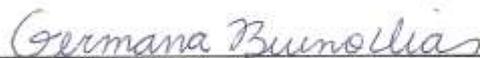
Dissertação apresentada à  
Universidade Vila Velha, como pré-  
requisito do Programa de Pós-  
graduação em Ecologia de  
Ecossistemas, para a obtenção do  
grau de Mestre em Ecologia.

Aprovada em 25 de Fevereiro de 2015

Banca Examinadora:



Dr. Andrés Calderín Garcia - UFRRJ



Drª. Germana Bueno Dias - UUV



Dr. Leonardo Barros Dobbss - UUV

Orientador

Dedico este trabalho a todos os meus familiares,  
professores e amigos queridos.

## AGRADECIMENTOS

Obrigada a Deus por me iluminar, guiar meus passos e zelar sempre por mim e minha família.

Agradeço a minha querida mãe Elizabeth Regina Teixeira Simoura, pela mulher maravilhosa que você é. Rezava por mim e me distraía quando eu mais precisava, obrigada pelos abraços apertados e pelo senso de humor. Te amo demais!

Ao meu pai, Adelson Abílio Simoura, minha referência. Que me enche de orgulho, que me diz às coisas que precisam ser ditas, nem sempre são as que eu gostaria de ouvir. Te amo muito!

As minhas irmãs, Lóris e Samara, obrigada pelos momentos de carinho, distrações e amor incondicional. Amo vocês!

Ao meu noivo, Paulo Vitor, pelos incentivos, cobranças, conselhos e carinho. Por tentar sempre colocar meu pé no chão quando o desespero aparecia e me trazer a razão quando as lágrimas surgiam.

Ao meu orientador, Dr. Leonardo Barros Dobbss, por ter me acolhido no laboratório, por ter me cobrado para que eu mesma pudesse saber o quão longe eu sou capaz de chegar. Obrigada pelas idéias, conselhos, risadas e aprendizado. Pela paciência em me explicar as mesmas coisas inúmeras vezes. Muito obrigada!

Obrigada ao Alessandro Coutinho Ramos e a Catarina Kazuya por disponibilizar todo o espaço e equipamentos necessários para a realização desse experimento!

Ao Umberto, Antônio, Tomás e Melissa, por disponibilizarem o tempo para me ensinar novas técnicas e utilizar novos equipamentos, tirarem minhas dúvidas sempre que necessário, sempre com muita paciência. Obrigada!

Aos meus amigos, Sávio, Isabela, Bruna, Flávio, Igor e Carmelo amigos que eu podia contar seja pra me ouvir desabafar ou me tirar de casa para desnuviar a cabeça! Obrigada!

Aos meus amigos do laboratório LEMO, Katherine, Juliétty, Carlos Colodete, Juliano, Izabela, Cintia, Gabi, Juju, Dandara, Lissiany, Tamires. Obrigada por estarem sempre a disposição para me ajudar, pelos bons momentos, pela amizade, por ser um grupo acolhedor.

Obrigada às instituições UVV, UENF e UFV pelos equipamentos e a FAPES pelo apoio financeiro, sem os quais seria impossível realizar este trabalho.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	I
<b>ABSTRACT</b> .....	II
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	05
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	07
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	07
3.1 <i>Objetivos Gerais</i> .....	07
3.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	07
<b>4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	09
4.1 <i>Família Orchidaceae</i> .....	09
4.2 <i>Brassavola tuberculata</i> .....	10
4.3 <i>Fungos Micorrízicos</i> .....	11
4.4 <i>Fungos Orquidóides</i> .....	12
4.5 <i>Infecção e Colonização</i> .....	13
4.5 <i>Substâncias Húmicas</i> .....	14
4.7 <i>Substâncias húmicas e microrganismos promotores do crescimento</i> ....	15
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
5.1 <i>Coleta das raízes, sementes (cápsulas), fungos e material húmico utilizados</i> .....	17
5.1.1 <i>Raízes</i> .....	17
5.1.2 <i>Sementes de B. tuberculata</i> .....	17
5.1.3 <i>Fungos</i> .....	17
5.1.4 <i>Substâncias Húmicas</i> .....	18
5.2 <i>Análise anatômica da colonização da associação micorrízica</i> .....	18
5.3 <i>Isolamento de pelotons</i> .....	18
5.4 <i>Caracterização Morfológica</i> .....	19
5.4.1 <i>Características quantitativas e qualitativas dos isolados seguido de medições em meios de cultura BDA e CMA</i> .....	19
5.5 <i>Isolamento células Monilióides</i> .....	19
5.6 <i>Caracterização molecular</i> .....	20
5.7 <i>Interação fungos micorrízicos - substâncias húmicas</i> .....	20

5.8	<i>Germinação e crescimento de plântulas e Interação Fungo-SH.....</i>	21
5.8.1	<i>Germinação e crescimento das plântulas.....</i>	21
5.8.2	<i>Interação Fungo-SH e crescimento de plântulas.....</i>	21
5.9	<i>Extração Proteica.....</i>	21
5.9.1	<i>Separação de MTs por Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....</i>	22
5.10	<i>Análises dos Dados.....</i>	23
<b>6.</b>	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
6.1	<i>Análises de colonização da associação micorrízica na espécie <i>B. tuberculata</i>.....</i>	24
6.2	<i>Isolamento e identificação dos isolados.....</i>	27
6.3	<i><i>Brassavola tuberculata</i>.....</i>	28
6.4	<i>Caracterização morfológica.....</i>	30
6.4.1	<i>Caracterização morfológica qualitativa.....</i>	30
6.4.2	<i>Caracterização morfológica quantitativa.....</i>	31
6.5	<i>Resultado da Caracterização Molecular.....</i>	32
6.6	<i>Crescimento diário (<math>\text{mm dia}^{-1}</math>) dos micélios fúngicos em meio de cultura contendo SH.....</i>	32
6.7	<i>Interação entre os isolados fúngicos e a germinação de plântulas de <i>Brassavola tuberculata</i>.....</i>	34
6.8	<i>Interação fungo-SH e crescimento de plântulas de <i>Brassavola tuberculata</i>.....</i>	35
6.9	<i>Análise de Proteínas.....</i>	38
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>

## RESUMO

SIMOURA, NÁGILA, M.S, Universidade Vila Velha - ES, Fevereiro de 2015.  
**INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS RIZOCTONIÓIDES E SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E SUA INFLUÊNCIA NO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Brassavola tuberculata*.**

Orientador: Dr. Leonardo Barros Dobbss.

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de maior valor comercial no Brasil e, por este motivo, sofrem intensa coleta predatória na natureza. Essas plantas possuem baixo sucesso reprodutivo no habitat pelo fato de serem totalmente dependentes da associação com fungos micorrízicos para germinarem. Tais fungos penetram nas células das raízes e formam estruturas chamadas pelotons que quando degradado pela planta geram nutrientes para o seu crescimento e desenvolvimento. Na literatura recente, existem trabalhos que vêm utilizando bioestimulantes a base de matéria orgânica e microrganismos benéficos para o crescimento vegetal a fim de manter a produtividade vegetal sem prejuízo ao meio ambiente. A bioestimulação de plântulas de espécies do bioma mata atlântica é fundamental para a reintrodução destas após um início de processo de extinção para aumentar sua taxa de sobrevivência no ambiente, para isso, o presente trabalho teve como objetivo utilizar como bioestimulante uma associação entre fungos rizoctonióides e SH sobre o crescimento de plântulas de *Brassavola tuberculata*. Raízes de *Brassavola tuberculata* foram coletadas na APP do Morro do Moreno - ES e destas isolados dois morfotipos de fungos (NTBTA, NTBTC). Em adição, nesse trabalho também foi utilizado o fungo M65, cedido pela UFV e já caracterizado. O crescimento destes morfotipos foi avaliado após exposição a doses crescentes de SH em meio de cultura BDA. Após a determinação da dose mais eficiente de SH e da melhor interação fungo-SH, plântulas de *B. tuberculata* foram expostas à associação obtida e avaliadas mudanças no seu crescimento bem como na expressão de proteínas. As raízes de *B. tuberculata* apresentaram alta colonização de micorrizas orquidóides, com presença de pelotons por toda extensão do córtex, alguns intactos e outros em processo de degradação. Os isolados NTBTA e NTBTC através das análises de caracterizações quantitativas e qualitativas apresentam todas as características indicativas de fungos rizoctonióides, qual foi

confirmado através da análise molecular indicando que os isolados são pertencentes ao gênero *Tulasnella* sp. (anamorfo *Epulorhiza* sp.). Os resultados mostraram que a dose de 250 mg L<sup>-1</sup> se apresentou como a mais benéfica para o crescimento fúngico de todos os morfotipos. O isolado M65 se destacou com relação aos demais para germinação e desenvolvimento de protocormos de *B. tuberculata*, tanto com relação ao tempo quanto a taxa germinativa. A interação (fungo M65-SH) proporcionou uma redução no tempo de formação de mudas e estimulou o aumento do número de raízes de plântulas de *Brassavola tuberculata* de forma significativa, especialmente na dose de 50 mg L<sup>-1</sup>, porém não foi capaz de modificar o perfil de expressão proteica avaliada através da técnica de eletroforese em gel de Tricina.

**Palavras chaves:** Orchidaceae, Micorriza, Pelotons, Reintrodução.

## ABSTRACT

SIMOURA, NÁGILA, M.S., University of Vila Velha - ES, February de 2015.  
**INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS RIZOCTONIÓIDES E SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E SUA INFLUÊNCIA NO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Brassavola tuberculata*.**

Advisor: Dr. Leonardo Barros Dobbss.

Orchids are among the most appreciate plants and higher commercial value in Brazil and, therefore, suffer intense predation in nature. These plants have low reproductive success in habitat because they are totally dependent on association with mycorrhizal fungi to germinate. Such fungi penetrate into the root cells and form structures called pelotons when degraded by generating nutrients for plant growth and development. In the recent literature, there are studies that have used the base biostimulation of organic matter and microorganisms beneficial for plant growth in order to maintain the plant productivity without harm to the environment. The biostimulation seedlings of species of the Floresta Atântica biome is crucial for the reintroduction after a start of extinction process to increase their survival rate in the environment, for this, the present study aimed to use as a growth promoter an association between Rhizoctonia-like fungi and SH on the growth of *Brassavola tuberculata* seedlings. *Brassavola tuberculata*'s roots were collected in Morro do Moreno APP - ES and isolated these two morphotypes of fungi (NTBTA, NTBTC), the M65 was donated by UFV and already has known characteristics. The growth of the three morphotypes used in this dissertation was evaluated after exposure to increasing doses of SH in BDA culture medium. After determining the most effective dose and better interaction fungus-SH, the seedlings were exposed to *B. tuberculata* association obtained and evaluated changes in their growth and expression of proteins. The roots of *B. tuberculata* showed high colonization orquidoides mycorrhizae, with presence of pelotons the fullest extent of the cortex, some intact and some in the degradation process. The NTBTA and NTBTC isolated by the quantitative and qualitative characterization analyzes have all the characteristics indicating rizoctonióides fungi, which was confirmed by molecular analysis indicating that the isolates are of the genus *Tulasnella* sp. (anamorph *Epulorhiza* sp.). The results showed that a dose of 250 mg L<sup>-1</sup> appeared to be the most beneficial for

fungus growth all morphotypes. Isolated M65 stood out compared to others for germination and development protocols *B. tuberculata*, both with respect to time as the germination rate. The interaction (M65-SH fungus) gave a reduction in seedling formation, and stimulated an increase in the number of *Brassavola tuberculata* seedling roots significantly, especially at a dose of 50 mg L<sup>-1</sup>, but was unable to modify the protein expression profile assessed by electrophoresis gel Tricine.

**Keywords:** Orchidaceae, Mycorrhiza, Pelotons, Reintroduction.

# 1. INTRODUÇÃO

Orchidaceae é uma das maiores famílias da Classe das Liliopsidas com cerca de 30.000 espécies em 980 gêneros (Guilietti *et al.*, 2005). Na América Latina, o Brasil está em terceiro lugar em números de espécies de orquídeas com mais de 3500 identificadas, estando atrás apenas de Colômbia e Equador (Colombo *et al.*, 2004). Muitas destas espécies são raramente observadas na natureza, e encontram-se em diversas listas de prioridade máxima de conservação, por apresentarem baixo sucesso reprodutivo ou habitat restrito (Mendonça & Lins, 2000). No entanto, mesmo espécies listadas encontram-se ameaçadas, justificando trabalhos que visem à sua conservação e reintrodução em habitat nativo.

As orquídeas possuem baixo sucesso reprodutivo no habitat, principalmente pelo fato de serem totalmente dependentes da associação com fungos micorrízicos para germinarem. Estes fungos penetram nas células das raízes e formam estruturas chamadas pelotons, os quais, quando digeridos pela planta, fornecem açúcares simples para o embrião crescer e se desenvolver (Rasmussen, 2002). A colonização que pode ocorrer em uma semente de orquídea é feita por hifas de fungos compatíveis, podendo ser feitas nas três seguintes formas: por pêlos epidérmicos (ou rizóides) atravessando a testa da semente, pela micrópila ou por fendas no tegumento. Após entrar na semente, a hifa se desloca por atração ao suspensor e enovela-se formando os pelotons dentro do embrião (Peterson *et al.* 2004).

As sementes das orquídeas são usualmente chamadas de *dust-seeds*, por terem a característica marcante de serem pequenas de tal forma, que impossibilitam ser capazes de armazenar quantidades suficientes de reservas a serem metabolizadas, logo, precisam de uma fonte externa de água e carbono para a germinação e o crescimento da plântula (Peterson *et al.*, 1998; Pereira, 2005b). Na natureza é o fungo micorrízico que providencia toda essa fonte externa necessária para a semente, ele a coloniza e fornece nutrientes, água, e açúcares que são essenciais para o processo de germinação, ocasionando assim uma germinação simbiótica (Peterson *et al.*, 1998; Zelmer, 1996; Rasmussen, 2002).

A interação que os fungos micorrízicos estabelecem com as raízes das orquídeas é conhecida como mutualista, no qual ambos se beneficiam dessa interação, aumentando a área de absorção de nutrientes, alocação da biomassa,

maior sustentação mecânica e maior resistência a agentes patogênicos, que gera assim um melhor desenvolvimento da planta sem ação indiscriminada de fertilizantes e defensivos agrícolas e paralelamente aumentando as suas taxas de sobrevivência e crescimento em troca dos nutrientes fornecidos pelos fungos. Em contrapartida, os fungos também são beneficiados através da aquisição de carboidratos essenciais para sua sobrevivência que são fornecidos pelas plantas (Dearnaley, 2007; Cavalcante *et al.*, 2008).

A técnica de produção de mudas *in vitro* em larga escala é de suma importância para produtores, porém, pode haver um porcentual de perdas de plantas durante a aclimatização das mudas, resultando em prejuízo econômico para esses produtores devido ao alto investimento e emprego de mão-de-obra especializada nessa técnica (George, 1996). Tendo em mente esse problema torna-se de fundamental importância os benefícios da interação fungo/planta, principalmente quando se trata da reintrodução de espécies em extinção em seus habitats naturais, contribuindo com uma possível diminuição do estresse causado pela técnica de transplântio (Pereira *et al.*, 2005b; Dearnaley, 2007; Cavalcante *et al.*, 2008).

Atualmente, alguns trabalhos têm sido conduzidos utilizando matéria orgânica (MO) juntamente com microrganismos benéficos para o crescimento vegetal a fim de manter a produtividade vegetal sem prejuízo ao ambiente (Bünemann *et al.*, 2004; Lima, 2008). Trabalhos que aliam fungos micorrízicos com substâncias húmicas (principal componente da MO) como bioestimulante já são vistos, e têm tido em sua maioria, efeitos positivos sobre crescimento e desenvolvimento das plantas, podendo assim somar de forma significativa para trabalhos que visam produção e reintrodução de plantas de maneira eficiente. Cerca de 95% da MO acumulada na superfície do planeta é constituída de substâncias húmicas (SH) (Hayes, 2001), que até os dias de hoje não possuem características estruturais bem definidas, porém seus efeitos sobre o crescimento vegetal já tem sua eficiência comprovada em diferentes espécies de interesses agrícolas e ornamentais (Busato *et al.*, 2010; Dobbss *et al.*, 2010; Baldotto *et al.*, 2014).

Esse trabalho reúne informações importantes e necessárias para o melhor entendimento da interação entre substâncias húmicas e fungos micorrízicos orquidóides sobre o crescimento de orquídeas e levou em consideração fatos relacionados aos efeitos diretos da matéria orgânica humificada sobre o crescimento e metabolismo das plantas, incluindo, por exemplo, a influência positiva das SH

sobre diversos processos metabólicos como a via glicolítica e o ciclo de Krebs, sobre a concentração de proteínas e atividade de enzimas (Stevenson & Cole, 1999; Nardi *et al.*, 1991), além da otimização proporcionada por esse material húmico sobre a simbiose entre fungos micorrízicos e raízes de plantas (Lima, 2008).

## 2. HIPÓTESE

A hipótese metodológica dessa dissertação é de que os fungos rizoctonióides quando interagidos com SH isoladas de vermicomposto (húmus de minhoca) terão um maior crescimento e tal interação (fungo-SH) proporcionará o maior crescimento de plântulas de *Brassavola tuberculata*.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. *Objetivos Gerais*

- i) Avaliar o efeito da aplicação das SH oriundas de vermicomposto sob três morfotipos de fungos rizoctonióides.
  
- ii) Avaliar a interação fungo-SH sobre o crescimento e expressão de proteínas de plântulas de *Brassavola tuberculata*, cultivadas *in vitro*.

### 3.2. *Objetivos específicos*

- i) Obter sementes (cápsulas), fungos e material húmico;
  
- ii) Avaliar a presença de colonização na raíz e realizar o isolamento de pelotons;
  
- iii) Realizar análises qualitativas e quantitativas dos isolados;
  
- iv) Avaliar a presença de células monilióides;
  
- v) Caracterizar molecularmente os tipos de fungos;
  
- vi) Encontrar a melhor dose de SH no crescimento micelial dos isolados;
  
- vii) Avaliar a eficiência na taxa de germinação de sementes de *B. tuberculata* usando os três diferentes isolados;

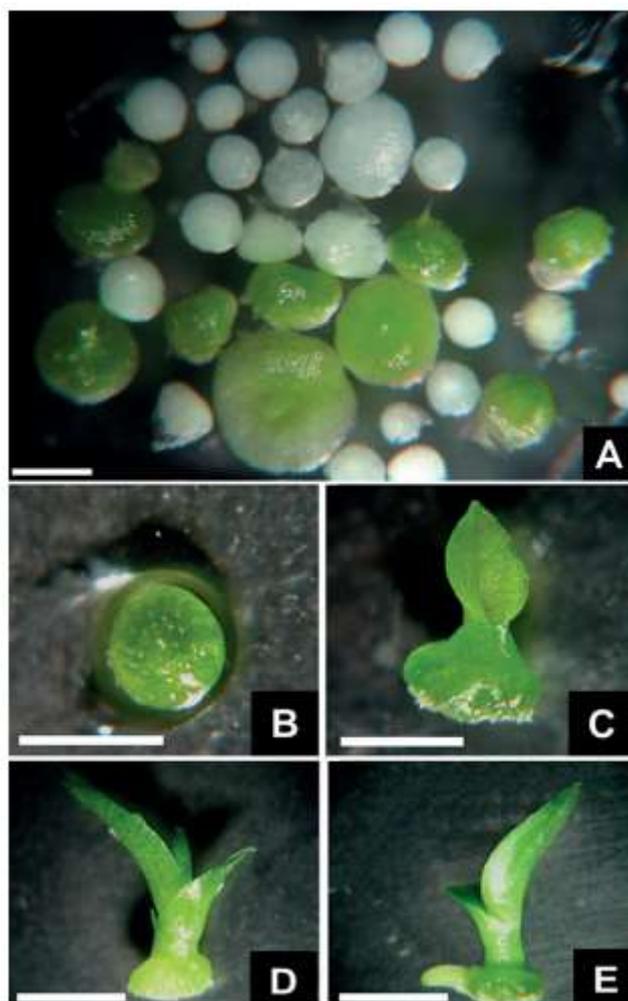
- viii) Avaliar o crescimento *in vitro* de plântulas de *B. tuberculata* na associação entre fungos rizotonióides e diferentes doses de SH;
- xi) Analisar a expressão proteica das plântulas de *B. tuberculata* na associação de fungos rizotonióides e diferentes doses de SH.

## 4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 4.1. Família *Orquidaceae*

A família das *Orquidaceae* tem uma grande importância econômica principalmente para a área do paisagismo. Devido às características ornamentais as espécies dessa família são apreciadas na medicina tradicional e diversos estudos farmacológicos validaram sua utilização etnobotânica, por isso essas plantas são retiradas de forma desenfreada da natureza, levando à extinção de inúmeras espécies (Ferreira & Suzuki, 2008). Quanto à forma de cultivo, *in vitro* tem sido muito utilizado para a propagação de orquídeas, principalmente para estudos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas e como método de conservação *ex-situ* para redução do risco de extinção dessas plantas na natureza (Ferreira & Suzuki, 2008).

A formação do protocormo, estrutura originada a partir da diferenciação das células do embrião que originará a plântula (Peterson *et al.*, 1998) é uma característica única da família *Orchidaceae*. Os estágios de protocormo modificado de Zettler & Hofer (1998) são: estágio 0 = não ocorreu germinação; estágio 1 = protocormo inicial; estágio 2 = protocormo com a formação da primeira folha; estágio 3 = protocormo apresentando duas ou mais folhas; estágio 4 = plântula com folha e presença de raiz (Figura 1). O protocormo é uma fase das orquídeas que é obrigatoriamente heterotrófica, mesmo em orquídeas que são autotróficas quando adulta (Peterson *et al.*, 1998, Rasmussen, 2002, 2008). Logo, durante a primeira fase do desenvolvimento da plântula, as orquídeas são altamente dependentes dos fungos, denominados orquidóides, e algumas espécies se mantêm assim por toda a vida, enquanto outras se estabelecem com o processo fotossintético, mas se mantêm dependentes da resposta à colonização micorrizica (Rasmussen, 2008).



**Figura 1.** (A) Sementes germinadas apresentam-se clorofiladas, estágio 0 = sementes que não germinaram apresentam coloração branca ou marrom; (B) Estágio 1 = protocormo inicial; (C) Estágio 2 = Protocormo com a formação da primeira folha; (D) Estágio 3 = Protocormo apresentando duas ou mais folhas; (E) Estágio 4 = Plântula com folha e presença de raiz. Barras: 10 mm. Fonte: Abrão *et al.*, 2014

#### 4.2. *Brassavola tuberculata*

A *Brassavola tuberculata* pertence à subtribo Neotropical das Laeliinae, é endêmica da Mata Atlântica e ocorrem nos estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Barros *et al.*, 2010). A *B. tuberculata* pode ser encontrada na forma rupícola, entretanto, predominantemente na forma epífita. A espécie tem tido sua população natural muito destruída pelo desflorestamento, queimadas e pela coleta de colecionadores amadores e profissionais. A planta possui rizoma desenvolvido e suas raízes são numerosas com a presença de caule unifoliado com nós e entre nós bem evidentes, não espessados em pseudobulbos com folhas cilíndricas na extremidade do pseudobulbo (Fraga & Menezes, 2000).

Esta espécie é caracterizada por seu hábito pendente com flores com sépalas e pétalas creme-amareladas e labelo branco com centro amarelo (Figura 2). Sua floração ocorre de outubro a janeiro (Hoehne, 1949; Toscano-De-Brito & Cribb, 2005).



**Figura 2.** Caracterizações da espécie *B. tuberculata* flores com sépalas e pétalas creme-amareladas e labelo branco com centro amarelo. Fonte: Noé Cheung (2004).

As plantas da subtribo das Laeliinae têm sido coletadas de forma intensa e indiscriminada no Brasil, levando a uma redução significativa de sua população natural. A fim de estabelecer estratégias de conservação para estas plantas ameaçadas, existem publicações na literatura que mostram uma associação preferencial entre alguns fungos específicos e Orchidaceae, bem como a identidade de fungos simbiotes que formam associações micorrízicas em Laeliinae brasileiras, visando uma conservação eficiente *in situ* e *ex situ* (Almeida *et al.*, 2007).

#### 4.3. Fungos Micorrízicos

O conhecimento dos fungos micorrízicos associados ao sistema radicular, bem como o seu uso em programas de propagação simbiótica de orquídeas, é de grande importância para a reintrodução, conservação e manejo dessas espécies vegetais (Zettler, 1997; Pereira *et al.*, 2003b). Eles são os principais intervenientes no sequestro de carbono, reciclagem de nutrientes, sucessão ecológica e apresentam uma ampla gama de comportamentos e interações, podendo ser

decompositores ou saprófitos, parasitas, predadores, simbiontes, mutualistas e comensais (Hawksworth, 2004).

A ecologia dos fungos é especialmente importante para as plantas. Por exemplo, as sementes de orquídeas não germinam até serem inoculadas por hifas do fungo endomicorrízico do gênero *Rhizoctonia*. Mais de 90% das espécies vegetais do planeta são dependentes desta simbiose com outros tipos de fungos. A planta fornece os nutrientes, enquanto o fungo obtém água e minerais que a rede de hifas é capaz de encontrar muito mais eficientemente do que as raízes da planta (Pereira *et al.*, 2009). Hoje, mediante os inúmeros avanços e descobertas acerca do mundo ecológico microbiano nos ecossistemas, tem se tornado possível estudos e aplicabilidades destes microrganismos como ferramentas na biodegradação, na biorremediação e no biocontrole, temas de suma importância para a conservação e restauração ambiental (Pereira *et al.*, 2005b).

#### 4.4. Fungos Orquidóides

Os fungos rizoctonióides, ou micorrizas orquidóides, são caracterizados por terem ramificações de suas hifas em ângulo de noventa graus e constrição do septo próximo ao ponto de ramificação. Frequentemente podem ser induzidos em meio de cultura CMA (Corn Meal Agar) a desenvolverem propágulos de resistência que são cadeias de células infladas, denominadas células monilióides (Taylor *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2003).

O fato de que raramente estes fungos produzem esporos sexuais em meio de cultura foi sempre uma dificuldade para taxonomistas. Assim, a caracterização morfológica baseada em características assexuais produziu vários grupos polifiléticos. Com os recentes avanços em biologia molecular, fungos rizoctonióides têm sido descritos por métodos moleculares, via o sequenciamento e análise da região intergênica do DNA ribossomal ITS (Internal Transcribed Spacer) (Otero *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2004; Dearnaley, 2007). A maioria dos fungos micorrízicos de orquídeas pertencem ao gênero-forma *Rhizoctonia*. Os membros deste grupo são considerados um complexo de fungos filamentosos, apresentando em comum uma fase assexuada não promotora de esporos, denominada anamorfo tipo-*Rhizoctonia* (do inglês *Rhizoctonia-like*). A sistemática atual do complexo (Roberts, 1999) divide os fungos filamentosos com fase anamórfica tipo-*Rhizoctonia* em, no mínimo oito gêneros anamórficos: *Ascorhizoctonia* Yang & Korf, *Ceratorhiza*

R.T. Moore, *Chrysorhiza* Andersen & Stalpers, *Epulorhiza* R.T. Moore emend R.T. Moore & Andersen, *Opadorhiza* Andersen & R.T. Moore, *Moliniopsis* Ruhland, *Rhizoctonia* D.C. e *Thanatophytum* Nees.

A *Tulasnella* spp. (forma teleomorfica da *Epulorhiza*) foi encontrada formando associações micorrizais com plantas de todas as subfamílias de Orchidaceae, sendo elas um dos principais simbiontes em plantas parcialmente micoheterotróficas (Taylor *et al.*, 2002). É fundamental obter conhecimento sobre a ecologia de micorrizas orquidóides, para que se possa avaliar o seu potencial nos processos de germinação de sementes, sua distribuição no ecossistema, como atuam nesta simbiose e qual sua função determinando a permanência ou não de espécies em seu habitat.

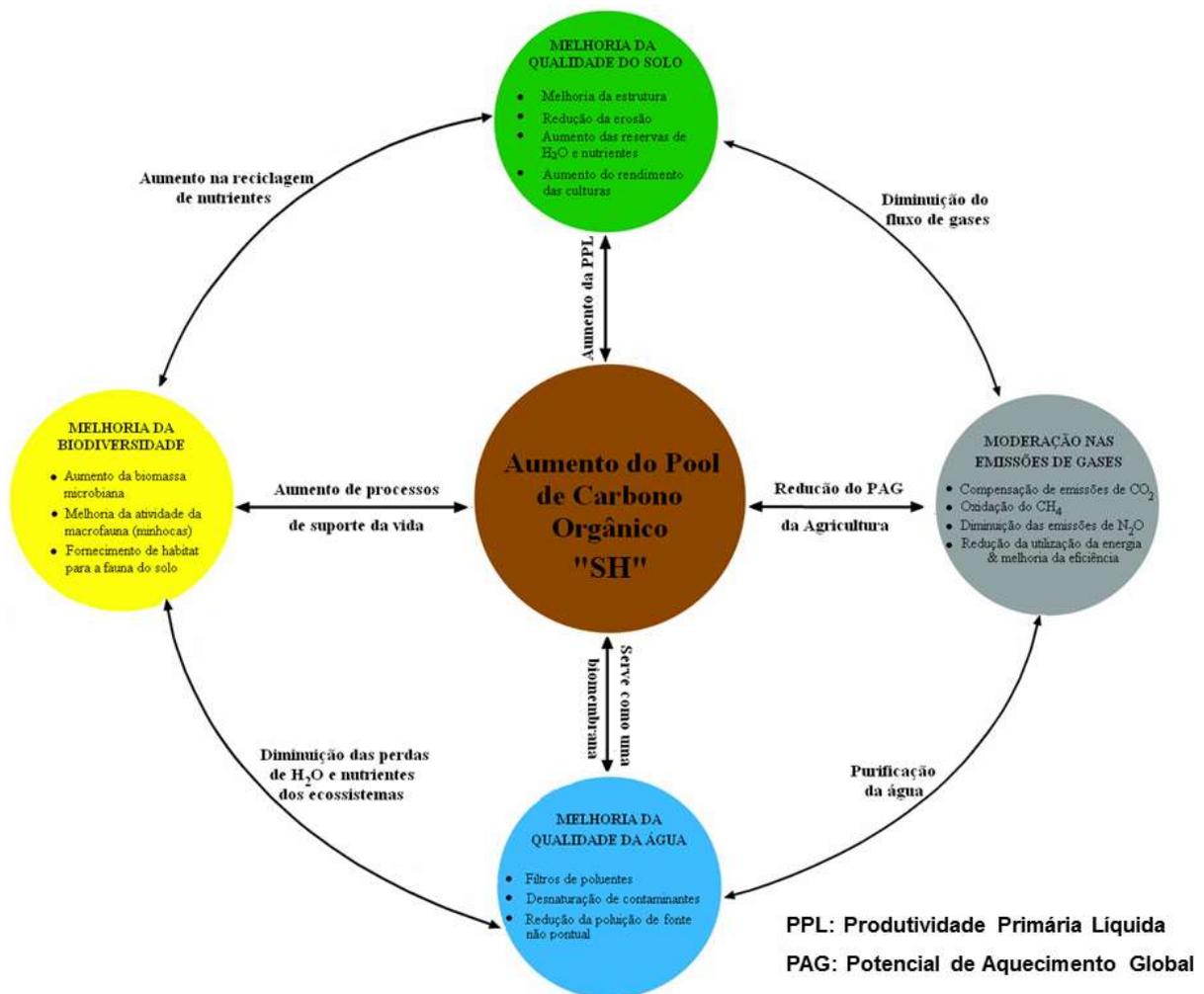
Atualmente, grande parte das orquídeas é reproduzida em meio assimbiótico, sem seu fungo micorrízico específico e isso impede sua reintrodução eficaz, não garantindo a germinação de sementes e o estabelecimento das plântulas na natureza (Rasmussen, 1995; Otero *et al.*, 2007).

#### 4.5. Infecção e Colonização

Na infecção, uma hifa de um fungo compatível ao entrar em contato com a semente atravessa a testa pela micrópila ou por falhas no tegumento (Peterson *et al.*, 1998; Peterson *et al.*, 2004). Dentro da semente, a hifa é atraída pelo suspensor do embrião (Arditti, 1992; Peterson *et al.*, 1998; Peterson *et al.*, 2004). Dentro do embrião, o fungo micorrízico tem as hifas enoveladas que são estruturas chamadas de pelotons. Os pelotons podem chegar a ocupar a maior parte do espaço celular, o que faz com que haja uma grande superfície de contato entre os simbiontes (Peterson *et al.*, 2004). A maioria das células é colonizada, exceto aquelas de onde surge o meristema apical. O embrião cresce através de divisões celulares e ganha volume, formando o protocormo. Com o tempo os pelotons mais antigos são degradados, resultando em amontoados de hifas lisadas. As hifas são recobertas por material similar ao da parede celular vegetal que as isolam do citoplasma do hospedeiro, garantindo que não haja um colapso no citoplasma das células da raiz enquanto ocorre a degradação (Peterson *et al.*, 2004).

#### 4.6. *Substâncias Húmicas*

Os principais constituintes da matéria orgânica são as substâncias húmicas (SH), que são consideradas uma mistura complexa da matéria orgânica morta sem características estruturas bem definidas. Estas substâncias têm papel importante na manutenção das características químicas, físicas e biológicas do solo, principalmente por possuírem grande capacidade de retenção de calor, influência na germinação e formação de raízes, além de estarem diretamente ligadas no transporte de compostos orgânicos no ambiente (Moraes & Rezende, 2004). Dentre as principais frações orgânicas, os ácidos húmicos (AH) são predominantemente hidrofóbicos e solúveis somente em pH básico; os ácidos fúlvicos (AF), são pequenas moléculas hidrofílicas associadas de forma que existam grupos funcionais ácidos, suficientes para mantê-los dispersos em qualquer valor de pH e as huminas (H) são insolúveis em todas as faixas de pH por estarem intimamente ligadas a fração mineral dos substratos orgânicos. Tais frações podem afetar diretamente ou indiretamente o desenvolvimento e metabolismo das plantas, principalmente o sistema radicular, além de influenciar em diversos processos centrais na funcionalidade do ecossistema do solo incluindo a biodisponibilidade de poluentes e a atividade biológica (Rosa *et al.*, 2009; Piccolo, 1996) (Figura 3). As SH, quando em solução, possuem efeito detergente influenciando diretamente no controle da permeabilidade da membrana plasmática vegetal. Tal controle está intimamente relacionado à manutenção da seletividade da Membrana Plasmática, fator fundamental para a manutenção da homeostase celular (Canellas *et al.*, 2002).



**Figura 3.** Processos centrais da matéria orgânica/SH sobre o funcionamento e qualidade dos ecossistemas (construído a partir de Rosa *et al.*, 2009 e Piccolo, 1996).

#### 4.7. Substâncias húmicas e microrganismos promotores do crescimento

As SH têm a capacidade de aumentar a taxa de crescimento de muitas formas de microrganismos benéficos, em parte, através da estimulação de atividades enzimáticas (Pouneva, 2005; Burkowska e Donderski, 2007), agindo como um serviço de transporte de elétrons que ajudam os organismos anaeróbicos a crescer, ajudando-os assim a reduzir compostos orgânicos e metais. Com isso, também há um aumento da taxa de crescimento e das populações de microrganismos benéficos ao redor das raízes das plantas, bem como o incremento da atividade de enzimas do solo como a catalase e as fosfatases ácida e alcalina (Finneran *et al*, 2002; Sellamuthu & Govindaswamy, 2003).

Estudos indicam que as SH podem representar um componente estimulador de microrganismos que vivem no ambiente do solo, melhorando, por exemplo, a absorção de água e nutrientes e o desempenho da associação com as plantas por fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos respectivamente (Gryndler *et al.*, 2005, Hrselová *et al.*, 2007). As SH retardam o crescimento de bactérias patogênicas, enquanto melhora o crescimento de microrganismos benéficos. Estudos têm demonstrado que taxas específicas de crescimento, rendimento de crescimento e atividade enzimática de microrganismos patogênicos diminuem acentuadamente com o aumento da concentração de ácidos húmicos e fúvicos ao substrato de cultivo (Alexander *et al.*, 2008; Imai *et al.*, 1999a; Loffredo *et al.*, 2008). Segundo estudos de Young *et al.* (2006) as SH também têm sido utilizadas para aumentar a taxa de sobrevivência e longevidade de vários inóculos de bactérias promotoras do crescimento de plantas, podendo ser armazenadas para o uso em futuras culturas.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Coleta das raízes, sementes (cápsulas), fungos e material húmico utilizados.

#### 5.1.1. Raízes

As coletas de raízes para isolar os fungos para o experimento foram provenientes da espécie *Brassavola tuberculata* (subtribo Laeliinae) e realizadas na área de preservação permanente (APP) Morro do Moreno. Este fragmento de Mata Atlântica e afloramento rochoso estão inseridos em área urbana próximo ao litoral da cidade de Vila Velha, nas coordenadas 20°19'32.75"S e 40°16'36.91" W com altitude máxima de 189,9 metros e mínima ao nível do mar (IJSN 1990; Magnano *et al.*, 2007). As amostras de raízes foram cortadas em segmentos e em seguida acondicionadas em recipientes identificados e levadas imediatamente para o laboratório a fim de manter íntegras suas características para posteriores análises laboratoriais. A identificação das espécies de orquídeas foi realizada com auxílio de chaves de identificação.

#### 5.1.2. Sementes de *B. tuberculata*

As cápsulas de *B. tuberculata* maduras utilizadas no trabalho foram coletadas em uma área particular do município de Vila Velha em outubro de 2013, tais cápsulas foram devidamente identificadas e armazenadas em geladeira a 4°C para posterior utilização nos experimentos.

#### 5.1.3. Fungos

Um isolado de *Tulasnella* spp. (M65 de *Epidendrum secundum* Jacq. (subtribo Laeliinae) pertencente à Coleção de Fungos Micorrízicos de Orquídeas do Laboratório de Associações Micorrízicas (Departamento de Microbiologia/ BIOAGRO/ UFV), foi cedido para ser utilizado nos experimentos dessa dissertação. A utilização desse fungo foi importante devido a sua eficiência comprovada em produzir protocormos em estágios mais avançados de desenvolvimento da semente, quando comparados com outros isolados (Pereira *et al.*, 2009). Em adição foram utilizados mais dois fungos de *Tulasnella* spp., o NTBTA e o NTBTC, que foram isolados das raízes de *B. tuberculata*.

#### 5.1.4. *Substâncias Húmicas*

As SH utilizadas nessa dissertação foram oriundas da extração de um substrato orgânico denominado de vermicomposto. O procedimento de extração, bem como a reconhecida bioatividade de tal material húmico sobre plantas estão descritos no trabalho desenvolvido por Dobbss *et al.* (2010).

#### 5.2. *Análise anatômica da colonização da associação micorrízica*

As raízes das espécies *B. tuberculata* coletadas foram cortadas transversalmente em reduzida espessura, com auxílio de lâmina de aço inoxidável e utilização de pinças sob o microscópio estereoscópico Stereozoom Bel Photonics. Os cortes foram submetidos à coloração com azul de tripano diluído em água deionizada na proporção de 1:10, para evidenciar hifas e pelotons no sistema radicular. Os registros fotográficos e observações foram realizados em Microscópio Biológico Invertido Optech Bel Photonics, com acoplamento para câmera fotográfica digital Sony Cyber-Shot DSC-W320.

#### 5.3. *Isolamento de pelotons*

As raízes amostradas foram cuidadosamente lavadas em água corrente e desinfetadas superficialmente pela imersão consecutiva em etanol 70% por um minuto, solução de hipoclorito 20% diluído em água deionizada (0,5% de cloro ativo) por 4 minutos e lavados cinco vezes em água destilada autoclavada. Os segmentos foram seccionados transversalmente com auxílio de um microscópio estereoscópico, para observação da colonização pelo fungo micorrízico. Das secções transversais dos segmentos de raízes contendo pelotons foi descartado o velame com auxílio de duas agulhas esterilizadas. Estes fragmentos de córtex colonizados foram lavados novamente em água esterilizada e depois transferidos para placas de petri contendo 15 ml de meio BDA (Batata Dextrose Agar) regulado para pH 5,6, previamente autoclavados. Em cada placa de petri foram colocados até cinco fragmentos contendo pelotons. As placas foram monitoradas diariamente para observação do crescimento do micélio fúngico. Após 31 dias foram retirados discos de 9,0 mm de diâmetro das bordas do micélio fúngico e transferidos para uma nova placa contendo o mesmo meio de cultura. Destas placas foram pré-selecionados e cultivados os fungos com características semelhantes aos agrupados no gênero *Rhizoctonia* (Pereira *et al*, 2005b).

#### 5.4. Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi realizada para os isolados obtidos de *B. tuberculata* (NTBTA e o NTBTC) através de parâmetros quantitativos e qualitativos descritos em Pereira (2006). Para isso, os isolados fúngicos foram incubados em meio BDA e CMA (Corn Meal Agar).

O isolado M65 não teve as caracterizações morfológicas analisadas nesta dissertação, uma vez que as mesmas foram realizadas previamente e descritas por Pereira *et al.* (2009).

##### 5.4.1. Características quantitativas e qualitativas dos isolados seguido de medições em meios de cultura BDA e CMA

As placas previamente identificadas como NTBTA e NTBTC foram repicadas em 5 placas para cada morfotipo à temperatura constante de 26 °C em Estufa Incubadora B.O.D. (demanda bioquímica de oxigênio) e monitorado diariamente o diâmetro para acompanhamento do crescimento do micélio fúngico por 32 dias no meio BDA e 15 dias no meio CMA. No total, o experimento conteve 25 placas de meio BDA e CMA. Para as medições, foram feitas linhas perpendiculares nos sentidos horizontal e vertical das placas de petri.

Para os isolados cultivados nos meios, foram levadas em consideração as características visuais do micélio fúngico que permitiu identificar os morfotipos de acordo com os seguintes critérios: coloração do micélio fúngico (branca, creme ou marrom), aspecto da colônia (grumoso, aveludado ou liso), margem da colônia (definida ou indefinida) micélio aéreo (presente ou ausente), zoneamento da borda do micélio (rendilhado ou circular) (Currah, 1986; Currah *et al.*, 1987; 1997; Currah & Zelmer, 1992; Zelmer & Currah, 1995; Pereira *et al.*, 2005a)

#### 5.5. Isolamento de células Monilióides

Observações da presença de células monilióides foram realizadas em meio de aveia CMA modificado. Este meio induz o desenvolvimento de propágulos de resistência que são cadeias de células infladas, denominadas células monilióides e este meio CMA, permite observar a presença de ramificações de suas hifas em ângulo de noventa graus e constrição do septo próximo ao ponto de ramificação conforme descrito por Zelmer & Currah (1995). As placas foram mantidas em temperatura ambiente de 26°C por 40 dias. Após este período foram retiradas as

lamínulas com hifas fúngicas e em seguida coradas com Azul de Tripiano para observação e registro fotográfico das células monilióides e outras características morfológicas com auxílio de Microscópio Biológico Invertido Optech Bel Photonics, com acoplamento para câmera fotográfica digital Sony Cyber-Shot DSC-W320.

#### 5.6. Caracterização molecular

A extração do DNA total dos isolados fúngicos foi realizada na Universidade Federal de Viçosa utilizando-se o Kit Invisorb® Spin Plant Mini (Invetec), segundo instruções do fabricante. A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 0,8 % (p/v) e a quantificação realizada por espectrofotometria. Todas as amostras foram submetidas à amplificação por PCR. De modo a proceder à amplificação, em cada tubo de reação foi adicionado: 5,0 µL de tampão 5x *Colorless* Go Taq TM, 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 200 µm de cada dNTP, 0,25 µL de Go Taq DNA Polimerase (Promega) (5uM / µL), 1,0 µL de cada oligonucleotídeo (5mM). Para amplificar a região ITS (Espaçadores Internos Transcritos) foi utilizado os primers ITS1/ITS4, porém para melhor resultado foi repetido com o primer ITS4Tul (White, 1990). O sucesso das amplificações por PCR foi testada em agarose 1,5 %, corado em uma solução de brometo de etídio 0,5 µgml<sup>-1</sup>. Os produtos de PCR de qualidade satisfatória foram sequenciados bidireccionalmente por MacroGen Company Inc., Coreia do Sul, em ciclos efetuados utilizando-se o sequenciador automático Big Dye TM e 3730xl (Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemanha). O M65 teve sua caracterização molecular realizada previamente por Pereira *et al.* (2009) denominada *Tulasnella spp.*, que é um dos principais gêneros teleomórficos de fungos orquidóides.

#### 5.7. Interação fungos micorrízicos - substâncias húmicas

Para observar a influência da SH no crescimento dos fungos, isolados dos 3 morfotipos de fungos (NTBTA, NTBTC e M65) tiveram micélios de 9 mm de diâmetro retirados das extremidades das culturas puras com 20 dias de crescimento e transferidos para novas placas de petri contendo 20 ml de meio BDA (Botato Dextrose Agar) suplementados com diferentes doses de SH: 0,0 (controle); 50; 100; 250 e 500 mg L<sup>-1</sup>, tendo 5 repetições pra cada tratamento. O disco de 9,0 mm foi posicionado no centro de cada placa de petri e o crescimento micelial radial foi medido diariamente, durante 30 dias, com auxílio de um paquímetro manual.

## 5.8. Germinação e crescimento de plântulas e Interação Fungo-SH

### 5.8.1. Germinação e crescimento das plântulas

Após a cápsula madura ser aberta, foram pesadas 200 µg de sementes de *B. tuberculata*, as sementes foram desinfestadas usando NaClO por 10 min e lavados 3x com água destilada utilizado o método de Lemos *et al.* (2011) modificado. As sementes foram transferidas para um béquer com 20 ml de água sob agitação constante. Usando uma pipeta Pasteur foi retirado 400 µL da solução com sementes para inocular nos meios contendo os morfotipos de fungos (NTBTA, NTBTC e M65), cada fungo conteve 25 placas de petri inoculadas com micélio fúngico. O meio de cultura básico utilizado foi o OMA (Aveia-Agar modificado) contendo 10 g L<sup>-1</sup> de Agar e pH 5,6. As placas foram armazenadas em sala climatizada e com fotoperíodo regulado (Dixon, 1987).

### 5.8.2. Interação Fungo-SH e crescimento de plântulas

Após a germinação das sementes de *B. tuberculata*, o isolado escolhido para interagir com as diferentes concentrações de SH foi o do fungo M65, por ter a maior taxa de germinação de sementes e o tempo de germinação 2x mais rápido quando comparado com os isolados NBTA e NBTC, conforme será mostrado nos resultados. Foram escolhidas plântulas de *B. tuberculata* no estágio 3 (formação da segunda folha) e o cultivo foi realizado em placas de petri contendo 250 ml de meio de cultura OMA com cinco explantes por placa mais a adição das diferentes concentrações de SH (0, 50, 100, 250 e 500 mg L<sup>-1</sup>) totalizando 25 placas, sendo 5 placas por tratamento. As plântulas foram mantidas por 65 dias nos tratamentos com observações a cada 10 dias, para observação da emissão radicular e posteriormente número de raízes.

## 5.9. Extração Proteica

Após os 65 dias, foram pesados um grama (1,0 g) de amostra de plântulas de *B. tuberculata* por tratamento, maceradas em N<sub>2</sub> e adicionados 4 mL de tampão TRIS (1,0 mol L<sup>-1</sup>). A solução foi submetida à agitação durante 2 horas a 4°C e então centrifugada a 15.400 xg por 20 min a 4°C, descartando-se o precipitado. Foi adicionado sulfato de amônio a 90% de saturação e deixado overnight a 4°C. A adição de sulfato de amônio na extração de proteína é conhecida por ser útil na

concentração de soluções diluídas de proteína e no fracionamento de mistura de proteínas (Lima *et al.*, 2007). Após esse tempo o material foi centrifugado a 15.400 xg por 20 min a 4°C e descartado o sobrenadante. Foi adicionada água destilada para ressuspender o precipitado. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 xg por 8 min e o sobrenadante dializado e liofilizado para posterior análise da expressão proteica.

#### 5.9.1. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O gel de SDS-PAGE foi preparado usando as proporções apresentadas na Tabela 1. É importante explicitar que no preparo do gel, após a montagem das placas (Mini Protean II), aplicou-se o gel fracionador e 200 µL de H<sub>2</sub>O deionizada, impedindo assim o contato do gel com o ar durante a polimerização, cujo tempo é de aproximadamente 30 min. Depois de decorrido o tempo de polimerização, a água adicionada foi eliminada e foi adicionado o gel concentrador preparado como apresentada na Tabela 1. Para o preparo do gel foi utilizado uma solução estoque contendo acrilamida e bis-acrilamida 49,5%T, 3%C, e também o tampão do gel que contém Tris 3,0 M em SDS 0,3% e pH ajustado para 8,45.

**Tabela 1.** Preparo dos géis: Fracionador (16%); Concentrador (4%) utilizando a solução estoque de acrilamida.

Solução	Função	Gel Fracionador (16%) Volume	Gel Concentrador (4%) Volume
Acrilamida + Bis-acrilamida (49,5%T; 3%C)	Agente deligação cruzada	2,5 mL	250 µL
Tampão do gel (Buffer - Tris HCl 3,0 M)	Eletrólitos do meio Tris +, Cl-	2,5 mL	0,76 mL
Glicerol	-	0,8 mL	-
Persulfato de amônio (10%)	Gerador de radicais livres	25 µL	50 µL
TEMED	Catalisador	2,5 µL	5 µL
H <sub>2</sub> O	-	1,7 mL	2,1 mL

Um pente de teflon (1mm) foi colocado imediatamente após a aplicação do gel concentrador e aguardou-se 30 min para a sua completa polimerização. Depois de decorrido o tempo necessário, o pente foi cuidadosamente retirado, e formaram-se pequenas cavidades para a aplicação das alíquotas da solução contendo as proteínas extraídas. A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e utilizando tricina como “trailing” íon foi feita de acordo com Schagger e Von Jagow (1987) com algumas modificações. Utilizou-se uma concentração de acrilamida de 16%T; 3%C para o gel fracionador e uma concentração de 4%T, 3%C para o gel concentrador. Trabalhou-se com dois tampões de corrida, sendo um tampão do catodo contendo Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M em SDS 0,1% e o outro tampão para anodo, contendo Tris 0,2 M, com pH 8,9. O tampão de anodo foi colocado na base da cuba e denominado “tampão de fora”, já o catodo foi colocado no interior da cuba e denominado “tampão de dentro”. A corrida foi realizada em temperatura ambiente em um sistema Mini Protean II Biorad, durante aproximadamente 2 h e 45 min, utilizando uma corrente de 10 mA para cada gel individualmente até a “linha de frente” atingir o gel fracionador, quando aumentou-se a corrente para 20 mA. Após a corrida, o gel foi lavado com água por 15 min (2 vezes) e mantidas em solução fixadora contendo metanol, ácido acético, água (40:10:50%) v/v por 30 min. Esta solução foi então descartada e adicionou-se solução contendo Coomassie Brilliant Blue R 250 0,25 % por 1 h sob leve agitação. Os géis foram então descorados com solução de ácido acético 10% (v/v) trocando esta solução a cada intervalo de 30 min até se atingir a visualização das bandas protéicas.

#### 5.10. *Análises dos dados*

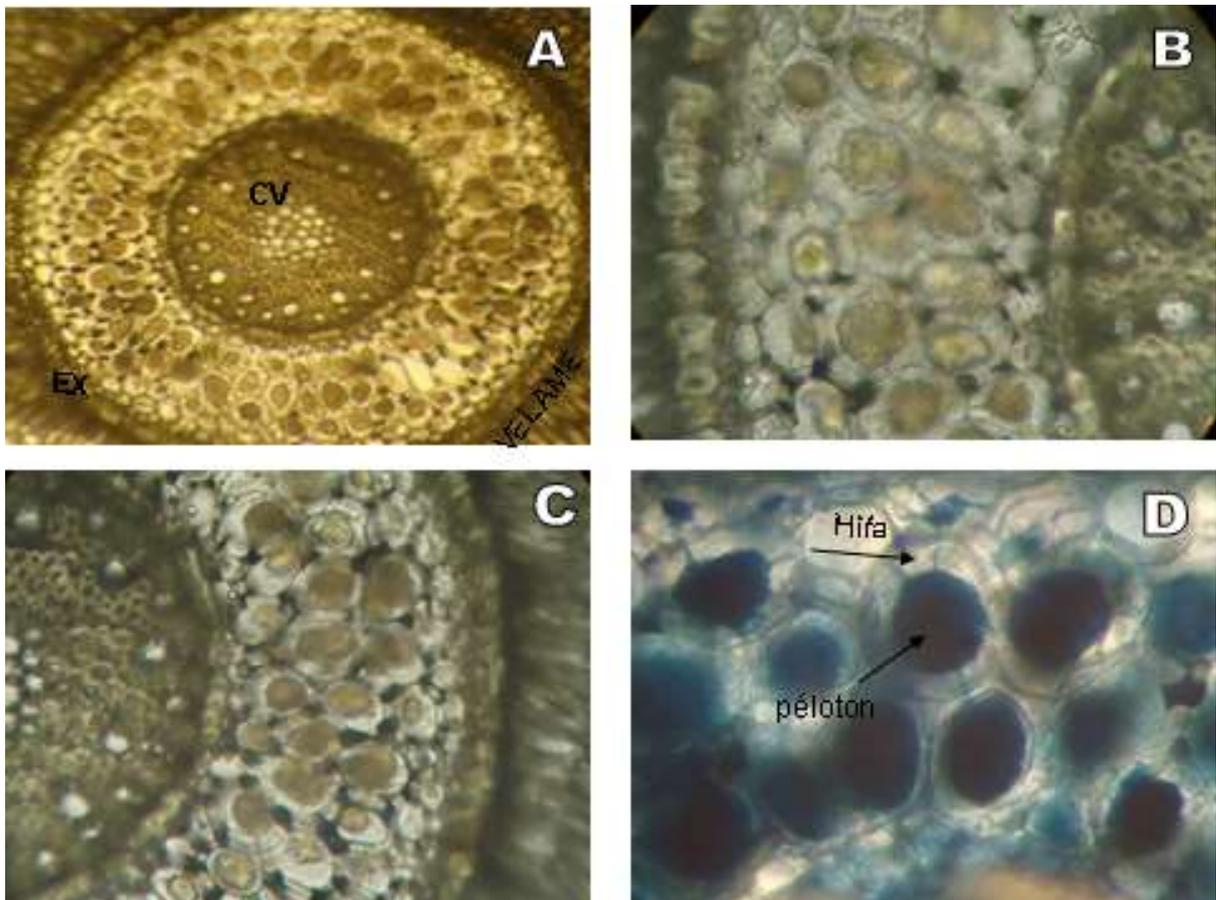
Todos os experimentos foram realizados em delineamento experimental inteiramente casualizado. O teste de Kappa<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ) foi utilizado para avaliação da normalidade dos dados. Quando normais, os dados foram submetidos a uma análise de variância e posteriormente comparados pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Análises de colonização da associação micorrízica na espécie *B. tuberculata*

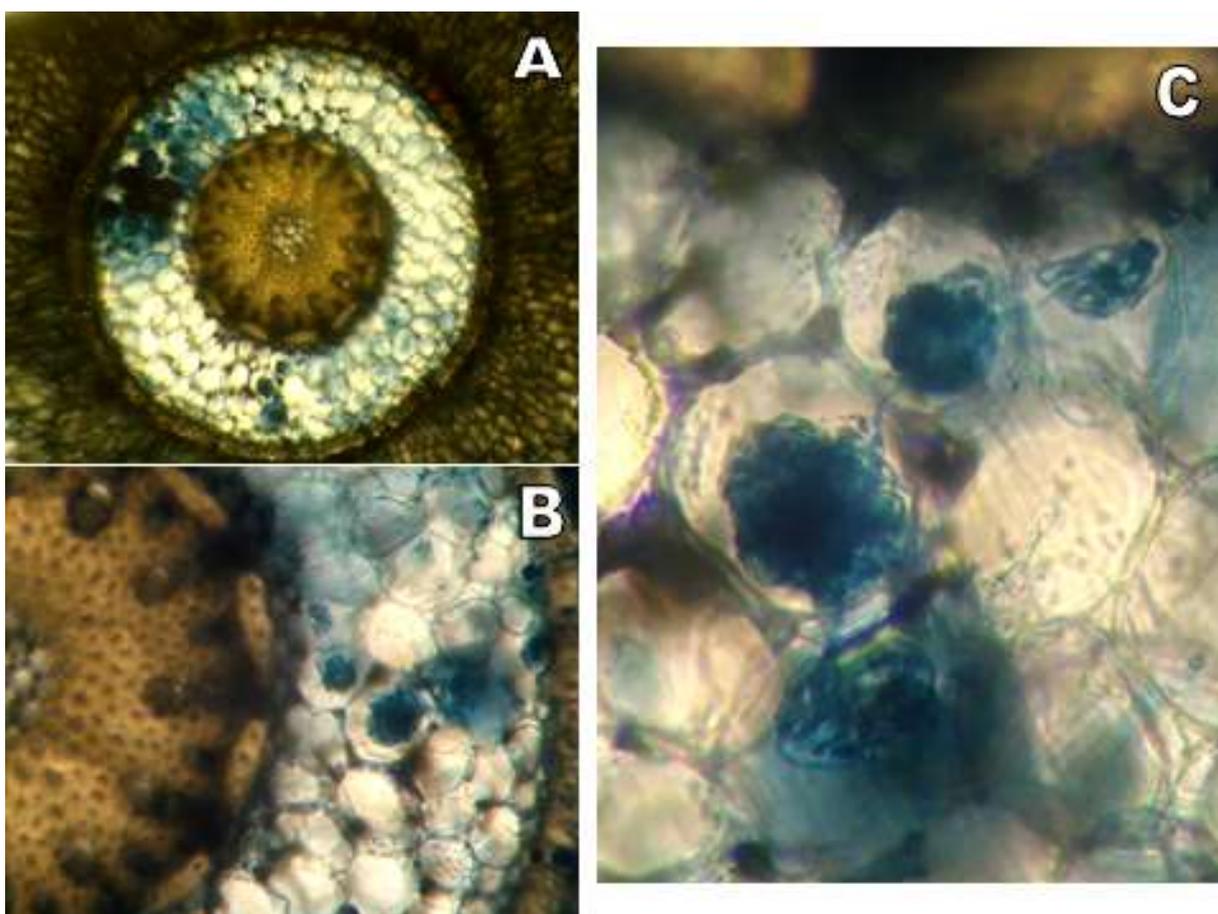
As observações realizadas em microscópio óptico revelaram a presença de pelotons nos cortes transversais das raízes de *B. tuberculata*. A distribuição dos pelotons ocorreram colonização alternada no mesmo segmento de raízes das espécies analisadas (Pereira *et al.*, 2005b).

A Figura 4 (A, B, C) mostra em cortes transversais de raízes, sem coloração por Azul de Tripiano, a presença de pelotons por toda extensão do córtex. Enquanto que em (D), a região do córtex das raízes coradas, evidencia os pelotons e as hifas.



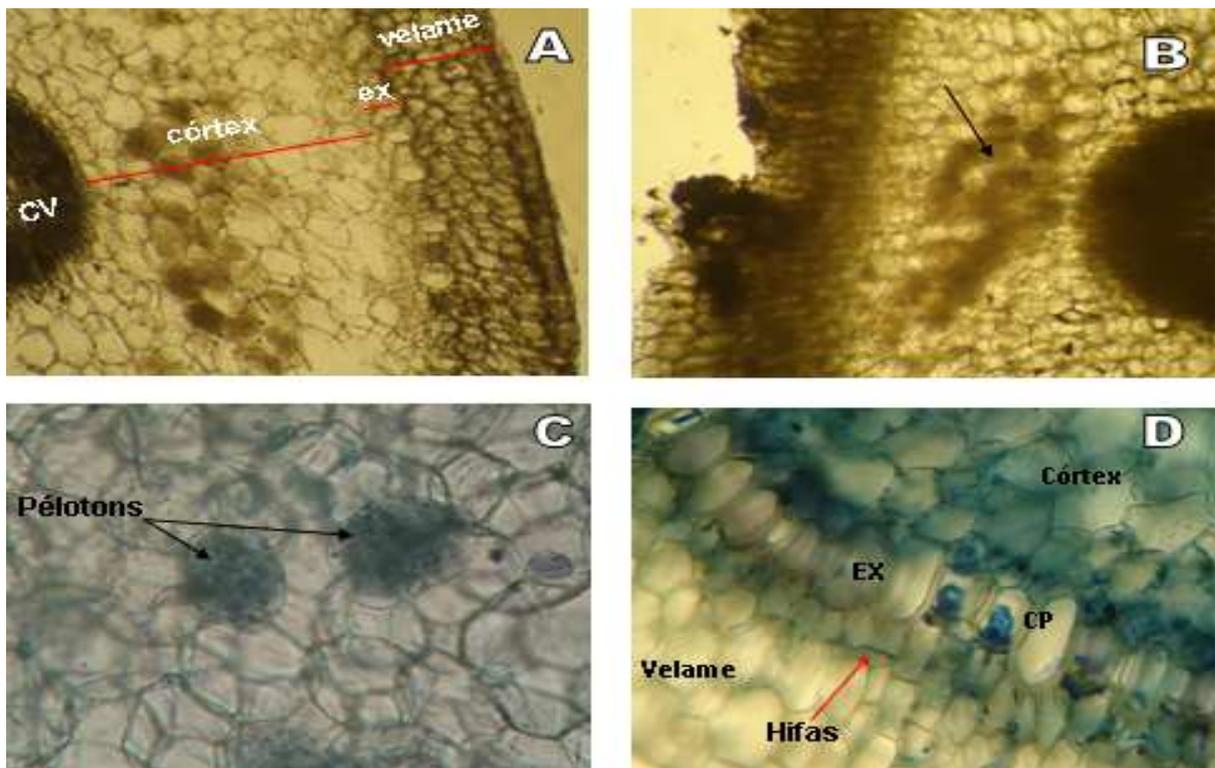
**Figura 4.** Cortes transversais de raízes de orquídeas (A, B, C) e presença de pelotons (corados com Azul de Tripiano) em toda a região do córtex (D). CV: Câmbio Vascular; EX: Exoderme. (A): Aumento de 40x; (B), (C): Aumento de 100x; (D): Aumento de 400x.

Quanto à colonização por hifas fúngicas (Figura 5A) os pelotons estavam dispostos intactos na área do córtex das raízes *B. tuberculata*, mas com uma colonização e concentração mais pontual. Segundo trabalhos realizados por outros grupos de pesquisa, pôde-se observar que a partir desses pelotons, novos pelotons são formados, podendo colonizar toda a região do córtex, sendo a colonização célula-a-célula) e estruturas na área intercelular são inexistentes, uma vez que a colonização é feita de forma intracelular (Zelmer *et al.*, 1996; Peterson *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2005c) (Figura 5A). Estas estruturas enoveladas de hifas estavam presentes em todos os estádios de desenvolvimento, podendo estar intactos ou degradados, evidenciados com coloração de Azul de Tripano (Figura 5B, Figura 5C). Pereira *et al.* (2009) em seu trabalho com isolamento de fungos micorrízicos em raízes de orquídeas, também observou colonização com pelotons intactos pelo segmento da raiz de *Epidendrum secundum*.



**Figura 5.** (A) Cortes transversais de raízes de orquídeas coradas com Azul de Tripano, evidenciando a colonização, aumento de 40x. (B) Imagem focando os pelotons em diferentes estádios de desenvolvimento, aumento de 100x. (C) Hifas passando de célula para célula, com formação de pelotons em vários estágios de desenvolvimento, aumento de 400x.

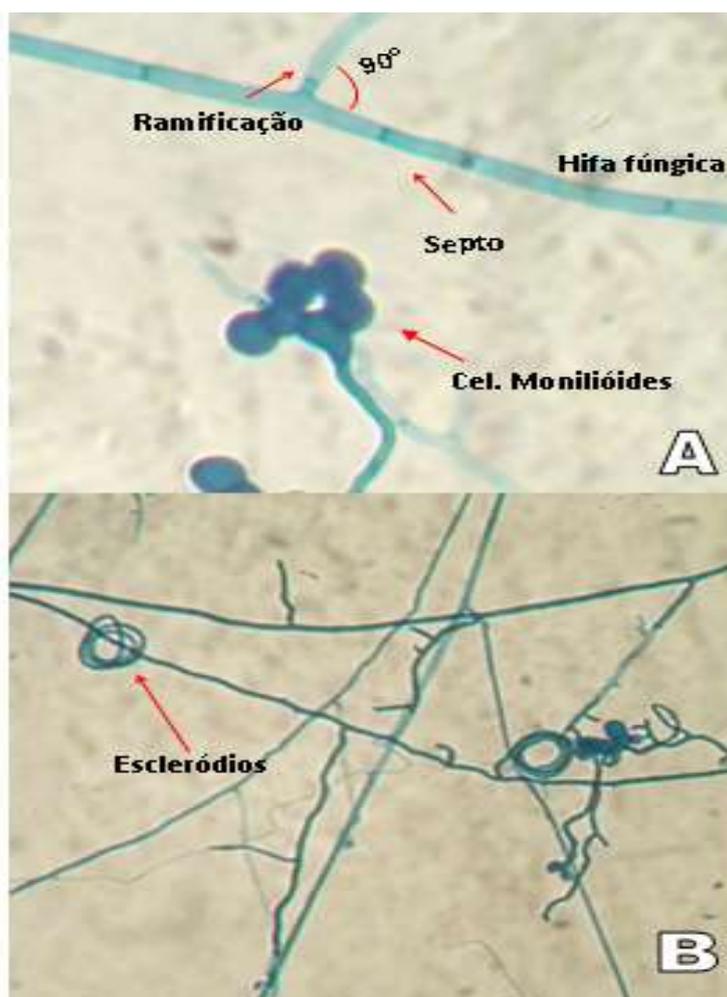
Foi possível a observação das estruturas que identificam a ocorrência de simbiose antes mesmo do processo de coloração (Figuras 6 A, B). Os cortes das raízes foram clareadas e coradas com Azul de Tripano para verificar a formação de estruturas fúngicas intracelulares (pelotons) que caracterizam a associação simbiótica micorrízica em orquídeas, tornando-as mais evidentes para melhor captura da imagem digital (Zettler, 1997) (Figura 6C). De acordo com a Figura 6D, podem-se observar hifas fúngicas nas células de passagem da exoderme, que são células de paredes mais delgadas mostradas na imagem, nas mesmas não foi observada colonização, possivelmente não havendo formação de pelotons, assim como não tem sido observada presença de arbusculos ou vesículas em exoderme nas associações micorrízicas do tipo arbuscular (Peterson *et al.*, 2004). Essas células permitem, portanto, além da passagem de água e nutrientes, a penetração do fungo nas células corticais para ter acesso ao córtex. Isso sugere que as orquídeas controlam o processo de infecção e que o fungo está adaptado a esse controle (Arditti, 1992; Pereira *et al.*, 2005c).



**Figura 6.** Cortes transversais de raízes de orquídeas sem coloração por azul de tripano, evidenciando as estruturas da raíz, onde em (A) se faz presente o velame, a exoderme (EX), córtex e o câmbio vascular (CV). (B) Pelotons em estádios de desenvolvimento, podendo estar intactos e degradados. Em (C) e (D) a partir da coloração com azul de tripano evidenciam-se os pelotons (C) e a presença de hifas fúngicas atravessando a exoderme usando as células de passagens (CP) sentido ao córtex (D). (A) e (B) aumento de 100x; (C) aumento de 400x; (D) aumento de 100x.

## 6.2. Isolamento e identificação dos isolados

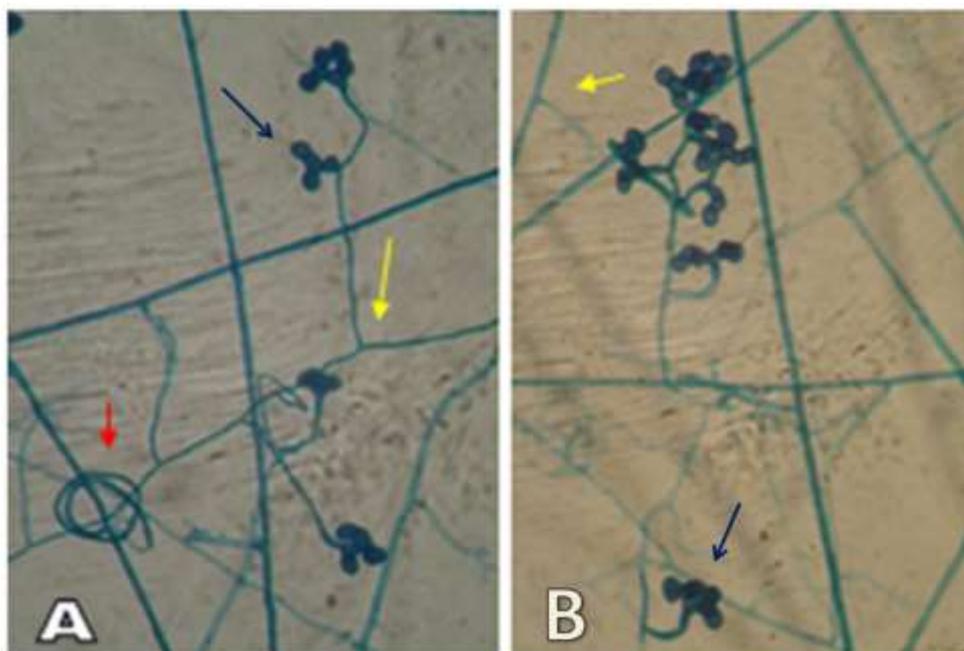
Após o crescimento dos isolados em meio de cultura BDA e em meio CMA, com posterior análise microscópica foram encontradas características de fungos Rizoctonia, como hifa na região do septo, ramificação da hifa logo após o septo em ângulo reto, presença de propágulos de resistência chamados de células monilióides (Figura 7A) e presença de escleródios (Figura 7B).



**Figura 7. (A)** Características de fungos Rizoctonia: hifa na região do septo, ramificação da hifa logo após o septo em ângulo reto, presença de propágulos de resistência chamados de células monilióides; **(B)** Presença de escleródios. (A) Aumento de 400x; (B) aumento de 100x.

A Figura 8 mostra, através de análise de visualização microscópica, que todos os isolados da espécie de orquídea *B. tuberculata* (NTBTA e NTBTC) apresentaram características de fungos Rhizoctonia, ou seja, constrição da hifa

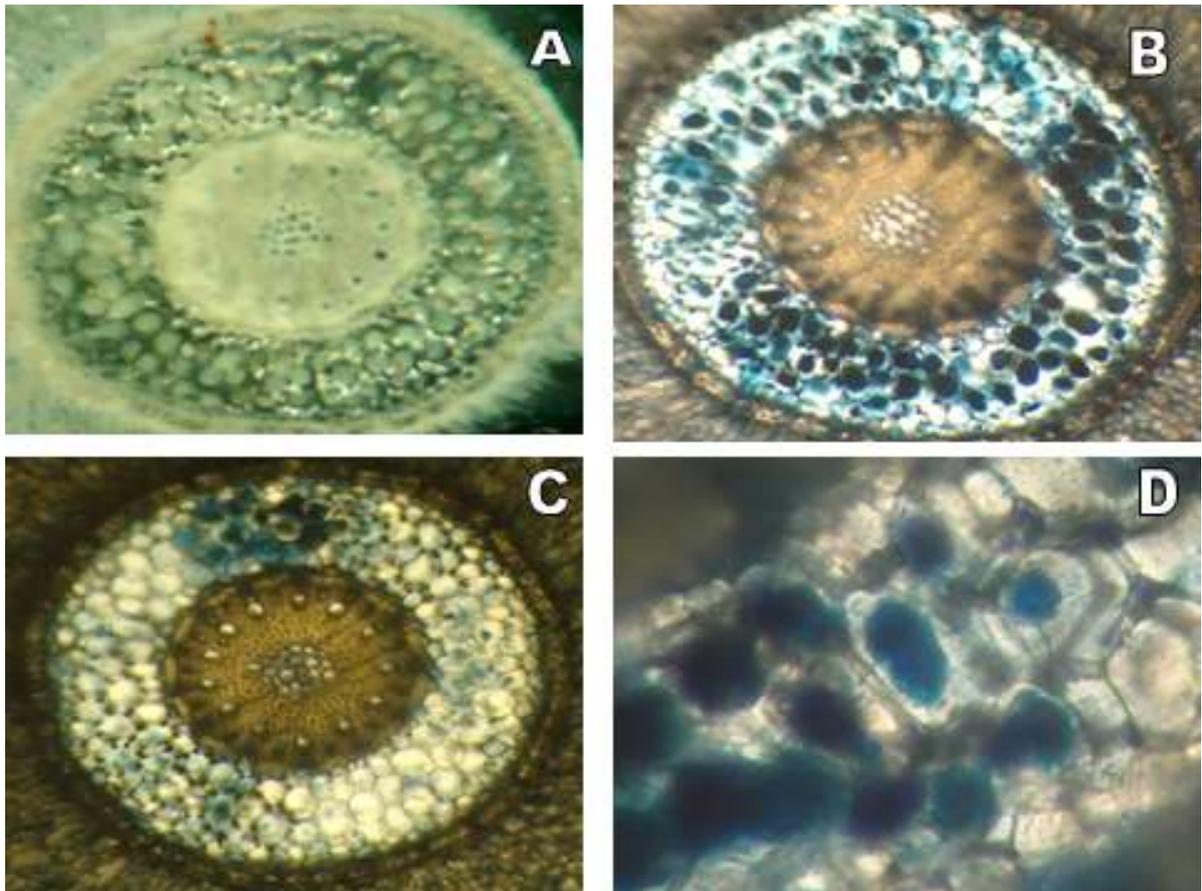
vegetativa na região do septo, ramificação após o septo em ângulo reto e formação de células monilióides (Currah & Zelmer, 1992; Rasmussen, 1995; Andersen & Rasmussen, 1996; Taylor *et al.*, 2002).



**Figura 8.** Fungos Rhizoctonióides isolados com presença constrição da hifa na região do septo, presença de escleródios (seta vermelha) e ramificação da hifa logo após o septo e em ângulo reto (seta amarela); (A) Células monilióides do NTBTA (seta azul); (B) Células monilióides do isolado NTBTC (seta azul). Aumento de 100x.

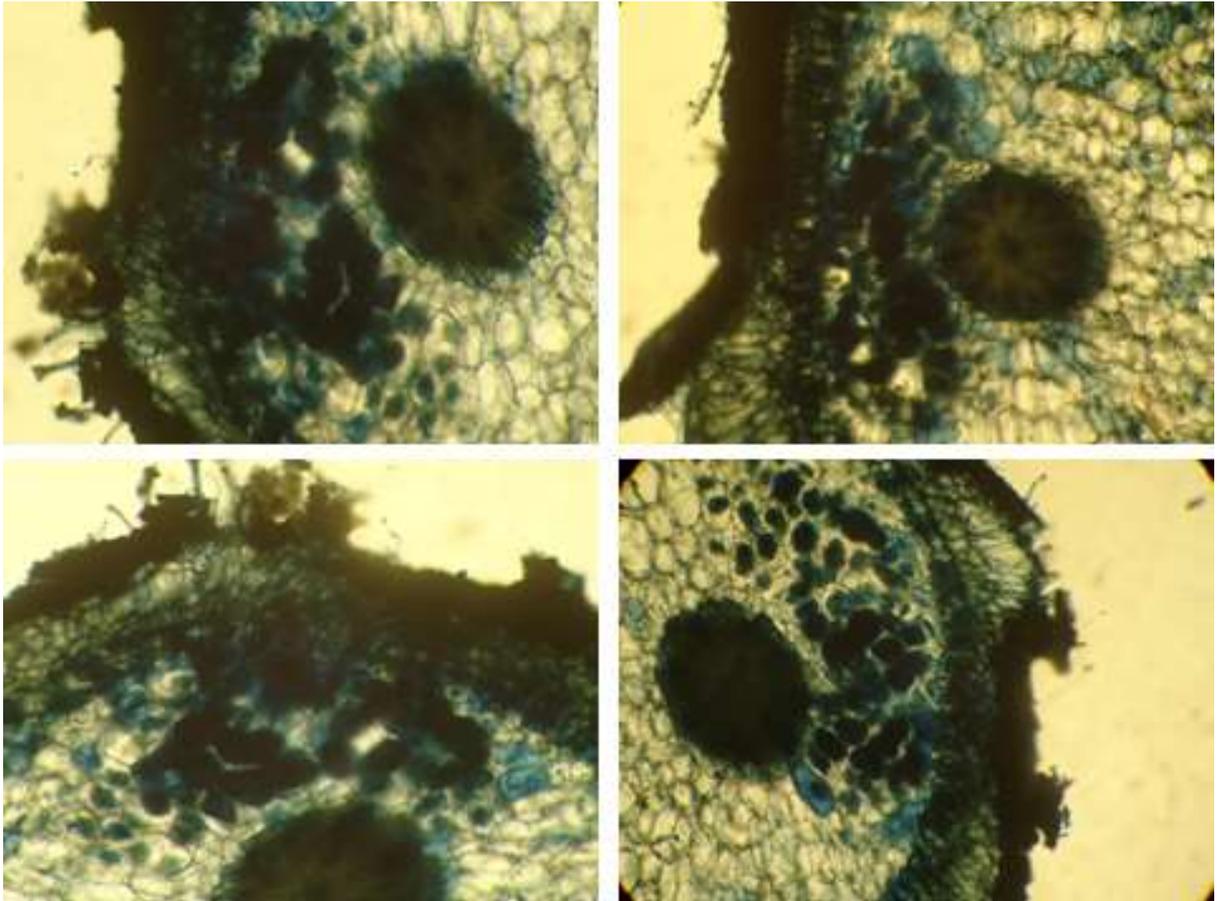
### 6.3. *Brassavola tuberculata*

Observando a Figura 9, a maioria dos fragmentos de raízes estava densamente colonizada por pelotons, que ocupavam boa parte da região do córtex Figura 9 (A, B). Os fragmentos de raízes colonizadas foram facilmente diferenciados dos fragmentos não colonizados ou pouco colonizados (Figura 9 C). Uma melhor visualização foi confirmada com coloração de Azul de Tripano nos segmentos de cortes de raízes analisados em microscópio biológico invertido com aumento de 400 vezes. Pelotons intactos e degradados foram observados em raízes de *B. tuberculata* (Figura 9 D).



**Figura 9.** (A) Colonização de fungos micorrízicos em raiz da *B. tuberculata*. Observa-se uma maior colonização de pelotons em toda circunferência da região do córtex em natura e em (B) com o tratamento de coloração de Azul de Tripano. No corte de raiz (C) observa-se uma colonização mais pontual. (D) Visualização dos pelotons e as hifas na região cortical. (A), (B), (C) Aumento de 40X; (D) Aumento de 400x.

Algumas raízes coletadas de *B. tuberculata* apresentavam injúrias, que eram localizadas na região na qual a raízes tiveram contato direto com o substrato, como se observa na Figura 10, e são consideradas áreas em potencial para ocorrência da infecção. Foi observado que a região mais concentrada de pelotons se localizava nas áreas rentes as injúrias das raízes. Vários pontos de colonização foram observados em um mesmo fragmento radicular, indicando que as plantas são colonizadas por propágulos de fungos no solo, e não somente por fungos associados desde a germinação. O fungo que iniciou o processo de germinação não é necessariamente o mesmo da fase adulta, ocorrendo assim uma sucessão (McCormick *et al.*, 2004; Peterson & Massicotte, 2004), assim como, diferentes espécies de fungos podem colonizar o sistema radicular simultaneamente (Zelmer *et al.*, 1996).



**Figura 10.** Corte transversal de raiz de *B. tuberculata* após tratamento com Azul de Tripano sob colonização de pelotons e local de contato com o substrato sendo o local de infecção fúngica, sugere que o habito da espécie esta ligada à disposição dos pelotons no córtex da raiz. Aumento de 100x.

Quanto à forma de colonização, ficou demonstrado que na espécie *B. tuberculata* ocorre maior colonização de pelotons em toda circunferência da raiz (Figura 4A) ou mais localizado em regiões do córtex (Figura 10) (Pereira *et al.*, 2011). Trabalhos de vários autores e entre eles Otero (2005) e Rasmussen (2002), sugerem que a infecção pode ocorrer em áreas diferenciadas ao longo de um mesmo segmento de raiz, o que foi observado na análise radicular do presente trabalho.

#### 6.4. Caracterização Morfológica

##### 6.4.1. Caracterização morfológica qualitativa

De acordo com parâmetros qualitativos dos fungos após 32 dias de incubação em meio BDA (Tabela 2), os isolados NTBTA e NTBTC apresentaram cor creme e branca respectivamente e com micélio aéreo presente e aspecto aveludado.

**Tabela 2.** Características culturais dos isolados de *Brassavola tuberculata* (NTBTA e NTBTC) após 32 dias de incubação a 28°C em BOD.

Isolados	Cor	Aspecto	Margem	Micélio Aéreo	Zoneamento
NTBTA	Creme	Aveludado	Indefinida	Presente	Rendilhado
NTBTC	Branca	Aveludado	Definida	Presente	Circular

De acordo com a literatura, os fungos pertencentes ao gênero *Epulorhiza* apresentam colônia de coloração creme, crescimento lento, com margem da colônia submersa no meio, micélio aéreo escasso e aspecto mucoso, cotonoso ou aveludado (Currah & Zelmer, 1992), sendo, portanto, as características descritas acima (Tabela 2) indicativas de fungos rizoctonióides.

##### 6.4.2. Caracterização morfológica quantitativa

Foram avaliados diariamente o diâmetro do micélio fúngico durante 32 dias, para o cálculo das taxas de crescimento dos isolados em meio BDA e CMA, de acordo com Pereira *et al.* (2009). Foram observados que a média da taxa de crescimento foi maior significativamente no isolado NTBTC tanto no meio CMA quanto no meio BDA (Tabela 3). Com isso, pode sugerir que o NTBTC possa ser um fungo mais específico para os estágios iniciais de colonização, como por exemplo, a germinação de sementes de orquídeas, podendo depois ser substituído na raiz através de uma sucessão fúngica, uma vez que é conhecido que nem sempre os fungos que são mais eficientes na germinação, são os mais eficientes no desenvolvimento da planta, podendo então ser substituídos por fungos mais competitivos (McCormick *et al.*, 2004; Peterson & Massicotte, 2004).

**Tabela 3.** Dados quantitativos - Taxas de crescimento (TC) dos isolados, em meios BDA e CMA.

Isolados	TC BDA (mm dia <sup>-1</sup> )	TC CMA (mm dia <sup>-1</sup> )
NTBT A	1,47 b	3,03 b
NTBT C	1,88 a	3,10 a

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas representam diferenças significativas pelo Teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

De acordo com resultados obtidos e as características de grupos anamórficos de fungos rizoctonióides, a análise dos isolados obtidos na pesquisa em questão mostrou-se positiva para os isolados NTBTA e NTBTC. Quanto às características morfológicas quantitativas e qualitativas apresentadas pelos 2 isolados, pode-se afirmar que os mesmos são fungos rizoctonióides tais como observados em outros trabalhos (Olinto, 2002; Rasmussen, 2002; Pereira *et al.*, 2005b).

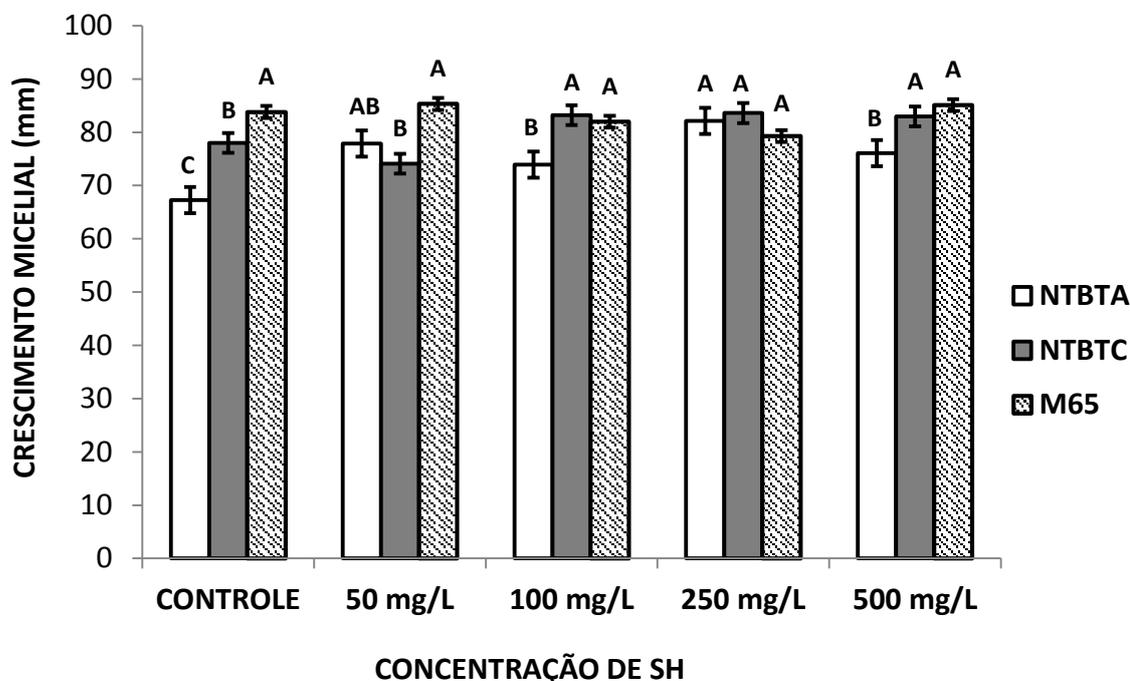
#### 6.5. Resultado de caracterização molecular

Com relação à caracterização molecular, os dois isolados (NTBTA e NTBTC) se apresentaram estreitamente relacionados com o teleomorfo *Tulasnella* spp. (anamorfo de *Epulorhiza*), após o procedimento de Biologia Molecular, confirmando assim, também a nível genético, que tais fungos devem ser considerados micorrízicos orquidóides. O gênero *Epulorhiza* R.T. Moore é considerado um dos 8 principais gêneros tipo-*Rhizoctonia*, assim como o *Ascorhizoctonia* Yang & Korf, *Ceratorhiza* R.T. Moore, *Chrysorhiza* Andersen & Stalpers, *Opadorhiza* Andersen & R.T. Moore, *Moliniopsis* Ruhland, *Rhizoctonia* D.C. e *Thanatophytum* Nees (Roberts, 1999).

#### 6.6. Crescimento diário (mm dia<sup>-1</sup>) dos micélios fúngicos em meio de cultura contendo SH.

De acordo com a Figura 11, pode-se observar que após os 16 dias de crescimento, quase todos os fungos na presença da SH permaneceram com um crescimento superior ao do controle. Existiram diferenças significativas entre os fungos e as diferentes doses de SH. É interessante notar que o fungo M65 se destacou quando comparado aos outros fungos (NTBTA e NTBTC), crescendo mais em todas as doses avaliadas, porém nas doses de 100, 250 e 500 mg L<sup>-1</sup> de SH sem diferenças significativas entre os demais fungos. Cabe destacar que na dose de 250

mg SH L<sup>-1</sup> não houve diferenças significativas entre os fungos (M65, NTBTA e NTBTC) mostrando que tal dose age estimulando o crescimento dos fungos na mesma proporção. Até mesmo o fungo NTBTA que cresceu significativamente menos em todas as doses (0, 50, 100 e 500 mg SH L<sup>-1</sup>) teve uma taxa de crescimento maior na dose de 250 mg SH L<sup>-1</sup>.



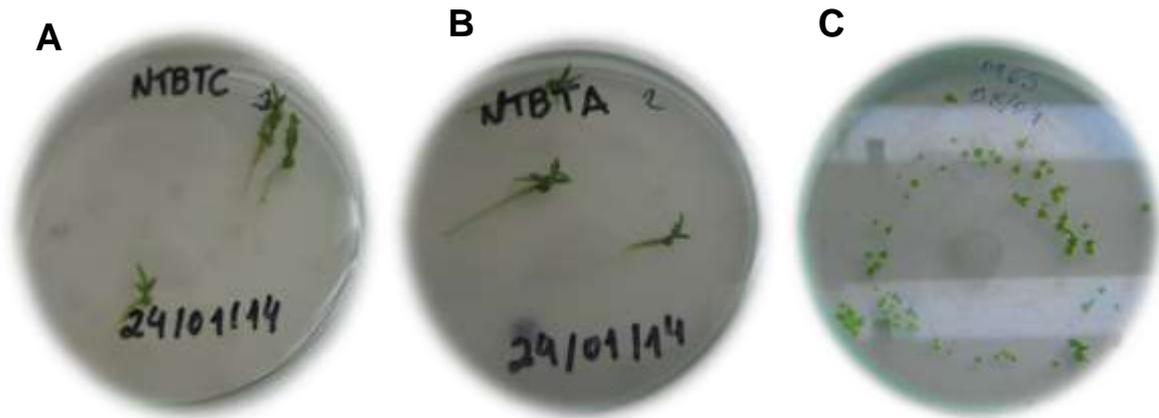
**Figura 11.** Comparação dos crescimentos fúngicos entre os três isolados *Epulorhiza* spp nas diferentes concentrações de SH após os 16 dias. Letras diferentes nas colunas (diferentes isolados) mostram a existência de diferença significativa do crescimento fúngico dentro de cada dose estudada pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade estatística.

A ação das SH em fungos micorrízicos pode ser bem controversa quando analisados os diversos trabalhos já realizados. Por exemplo, no trabalho de Eutrópio *et al.* (2014) o autor verificou que a presença de ácidos húmicos (AH) altera o crescimento de duas espécies de fungos ectomicorrízicos crescidas sob elevadas concentrações de ferro. Neste trabalho, foi observado que o tratamento com o AH estimulou o crescimento micelial de *P. tinctorius*, tal como acontece com o estímulo ao crescimento proporcionado pelas SH na presente dissertação. Em contrapartida, ainda com relação ao trabalho de Eutrópio *et al.* (2014) o crescimento do fungo *P. albus*, não apresentou crescimento significativo em relação ao tratamento controle

(sem adição de AH). No trabalho de Santos (2011) a autora utilizou o fungo ectomicorrizíco *Pisolithus microcarpus* submetendo-o à presença de diferentes doses de AH e AF e observou que as doses utilizadas estimulam o crescimento micelial em até 56% em relação ao tratamento controle (sem adição das substâncias húmicas). Tanto o trabalho de Santos (2011) quanto o de Eutrópio *et al.* (2014) houve um estímulo positivo no crescimento de micélio na dose de 200 mgL<sup>-1</sup> de AH. Como as SH utilizadas na presente dissertação correspondem a soma entre ácidos húmicos e ácidos fúlvicos (SH = AH+AF) especula-se que a dose de 250 mg L<sup>-1</sup> seja próxima a ideal para o crescimento fúngico tal como descrito por Santos (2011) e Eutrópio *et al.* (2014), mesmo porque, conforme pode ser observado na Figura 11, tal dose estimula o crescimento fúngico tanto de NTBTA, quanto de NTBTC e M65 igualmente (sem diferenças significativas).

#### 6.7. Interação entre os isolados fúngicos e a germinação de plântulas de *Brassavola tuberculata*

Após as análises realizadas anteriormente, pôde-se observar que o fungo M65 foi o que apresentou crescimento micelial mais rápido (Figura 11) com ou sem a presença de substâncias húmicas. Conforme pode ser observado na Figura 12, este mesmo fungo apresentou uma maior taxa de germinação quando comparados visualmente com os demais (NTBTA e NTBTC). Também é possível notar na Figura 12C que o tempo de germinação foi menor quando as sementes de *Brassavola tuberculata* foram postas para germinar no meio de cultura contendo o isolado M65. Enquanto NTBTA e NTBTC germinavam com dois meses e a uma taxa de germinação baixa (Figura 12 A e B), o M65 germinava com um mês com alta taxa de germinação (Figura 12 C).



**Figura 12.** Placas de petri contendo 200 µg de sementes e inoculadas com NTBTC, NTBTA e M65, porém germinados em tempos diferentes. (A) Placa de petri contendo 200 µg de sementes inoculadas com o NTBTC e com baixa taxa de germinação. (B) Placa de petri de sementes de *B. tuberculata* inoculadas pelo isolado NTBTA e com baixa taxa de germinação. (C) Placa de petri com o inoculado M65, com taxa de germinação elevada e menor tempo de germinação.

Assim como observado no trabalho de Pereira *et al.*, (2011) no qual foi usado o isolado M65 para germinação e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. no presente trabalho esse mesmo fungo se destacou em comparação com os demais (NTBTA e NTBTC) na germinação de *B. tuberculata* (orquídea pertencente a mesma subtribo que a *Epidendrum*). Segundo Pereira *et al.*, (2011) essas informações sugerem que fungos compatíveis, com maiores taxas de crescimento, podem possibilitar o desenvolvimento mais acelerado dos protocormos, o que foi observado no presente trabalho.

Alguns isolados fúngicos podem possuir uma maior capacidade de estimular o desenvolvimento simbiótico de orquídeas (Otero *et al.*, 2005). Os isolados testados nessa dissertação (NTBTA, NTBTC e M65), mesmo sendo morfológicamente similares, promoveram a germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos em diferentes porcentagens. Tais evidências também foram observadas por Pereira *et al.* (2005c) sobre a germinação de sementes de *Oncidium flexuosum*, porém, ao contrário do presente trabalho nem todas as plântulas desenvolveram o protocormo até o estágio 3 (surgimento da segunda folha).

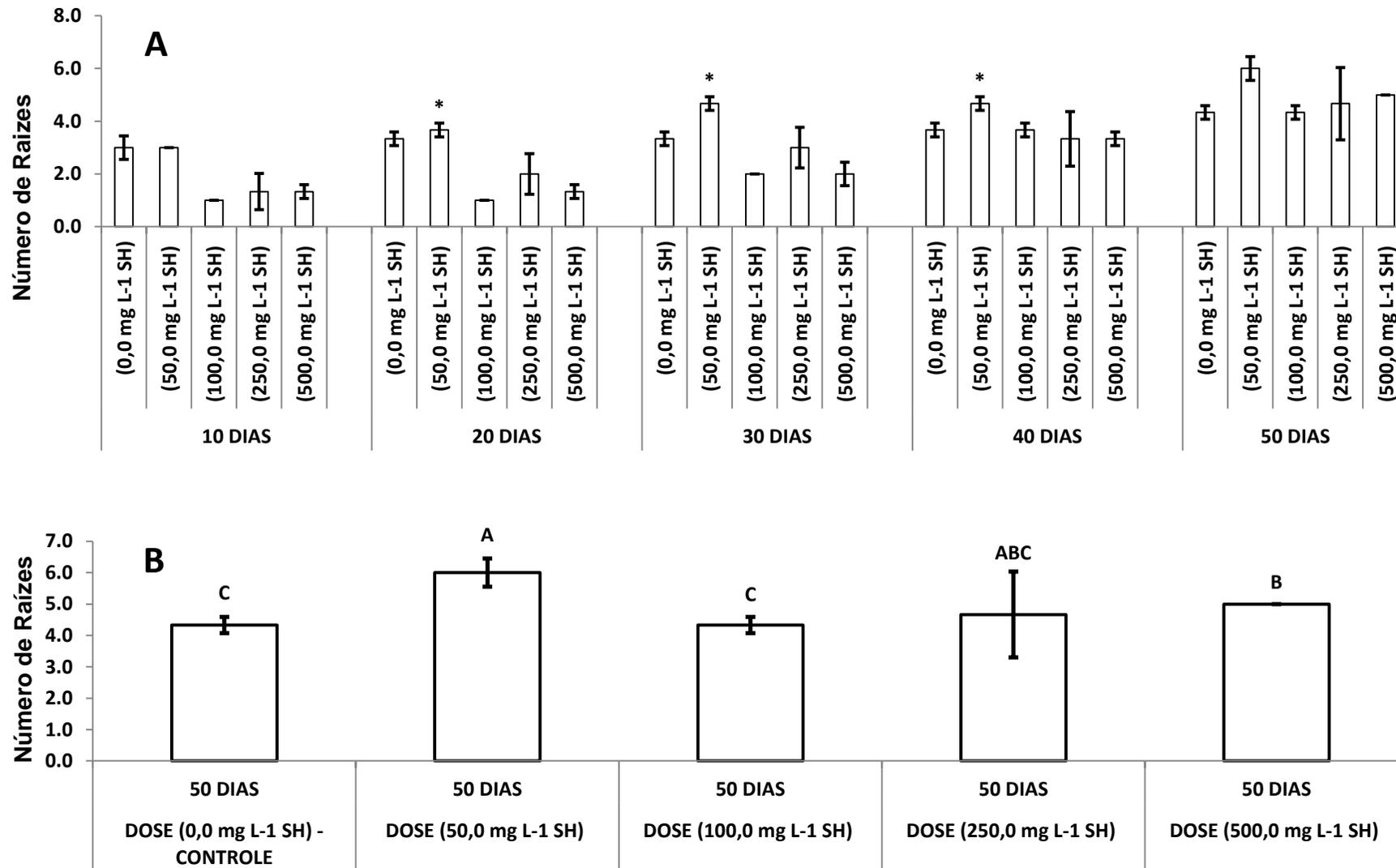
Portanto, tal como Pereira *et al.*, (2011), é possível ressaltar o potencial do fungo M65 sobre a germinação de sementes de *B. tuberculata* e sua

possibilidade de utilização em programas de produção simbiótica de mudas de orquídeas.

#### 6.8. Interação fungo-SH e crescimento de plântulas de *Brassavola tuberculata*

Com relação à interação entre o fungo M65 e as diferentes doses de SH sobre o crescimento de plântulas de *Brassavola tuberculata* através da contagem de raízes emergidas, foi possível observar que a combinação do isolado M65 (elegido como o melhor para o desenvolvimento desse experimento) com a dose de 50 mg L<sup>-1</sup> de SH fez com que aos 20, 30, 40 dias as plântulas emitissem significativamente um maior número de raízes, quando comparado com as demais doses de SH utilizadas (Figura 13A).

A Figura 13B mostra que aos 50 dias de tratamento (no final do experimento) a dose 50 mg L<sup>-1</sup> de SH, continuou se destacando com relação as demais, porém, sem diferença significativa em relação a dose de 250 mg L<sup>-1</sup> de SH.



**Figura 13.** Gráfico de surgimento de raízes laterais de plântulas de *B. tuberculata* inoculadas com o isolado M65 por 50 dias. (A) Tratamentos de SHs comparados por dias. (B) Destaque para o dia 50 comparando entre os tratamentos se SHs. Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A partir desse resultado, vale lembrar que a dose de 250 mg L<sup>-1</sup> foi considerada a melhor para o crescimento dos fungos isoladamente, e também mostrou efeito em plântulas de *Brassavola tuberculata*.

No trabalho de Yano-Melo *et al.* (2005) foi avaliado o efeito da aplicação de AH em mudas enxertadas de videiras na ausência ou presença de FMA, onde os autores observaram que o crescimento das mudas enxertadas de videira foi maior nas plântulas micorrizadas do que nas não micorrizadas. Resultados semelhantes foram observados por Coelho *et al.* (2009) avaliando-se o efeito da inoculação na promoção do crescimento de plântulas de pinheira, em um substrato com adição de 10% de vermicomposto. Tanto Yano-Melo *et al.* (2005) quanto Coelho *et al.* (2009) verificaram que a inoculação com FMA estimula o crescimento de mudas, assim como ocorre com as plântulas de *B. tuberculata* utilizadas nesse trabalho após inoculação e aplicação de diferentes doses de SH.

No trabalho de Silva *et al.* (2008) os autores verificaram o efeito de FMA em combinação com doses de adubação orgânica na formação de mudas de gravioleira. Eles puderam observar que a aplicação conjunta de FMA e adubos compostados tiveram efeito positivo sobre o crescimento da referida planta, na dependência do isolado de FMA e da dosagem de adubo aplicado. Tais resultados podem ser relacionados com o do presente trabalho onde o uso combinado de entre as SH e a inoculação micorriza levou a uma redução no tempo de formação de mudas e de aumento do número de raízes.

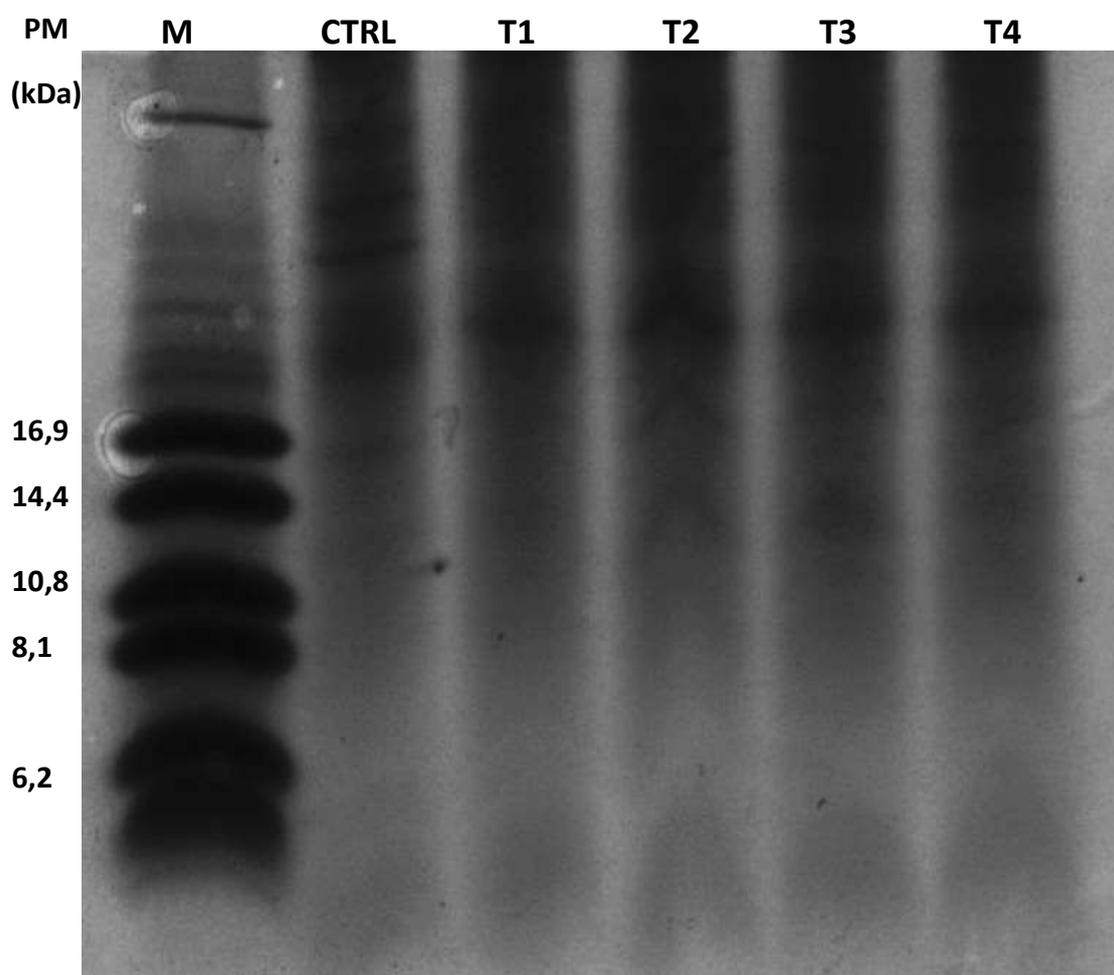
Silva *et al.* (2006) estudaram a influência da inoculação com três espécies de FMA e de substratos de vermicompostos na aclimatação de duas plantas ornamentais. Apesar dos fungos terem promovido um maior crescimento para as plantas em todas as doses de vermicomposto, foi observado efeito negativo do vermicomposto em relação aos FMA na colonização micorrízica e na esporulação nas aplicações de doses mais elevadas. Em nosso trabalho também foi observado, pelo menos em parte, que na dose mais elevada de SH utilizada (500 mg L<sup>-1</sup>) as plantas emitiram menos raízes nos dias iniciais, indicando que doses elevadas de materiais húmicos podem ser danosas tanto para a colonização fúngica quanto para o desenvolvimento de plântulas.

Apesar da discussão deste tópico estar principalmente comparando os resultados obtidos nessa dissertação com outros envolvendo diferentes tipos de fungos micorrízicos (principalmente com os fungos micorrízicos arbusculares), isso

foi necessário devido à escassez de trabalhos que envolvam fungos micorrízicos orquidóides crescidos na presença de matéria orgânica/SH. No entanto, espera-se que os efeitos em micorrizas orquidóides sejam semelhantes aos FMA, uma vez que ambos são endofíticos e possuem grandes semelhanças na forma de micorrização e colonização de raízes.

### 6.9. Análise de Proteínas

De acordo com a Figura 14, pode-se observar que o perfil de expressão das proteínas de membrana plasmática isoladas de plântulas de *B. tuberculata* inoculadas com o fungo M65 mais as diferentes doses de SH não foi sensivelmente alterado. Tal fato provavelmente se deva ao fato do gel utilizado ter sido o de Tricina (Figura 14) (utilizado para proteínas de baixo peso molecular).



**Figura 14.** Gel SDS-PAGE 12% unidimensional das proteínas isoladas de plântulas de *B. tuberculata* inoculadas com fungo M65 em diferentes doses de SH (Substâncias Húmicas) ou não (controle - CTRL), sendo T1 dose 50 mgL<sup>-1</sup>; T2 dose 100 mgL<sup>-1</sup>; T3 dose 250 mgL<sup>-1</sup>; T4 dose 500 mgL<sup>-1</sup>.

Reconhecidamente sabe-se que tanto as SH quanto os fungos micorrízicos aumentam a atividade de enzimas e expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo energético vegetal (Canellas *et al.*, 2002; Zandonadi *et al.*, 2010; Dobbss *et al.*, 2010; Nardi *et al.*, 2007). No entanto, a grande maioria dessas proteínas, diretamente relacionadas ao crescimento das plantas, possuem alto peso molecular, tal como as ATPases (105 kDa). Tal enzima influencia tanto o funcionamento dos transportadores secundários como também o funcionamento de canais e de receptores que dependem do potencial de membrana mantido principalmente pelo gradiente eletroquímico de prótons. E com isso, várias evidências têm demonstrado que a H<sup>+</sup>-ATPase de MP está diretamente ligada à funções essenciais para o crescimento vegetal (teoria do crescimento ácido).

## 7. CONCLUSÕES

As evidências experimentais obtidas nesse estudo permitiram estabelecer uma visão mais ampla da interação entre as SH e os fungos micorrízicos orquidóides sobre o crescimento de plântulas de *Brassavola tuberculata*. A partir dos resultados, de uma maneira geral foi possível aceitar a hipótese anteriormente delimitada, ou seja, os fungos rizotonióides avaliados nessa dissertação cresceram mais na presença de SH, bem como a interação fungo-SH proporcionou uma maior emissão de raízes em plântulas de *Brassavola tuberculata*. As principais conclusões que puderam ser obtidas com a presente pesquisa foram:

- As raízes de *B. tuberculata* apresentaram alta colonização de micorrizas orquidóides, com presença de pelotons por toda extensão do córtex;
- Os isolados NTBTA e NTBTC através das análises de caracterizações quantitativas e qualitativas apresentam todas as características indicativas de fungos rizotonióides, o que foi posteriormente confirmado através da análise molecular;
- Os fungos rizotonióides quando interagidos com as SH isoladas de vermicomposto cresceram mais em todas as doses com destaque para a de 250 mg L<sup>-1</sup>;
- O isolado M65 se destacou dos demais (NTBTA e NTBTC) para germinação (tanto no tempo quanto na taxa) de plântulas de *B. tuberculata*;
- A interação (fungo M65-SH) proporcionou uma redução no tempo de formação de mudas e estimulou o aumento do número de raízes de plântulas de *Brassavola tuberculata* de forma significativa, principalmente na dose de 50 mg L<sup>-1</sup>.
- A análise do perfil de expressão das proteínas de baixo peso molecular isoladas de plântulas de *B. tuberculata* inoculadas com o fungo M65 mais as diferentes doses de SH não apresentou alteração sensível.

## 8. REFERÊNCIAS

Normas da REVISTA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO.

- 1 Abrão, M.C.R.; Jorge, J.; Pescador, R.; Ferreira, W.M; Suzuki, R.M. Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, 12(3): 141-147, 2014.
- 2 Alexander K.T.; Kirschner J.S.; Andreas H.F.; Romana H.; Beate Süß, Beate G.; Alois H.; Reitner, B. Rapid Growth of Planktonic *Vibrio cholerae* Non-O1/Non-O139 Strains in a Large Alkaline Lake in Austria: Dependence on Temperature and Dissolved Organic Carbon Quality. **Appl. and Environ. Microbiol.**, 74: 2004-2015, 2008.
- 3 Almeida, P.R.M.; Berg, C.V.D.; Goes-Neto, A. Morphological And Molecular Characterization Of Species Of *Tulasnella* (Homobasidiomycetes) Associated With Neotropical Plants Of Laeliinae (Orchidaceae) Occuring In Brazil. *Lankesteriana* 7(1-2): 22-27, 2007.
- 4 Andersen, T.F. & Rasmussen, H.N. The mycorrhizal species of *Rhizoctonia*. In: Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S. & Dijst, G., eds. *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 379-390p, 1992.
- 5 Arditti, J. Fundamentals of Orchids Biology. New York: John Wiley. 691p, 1992.
- 6 Baldotto, L.E.B.; Baldotto, M.A.; Gontijo, J.B.; Oliveira, F.M. & Gonçalves, J. 2014. Aclimatização de orquídea (*Cymbidium* sp.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos. *Ciência Rural*, 44: 830-833.
- 7 Barros, F.; Vinhos, F.; Rodrigues, V.T.; Berberena, F.F.V.A.; Fraga C.N. Orchidaceae. In: Forzza R (ed) (org) **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**, Andrea Jakobsson Estúdio, Rio de Janeiro, (2): 1344–1426, 2010.
- 8 Bünemann, E.K.; Bossio, D.A.; Smithson, P.C.; Frossard, E.; Oberson, A. Microbial community composition and substrate use in a highly weathered soil as affected by crop rotation and P fertilization. **Soil Biology and Biochemistry**, 36: 889-901, 2004.

9 Burkowska, A. & Donderski W. Impact of humic substances on bacterioplankton in eutrophic lake. **Polish J. of Ecol.** 55 (1): 155-160, 2007.

10 Busato J.G.; Zandonadi D.B.; Dobbss L.B.; Faganha R.A.; Canellas L.P. Humic substances isolated from residues of sugar cane industry as root growth promoter. **Scientia Agricola.** 67: 206-212, 2010.

11 Canellas, L. P.; Olivares, F. L.; Okorokova-Façanha, A. L.; Façanha, A. R. Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H<sub>2</sub>O-ATPase Activity in Maize Roots. **Plant Physiology**, 130: 1951–1957, 2002.

12 Canellas, L. P.; Santos, G.A. **Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas.** Campos dos Goytacazes. 309p, 2005.

13 Cavalcante, U.M.T.; Goto, B.T.; Maia, L.C. Aspectos da simbiose micorrizica arbuscular. **Anais da Academia Pernambuco de Ciência Agrônômica.** 5:180-208, 2008.

14 Colombo, L. A.; Faria, R. T.; Carvalho, J. F. R. P.; Assis, A. M. Fonseca, I.C.B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum.** 6(2): 253-258, 2004.

15 Currah, R.S. & Zelmer, C.D. A key and notes for the genera of fungi with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. Reports Tottori Mycol. Inst., 30:43-59, 1992.

16 Dearnaley J. Further advances in orchid mycorrhizal research. **Mycorrhiza**, 17(6): 475-486, 2007.

17 Dixon, K. Raising terrestrial orchids from seed. In: Harris, W.K. (Ed.) Modern orchid growing for pleasure and profit. **Orchid Club of South Australia Inc.** 47-100 p, 1987.

18 Dobbss, L.B.; Oliveira A.L.; Chagasab, J.G.; Aguiara N.O.; Rumjanek, V.M.; Novotny E. H.; Olivares F.L.; Spaccinie, R.; Piccolo, A. . Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 58: 3681-3688, 2010.

19 Eutrópio F.; Costa, A.R; Cruz, C.; Melo, J.; Dobbss, L.; Santos, J.; Simoura, N.; Cruz, T.; Pereira, M.; Freitas, M.S.; Ramos, A. Papel dos ácidos húmicos na regulação do crescimento e ionoma de duas espécies de fungos ectomicorrízicos crescendo em diferentes concentrações de ferro. "XV Simpósio

Luso-Espanhol De Nutrição Mineral Das Plantas” **Nutriplanta**. Lisboa, Portugal, 2014, 38p.

20Faria, R. T.; Assis, A. M.; Unemoto, L. K.; Carvalho, J. F. R. P. Produção de Orquídeas em Laboratório. Londrina: Mecenaz, 124p, 2012.

21Ferreira W.M. & Suzuki R.M. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: Lioila MIB, Baseia IG & Lichston JE (Org.) Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil. Natal, Imagem Gráfica, 67-68, 2008.

22Finneran, K.T.; Forbush, H.M.; Gaw Van Praagh, C.V.; Lovley, D.R. Desulfitobacterium metallireducens sp. nov., an anaerobic bacterium that couples growth to the reduction of metals and humic acids as well as chlorinated compounds. **Internatl. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 52: 1929-1935, 2002.

23Fraga, C.N. & Menezes, L.F.T. Orchidaceae. in Secretaria Municipal do Meio Ambiente do Rio de Janeiro, eds. Espécies ameaçadas de extinção no do Rio de Janeiro: flora e fauna. **Fundo de Conservação Ambiental**. p. 33-34, 2000.

24George, E. F. Plant propagation by tissue culture. 2 ed. Edington: Exejetics, 1996, Pt.2.

25Giulietti, A. M.; Harley, R. M.; Queiroz, L. P.; Wanderley, M. G. L.; Van Den Berg, C. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology**. 19(3): 632-639, 2005.

26Gryndler M.; Hršelová H.; Sudová R.; Gryndlerová H.; Řezáčová V.; Merhautová, V. Hyphal growth and mycorrhiza formation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus claroideum* BEG 23 is stimulated by humic substances. **Mycorrhiza**, 15(7): 483-488, 2005.

27Hawksworth, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies In Mycology**, Madrid, 50: 9-18, 2004.

28Hayes, M.H.B. Humic substances and chemical contaminants. **Madson: Soil Science Society of America**, p. 3-39, 2001.

29Hottz, J.A; Martim, R.S.A.; Dobbss L.B.; Evaristo, J.A.M.; Retama C.A.; Façanha, A.R.; Canellas, L.P. Adição de ácido cítrico potencializa a ação de ácidos húmicos e altera o perfil protéico damembrana plasmática em raízes de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, 41(4): 614-620, 2011.

30Hoehne, F.C. Iconografia das Orchidáceas do Brasil. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio, São Paulo, 1949. 302p.

31Hrselová H.; Soukupová L.; Gryndler M. Humic acid-like material from sewage sludge stimulates culture growth of ectomycorrhizal fungi in vitro. **Folia Microbiol (Praha)**.52(6): 627-30, 2007.

32Imai, A.; Fukushima, T.; Matsushige, K. Effects of Aquatic Humic Substances on the Growth of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (a toxic algae). Japan **Soc. on Water Environment**, 22(7): 555-560, 1999.

33Lemos E.G.M; Castellane, T.C.L.; Pedrinho, E.A.N.; Galdiano, R.F.J. Auxin-Producing Bacteria Isolated From The Roots Of *Cattleya Walkeriana*, An Endangered Brazilian Orchid, And Their Role In Acclimatization. **Revista brasileira de ciência do solo**. 35:729-737, 2011.

34Lima, W.L. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), 2008. 156p.

35 Loffredo E.; Berloco M.; Senesi, N. The role of humic fractions from soil and compost in controlling the growth in vitro of phytopathogenic and antagonistic soil-borne fungi. **Ecotoxicology and Environ. Safety**, 69(3): 350-357, 2008.

36McCormick, M.K.; Whigham, D.F. & O'Neill, D.F. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. **New Phytologist**. 163: 425-438, 2004.

37Mendonça, M.P. & Lins, L.V. Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas & Fundação Zôo Botânica de Belo Horizonte, 2000. 157p.

38Moraes, S.L. de, Landgraf, M.D., & Rezende, M.O.O. Caracterização de ácidos húmicos de diferentes origens por eletroforese capilar de zona. **Eclética Química**, 29(2): 47-52, 2004.

39Morsome, P. & Boutry, M. The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. **Biophys. Biochim. Acta**. 1465:1-16, 2000.

40Nardi, S.; Concheril, G.; Dell'agnola, G.; Scrimin, P. Nitrate uptake and ATPase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, 23: 833-836, 1991.

41Otero, J.T.; Ackerman, J.D.; Bayman, P. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. **Molecular Ecology**, 13: 2393-2404, 2004.

42Otero, J.T.; Bayman, P. & Ackerman, J.D. Variation in mycorrhizal performance en the epiphytic orchid *Tolumnia variegata in vitro*: the potential for natural selection. **Evolutionary Ecology** 19: 29-43, 2005.

43 Otero, J.T., Flanagan, N. S., Herren E. A., Ackerman, J. D., Bayman P. Widespread mycorrhizal specificity correlates do mycorrhizal function in the neotropical epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, New York, 94(12), 2007.

44 Pereira, O.L.; Rollemberg, C.L.; Kasuya, M.C.M. Association des mycorrhizies dans les orchidees. **Orchidees**, Paris-França, 55: 24-27, 2003.

45 Pereira, U.Z.; Ribeiro, L.F. Caracterização de comunidades de Orchidaceae em fragmentos de Floresta Ombrófila Densa Montana, em diferentes estágios de regeneração em Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil. **Natureza online**. Santa Teresa, 2(2): 52-60, 2004.

46 Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Borges, A.C.; Araújo, E.F. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. **Can. J. Bot.**, 83: 54-65, 2005a.

47 Pereira, O.L.; Kasuya, M. C. M.; Rollemberg, C. L.; Chaer, G. M. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizotonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. Viçosa, 29(2): 191-197, 2005b.

48 Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Rollemberg, C.L.; Borges, A.C. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (orchidaceae) por fungos micorrízicos rizotonióides. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 29(2): 199-206, 2005c.

49 Pereira O.J. Formações pioneiras: restinga. In: Simonelli M & Fraga CN (org). Espécie de flora ameaçada de extinção do Estado do Espírito Santo. Vitoria, IPEMA, p. 27-32, 2006.

50 Pereira C.M.; Pereira O.L.; Costa M.D; Rocha R.B.; Kasuya M.C.K. Diversidade de fungos micorrízicos *Epulorhizaspp.* Isolados de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. Viçosa, 33: 1187-1197, 2009.

51 Peterson, R.L. & Massicotte, H.B. Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. **Canadian Journal of Botany**. 82: 1074-1088, 2004.

52 Peterson, R. L.; Uetake, Y.; Zelmer, C. Fungal symbioses with orchid protocorms. **Symbiosis**, revohot, (25): 29-55, 1998.

53 Peterson, R. L.; Massicote, H. B.; Melville, L. H. **Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology**. NRC Research Press Ottawa, 2004. 182p.

54 Piccolo, A.; Nardi, S.; Cancheri, G. Macromolecular changes of soil humic substances induced by interactions with organic acids. **European Journal of Soil Science**, 47: 319 – 328, 1996.

55 Pouneva, I. Effect of Humic Substances on the Growth of Microalgal Cultures. **Russian Journal of Plant Physiology**, 52 (3): 410-413, 2005.

56 Rasmussen, H.N. *Terrestrial orchid: From seed to mycotrophic plant*. Cambridge, Cambridge University Press, 1995. 444p.

57 Rasmussen, H.N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. **Plant Soil**. 244: 149-163, 2002.

58 Rasmussen, H.N.; Rasmussen, F.N. **Orchid mycorrhiza: implications of mycophagous life style**. OIKOS. 118(3): 334–345, 2008.

59 Roberts P. **Rhizoctonia-forming fungi: a taxonomic guide**. Royal Botanical Gardens, Kew, 1999. 239 p.

60 Rodrigues, R.R. & Leitão-Filho, H.F. *Matas ciliares: conservação e recuperação*. São Paulo, EDUSP- FAPESP, 2000, 320 p.

61 Rosa, C.M.; Castilhos, R.M.V.; Vahl, L.C.; Castilhos, D.D.; Pinto, L.F.S.; Oliveira, E.S.; Leal, O.A. Efeito de Substâncias húmicas na cinética de absorção de Potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 33: 959-967, 2009.

62 Santos, J.M. Análise do efeito dos ácidos húmicos e fúvicos no crescimento micelial *in vitro* do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus*. 01 de Julho, 2011; 36 páginas. Trabalho de conclusão de curso Bacharel em Ciências Biológicas – Universidade Vila Velha, ES.

63 Schagger, H. & Von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166: 368-379, 1987.

64 Schägger, H. & Von Jagow, G. Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, **Anal. Biochem.** 166: 368–379, 1987.

65 Sellamuthu K. M. & Govindaswamy, M. Effect of fertiliser and humic acid on rhizosphere microorganisms and soil enzymes at an early stage of sugarcane growth. **Sugar Tech**, 5(4): 273-277, 2003.

- 66Stevenson, F.J. & Cole, M.A. Cycles of soil, carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. **New York: John Wiley & Sons**, p5-45, 1999.
- 67Silva, D.K.A.; Silva, F.S.B.; Yano-Melo, A.M.; Maia, L.C. Uso de vermicomposto favorece o crescimento de mudas de gravioleira (*Annona muricata* L. 'Morada') associadas a fungos micorrízicos arbusculares **Acta bot. bras.** 22(3): 863-869, 2008.
- 68Silva M.A.; Silva, F.S.B.; Yano-Melo, A.M; de Melo, N.F; Maia, L.C. Fungos micorrízicos arbusculares e vermicomposto na aclimação de *Alpinia purpurata* (Viell.) Schum e *Zingiber spectabile* Griff. (Zingiberaceae). **Acta bot. bras.** 20(2): 249-256, 2006.
- 69Taylor, D.L.; T.D. Bruns; J.R. Leake; Read, D.J. Mycorrhizal specificity and function in mycoheterotrophic plants. In: van der Heijden, M. C. A., Sanders I, eds. Mycorrhizal Ecology. Berlin, Germany: Springer – Verlag, 2002, 375-413 p.
- 70Toscano-De-Brito, A.L.V. & Cribb, P. Orquídeas da Chapada Diamantina. Nova Fronteira, São Paulo, 2005. 399p.
- 71Unemoto, L.K.; Faria, R.T.; Vieira, A.O.S; Dalo, R.G.D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificada. **Revista Brasileira de Agrociência**, 3: 267-269, 2007.
- 72Yano-Melo, A.M.; Freitas, N.O.; Silva, F.S.B.; Melo, N.F.; Silva Filho, A.V.; Maia, L.C. Aplicação De Ácido Húmico Em Mudas Enxertadas E Micorrizadas De Uva Sem Semente (Iac 766/Crimson Seedless) Em Dois Solos Do Vale Do Submédio São Francisco. Co **Congresso Brasileiro De Ciência Do Solo**, 30. Recife, 2006.
- 73Young, C.C.; Rekha, P.; Lai, W.A.; Arun, A. Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. **Biotech. and Bioengineering**, 95: 76–83, 2006.
- 74Zelmer, C.D; Cuthbertson, L; Currah, R.S. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. **Mycoscience** 37: 439-448, 1996.
- 75Zettler, L.W. Orchid-fungal symbiosis and its value in conservation. **Mclvainea**, 13: 40-45, 1997.
- 76Zettler, L.W. & Hofer, C.J. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. **Environmental and Experimental Botany**, 39: 189–195, 1998.