



A competição por fungos micorrízicos orquidóides na coexistência de orquídeas epífitas

Palavras-Chave: MICORRIZA, ORQUÍDEAS, INTERAÇÃO

Autores(as):

GABRIELA VAINI, IB – UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). SAMANTHA KOEHLER, IB - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As orquídeas produzem sementes muito pequenas, sem reservas nutritivas, fazendo com que todas as plantas dessa família dependam da simbiose com fungos micorrízicos orquidóides (FMOs) para germinação de sementes e desenvolvimento do protocormo, primeiro estágio fotossintetizante das orquídeas (Dearnaley, 2007). Após a germinação, as hifas penetram nas células do embrião e formam, na região cortical da raiz, estruturas chamadas pelotons (Waterman e Bidartondo, 2008). Esses pelotons se desenvolvem no interior das células, provendo à orquídea nutrientes para o desenvolvimento do embrião e estabelecimento da plântula até o surgimento das primeiras folhas e a associação pode ser mantida em indivíduos adultos (Waterman e Bidartondo, 2008; Yoder et al, 2000). Dessa forma, as orquídeas são dependentes de FMOs nos estágios iniciais do desenvolvimento e mantêm a interação com os fungos na fase adulta, aumentando a adaptabilidade da planta adulta.

Considerando a dependência de orquídeas por associações micorrízicas durante a germinação e desenvolvimento, os FMOs constituem um importante fator na estruturação de populações e comunidades de orquídeas (Jacquemyn et al, 2014). Estudos realizados com espécies terrestres de orquídeas mostraram que as sementes apresentam uma taxa de sucesso de germinação maior quando estão próximas a orquídeas adultas, devido à maior disponibilidade de FMOs em torno do indivíduo adulto (e.g. Diez 2007; Jacquemyn et al. 2012, 2014; McCormick et al. 2012). Assim, os FMOs acabam determinando uma estrutura de agrupamentos de indivíduos da mesma espécie de orquídea em uma escala local.

A segregação espacial de orquídeas co-ocorrentes parece ser explicada, ao menos parcialmente, por suas associações micorrízicas. Estudos com orquídeas terrestres e epífitas mostraram que quando duas ou mais espécies coexistem, agrupamentos de indivíduos de uma única espécie de orquídea são espacialmente segregados de outras espécies, sendo que agrupamentos distintos apresentam baixa ou nenhuma similaridade na comunidade de FMOs associados (Jacquemyn et al. 2014; Cevallos et al. 2016). Com base nesses resultados, McCormick e Jacquemyn (2014) propuseram que há competição

por FMOs ideais para germinação de sementes e estabelecimento de plântulas, o que causa a segregação espacial de espécies co-ocorrentes observadas.

De acordo com as teorias clássicas da ecologia, quando duas ou mais espécies co-ocorrem, elas competem por recursos e para estabilizar a coexistência há a segregação espacial e particionamento de nicho entre essas espécies (Pacala e Levin, 1997). Para as orquídeas os FMOs seriam um recurso limitante que pode gerar competição em situação de co-ocorrência, levando a uma segregação espacial e a partição de nicho entre as espécies, ou seja, a associação e germinação com diferentes FMOs (Jacquemyn et al., 2012). Entretanto, os estudos sobre essa interação são focados em orquídeas terrestres e não são suficientes para afirmar que a competição pelos FMOs entre as orquídeas, exigindo mais estudos sobre o tema e com diferentes espécies e tipos de vida.

As orquídeas epífitas representam mais de 80% da diversidade da família (Givnish et al, 2015) e o ambiente delas se difere do terrestres em diversos aspectos devido a características intrínsecas da planta hospedeira (Callaway et al, 2002). Essas características distintas fazem com que a estrutura das comunidades de FMOs nas plantas hospedeiras seja diferente do solo, apresentando pressões seletivas distintas. Especificamente em relação à interação micorrízica, Petrolli et al (2021) demonstraram que indivíduos de uma mesma espécie de FMO de ambientes epífitos crescem mais próximos entre si do que FMOs ocorrentes no solo. Esse dado sugere que a pressão competitiva por espaço entre espécies distintas de FMOs epífitos é maior do que para FMOs terrestres (Mujica et al., 2016). Portanto, possivelmente a competição por FMOs em orquídeas epífitas é mais intensa do que para terrestres. Neste sentido, são necessários mais estudos que avaliem a competição de FMOs por orquídeas epífitas.

Sendo assim, o objetivo deste projeto é testar a hipótese de McCormick e Jacquemyn (2014) para orquídeas epífitas tropicais. A hipótese propõe a competição por FMOs como o fator que gera a segregação espacial entre orquídeas co-ocorrentes e esse projeto se propõe a testar essa hipótese para as orquídeas epífitas *Coppensia varicosa* (Lindl.) Campacci e *Gomesa recurva* Barb.Rodr, as quais ocorrem em uma mesma planta hospedeira na Reserva Serra do Japi e são encontradas constantemente segregadas espacialmente, ocorrendo em diferentes galhos.

METODOLOGIA:

As amostras foram coletadas na Reserva Biológica da Serra do Japi no município de Jundiaí (23° 14 '17"S 46° 56' 24"W). Foram coletados sete indivíduos adultos, sendo cinco da espécie *Gomesa recurva* e dois da espécie *Coppensia varicosa*, que são facilmente diferenciados pelo formato dos pseudobulbos. Todos os indivíduos foram coletados em galhos distintos de uma única planta hospedeira, *Eriobotrya japonica* (nespeira). Após a coleta, as orquídeas foram mantidas em casa de vegetação para o isolamento dos FMOs.

Em laboratório foi realizado um protocolo adaptado de Currah et al. 1997 para realizar o isolamento dos fungos micorrízicos orquidóides (FMOs). Foram selecionados cinco fragmentos de raízes de cada indivíduo. As raízes foram lavadas com água corrente para retirar o substrato e

posteriormente foram esterilizadas com etanol 70% e hipoclorito de cloro comercial (não diluído). Em uma placa de Petri foram realizados cortes transversais das raízes para identificação de pelotons (i.e. porção do micélio de fungos micorrízicos orquidóides localizada dentro das células da raiz). Os cortes que apresentavam maior número de pelotons foram selecionados e colocados para crescimento em meio FIM (Clements et al. 1986) com antibiótico (estreptomicina 100 mg/L). Posteriormente, os fungos em desenvolvimento foram individualmente isolados em nova placa contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA).

Após o crescimento dos fungos em meio BDA, foi feita uma análise morfológica dos fungos para a seleção de fungos potencialmente micorrízicos para o sequenciamento de DNA. Para isso foram feitas lâminas das hifas coradas com tinta nanquim e identificação de características diagnósticas de fungos micorrízicos orquidóides em microscópio: hifas septadas (Figura 1A) com constrições no septo (Figura 1B), ramificações de 90° (Figura 1C) e células moniloides (estrutura de reprodução produzidas pelo fungo em situações de estresse) (Figura 1D). Foi determinado como potencialmente micorrízicos aqueles que possuíam pelo menos duas dessas características.

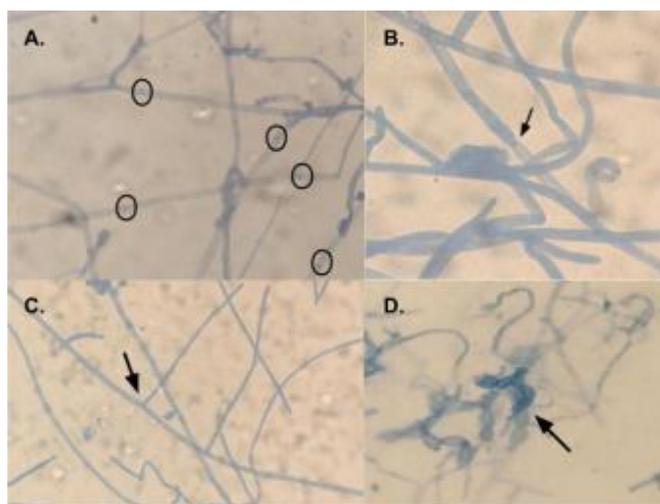


Figura 1. Características morfológicas das hifas de fungos micorrízicos orquidóides isolados da orquídea *Gomesa recurva* e observadas em microscopia de luz (aumento de 40X). A-Hifas septadas com septos circulado em preto. B- Constrição na região do septo apontada pela seta. C- Ramificações a 90°. D- Células moniloides.

Para realizar a extração de DNA dos fungos potencialmente micorrízicos, os fungos foram cultivados em meio BDA ou FIM e a extração de DNA seguiu o protocolo modificado CTAB 2% de Gardes & Bruns (1993). Após a extração, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% para conferir o sucesso da extração. Em extrações bem sucedidas foi realizada uma PCR com uso dos iniciadores ITS-4 e ITS-5 (White et al. 1990) para amplificação e sequenciamento do DNA nuclear ribossomal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram isolados 42 fungos das raízes dos indivíduos coletados, sendo 20 para *C. varicosa* e 22 para *G. recurva*. Para *C. varicosa* foram isolados fungos dos 2 indivíduos coletados, sendo 12 fungos isolados do indivíduo denominado COP3 e 8 do indivíduo COP7. Já para a *G. recurva* foram isolados fungos de apenas 4 dos indivíduos coletados, não sendo possível isolar fungos potencialmente micorrizos do quinto indivíduo coletado.

A partir da análise morfológica foi possível selecionar 22 fungos como potencialmente micorrizos. Desses 22 fungos apenas uma amostra apresentou todas essas características (*G. recurva* COP8-2). Todos os selecionados apresentaram as características de hifas septadas e ramificações de 90°, sendo que 18 apresentaram constrictões no septo. As características morfológicas dos fungos potencialmente micorrizos isolados sugerem que se trata de uma única espécie de *Ceratobasidium* sp. que ocorre nas raízes adultas de ambas as espécies de orquídeas. O gênero é comumente encontrado entre os fungos micorrizos orquidóides e Cruz et al. (2022) descreveram uma espécie nova de *Ceratobasidium* para espécimes de *Gomesa recurva* ocorrentes no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (MG) e não há fungos micorrizos descritos para *C. varicosa*

CONCLUSÕES:

A partir das análises realizadas até momento, é possível que um dos fungos isolados e potencialmente micorrizos seja pertencente do gênero *Ceratobasidium*, o qual já foi identificado como micorrizos em outras espécies e na *Gomesa recurva* em Minas Gerais. Entretanto, essa identificação preliminar deve ser confirmada pelo sequenciamento de DNA. O fato de ambas as espécies utilizarem uma única espécie de fungo e ocorrerem sempre em galhos distintos reforça a hipótese da exclusão competitiva por fungos micorrizos orquidóides. Em uma próxima etapa serão realizados testes de germinação simbiótica considerando ambas as sementes.

BIBLIOGRAFIA

CEVALLO S, SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ A, DECOCK C, DECLERCK S, SUÁREZ JP(2016). **Are there keystone mycorrhizal fungi associated to tropical epiphytic orchids?** Mycorrhiza 27:225–232.

CLEMENTS MA, MUIR H, CRIBB PJ. (1986). **A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids.** Kew Bulletin 41: 437-445.

CRUZ EDS, FREITAS EF, DA SILVA M, PEREIRA OL, KASUYA MC (2022) **A new mycorrhizal species of *Ceratobasidium* (*Ceratobasidiaceae*) associated with roots of the epiphytic orchid *Gomesa recurva* from Brazilian Atlantic Forest.** Phytotaxa: 550, 224-232.

CURRAH RS, ZELMER CD, HAMBLETON S, RICHARDSON KA (1997) **Fungi from orchid mycorrhizas. In: Orchid Biology: reviews and perspectives** (J Arditti & AM Pridgeon, eds) 7: 117–170.

DEARNALEY, J.D.W. (2007). **Further advances in orchid mycorrhizal research. Mycorrhiza** 17:475–486

DIEZ, JM. (2007). **Hierarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and environmental gradients.** *Journal of Ecology* 95: 159–170.

DOYLE JJ, DOYLE JL (1987) **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15

GARDES M, BRUNS TD (1993) **ITS Primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - Application to the identification of mycorrhizae and rusts.** *Molecular Ecology* 2: 113-118

JACQUEMYN H, BRYNS R, LIEVENS B, WIEGAND T. (2012). **Spatial variation in below-ground seed germination and divergent mycorrhizal associations correlate with spatial segregation of three co-occurring orchid species.** *Journal of Ecology* 100: 1328–1337.

JACQUEMYN, H.; BRYNS, R.; WAUD M.; BUSSCHAERT, P.; LIEVENS, B. (2014). **Mycorrhizal networks and coexistence in species-rich orchid communities.** *New Phytologist* 206: 1127–1134

McCORMICK MK, JACQUEMYN H. 2014. **What constrains the distribution of orchid populations?** *New Phytologist* 202: 392–400.

MCCORMICK MK, TAYLOR DL, JUHASZOVA K, BURNETT RK, WHIGHAM DF, O'NEILL J. (2012). **Limitations on orchid recruitment: not a simple picture.** *Molecular Ecology* 21: 1511–1523.

PACALA SW, LEVIN SA. (1997). **Biologically generated spatial pattern and the coexistence of competing species.** *Monographs in Population Biology* 30: 204–232.

WATERMAN, R.J. & BIDARTONDO M.I. (2008) **Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids.** *Journal of Experimental Botany* 59:1085–1096

WHITE TJ, BRUNS T, LEE SJWT, Taylor JW (1990) **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18: 315–322.

YODER, J.A.; ZETTLER, L.W.; STEWART, S.L. (2000). **Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy.** *Plant Science* 156: 145–150.