



## Caracterização anatômica da orquídea mico-heterotrófica *Wulfschlaegelia aphylla* (Sw.) Rchb.f. (Orchidaceae: Epidendroideae)

PASSOS<sup>1</sup>, Matheus Pena; MAYER<sup>2</sup>, Juliana Lischka Sampaio

1 Licenciando em Ciências Biológicas, IB UNICAMP, bolsista PIBIC UNICAMP

2 Docente do Instituto de Biologia da UNICAMP, orientadora do projeto de pesquisa

Palavras-chaves: anatomia vegetal, mico-heterotrofia, Orchidaceae

Órgão de financiamento: PIBIC-CNPq

### Breve introdução ao tema

Orquídeas dependem, durante a germinação das sementes e desenvolvimento do protocormo, de fungos micorrízicos atuando como fonte de carbono, nitrogênio e fósforo, devido a reservas nutritivas limitadas em suas sementes, conhecidas como “dust seeds” (Massicotte et al. 2012; Miura et al. 2018). Nessas fases do desenvolvimento, as orquídeas e demais plantas que apresentam similar necessidade são consideradas mico-heterotróficas (MH) iniciais (Smith e Read 2008; Merckx et al. 2009; Jacquemyn e Merckx 2019).

A mico-heterotrofia é uma forma de nutrição de plantas totalmente dependentes de fungos para a obtenção de carbono orgânico, que evoluiu mais de 18 vezes e engloba por volta de 30.800 espécies vegetais (Těšitel et al. 2018; Lallemand et al. 2019). Várias orquídeas e outras plantas se mantêm MH durante todos os demais estágios de vida, sendo aclorofiladas e totalmente dependentes dos fungos a que se associam (Massicotte et al. 2012; Leake 1994).

*Wulfschlaegelia aphylla* (Sw.) Rchb. f. é uma espécie de orquídea aclorofilada MH de até 25 centímetros de altura e que ocorre da América Central ao Paraguai, nos domínios brasileiros de Mata Atlântica, Cerrado e Amazônia (Melo e Alves 2013; Menini Neto et al. 2004). Há registros do florescimento de *W. aphylla* nos meses de dezembro e janeiro (Pansarin e Pansarin 2008; Melo e Alves 2013), quando emite a haste floral desprovida de folhas e com a inflorescência determinada no topo. Nas outras épocas do ano, persiste apenas o sistema radicular subterrâneo e bem desenvolvido.

### Objetivos

Os objetivos do presente trabalho incluíram (1) compreender a organização anatômica das estruturas reprodutivas e vegetativas de *Wulfschlaegelia aphylla* por microscopia óptica (MO); (2) observar o padrão de colonização dos fungos associados a *W. aphylla* nos cortes anatômicos obtidos e analisados por MO.



## Materiais e métodos

Amostras de *Wulfschlaegelia aphylla* foram coletadas nas proximidades do Município de Itutinga, Minas Gerais (ponto de coleta 21°16'30"S 44°43'02"W). Parte dos indivíduos coletados foi mantida a fresco para análises de morfologia externa e cortes à mão para microscopia de luz. Outra parte da coleta foi fixada em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965), desidratada em série etílica e infiltrada com resina plástica (Leica Historesin®). Secções de 5 µm de espessura foram obtidas por micrótomo rotativo manual (Leica®) e, então, coradas com azul de toluidina 0,05% (Sakai, 1973) em tampão citrato pH 4,5 e montadas em resina sintética "Entellan®" (Merck®). A documentação dos resultados foi realizada por captura de imagens usando câmera de vídeo Olympus DP71 acoplada ao microscópio Olympus BX51.

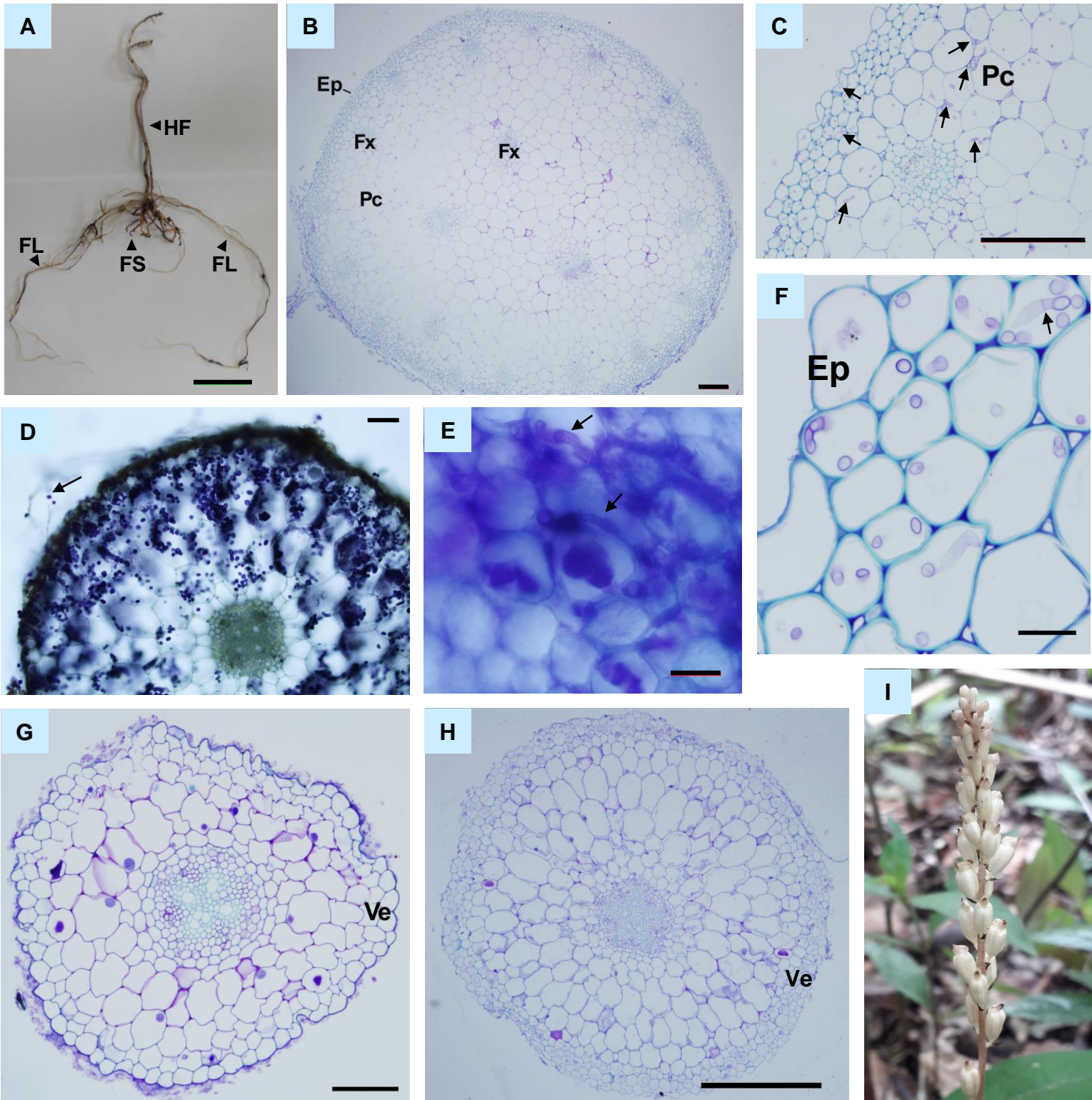
## Resultados e Discussão

A haste floral (HF na fig. 1A) porta a inflorescência e possui organização anatômica típica de caule de monocotiledônea, como pode ser observado na fig. 1B: com feixes vasculares (Fx) distribuídos no tecido fundamental (Pc) sem que haja um padrão organizado, o que define o estelo do tipo atactostelo. Uma grande quantidade de hifas pôde ser identificada colonizando os tecidos da haste floral, especialmente células da epiderme, dos tecidos subepidérmicos e do parênquima cortical (Fig. 1C-F). Os cortes anatômicos propiciaram até mesmo, em algumas porções, observar os septos presentes nas hifas (Fig. 1F, canto superior direito – ponta da seta).

*W. aphylla* apresenta dois tipos de raízes morfológica- e anatomicamente distintas entre si, característica também encontrada em outras espécies do gênero (Stern, 2014). As raízes denominadas fusiformes (FS na fig. 1A; Fig. 1H) são mais espessas e mais curtas, se aprofundam no solo, desempenhando papel importante de fixação ao substrato. Já as raízes filiformes (FL na fig. 1A) são mais finas, se estendem por sobre o solo e abaixo da serrapilheira. As raízes filiformes estão em muitas partes conectadas a folhas em decomposição por meio de hifas, que colonizam células do córtex desse tipo de raiz (Fig. 1D-E) e se prolongam pela superfície dessas raízes e pela superfície de componentes da serrapilheira, os quais serão decompostos pelos fungos associados à orquídea. Essas raízes demonstram ser ricas em reserva de grãos de amido (Fig. 1D).

Muito provavelmente pela espessura dos cortes em micrótomo (5 µm) para anatomia de luz da raiz filiforme, não foi possível identificar hifas (Fig. 1G) colonizando o órgão como ocorrido nos cortes à mão (de material fresco, fig. 1D-E, ponta da seta). Já a identificação em cortes de haste floral (Fig. 1C e 1F) permitiu uma mudança de perspectivas, dando agora maior atenção aos fungos colonizando outros órgãos para além das raízes.

De modo interessante, a raiz filiforme (FL) é tetraarca (Fig. 1G), ou seja, apresenta quatro polos de xilema e quatro de floema alternados entre si, enquanto que a raiz fusiforme (FS) é pentarca (cinco polos alternados de xilema e floema – Fig. 1H). Essa diferença anatômica provavelmente se dá pela considerável diferença de diâmetro entre os tipos radiculares, maior nas raízes FS.



**Figura 1:** A) morfologia externa de *Wulfschlaegelia aphylla*. B) corte transversal da haste floral corado com azul de toluidina, aumento de 4x. C) colonização de diversos tecidos da haste floral por hifas (ponta de seta), aumento de 20x. D) CT de raiz filiforme em lugol, aumento de 10x. E) corte da imagem D em maior detalhe das hifas (setas) presentes em células do córtex de raiz filiforme, aumento de 80x. F) detalhe da colonização da epiderme e tecidos adjacentes da haste floral por hifas (ponta de seta), CT, aumento de 80x. G) CT de raiz filiforme, aumento de 16x. H) CT de raiz fusiforme, aumento de 6,4x. I) morfologia externa da inflorescência. Ep = epiderme. Fx = feixe vascular. Pc = parênquima cortical. Ve = velame. Barras: A = 5 cm, B e C = 200  $\mu$ m, D e G = 100  $\mu$ m, E e F = 20  $\mu$ m, H = 500  $\mu$ m.



Os botões florais e frutos (Fig. 1I) foram analisados sob microscópio para melhor compreensão das estruturas e padrão de desenvolvimento. Na Fig. 2B, podem ser reconhecidos o perianto (Pe), o ovário (O) e a coluna (Co), parte característica das orquídeas e na qual se localizam as polínias (Po) e o estigma. As polínias (Po) com pólen na cor amarelo vivo podem ser observadas pela morfologia externa da flor (Fig. 2A). Em corte a fresco, também é possível visualizar numerosos óvulos (Fig. 2D) no botão floral.

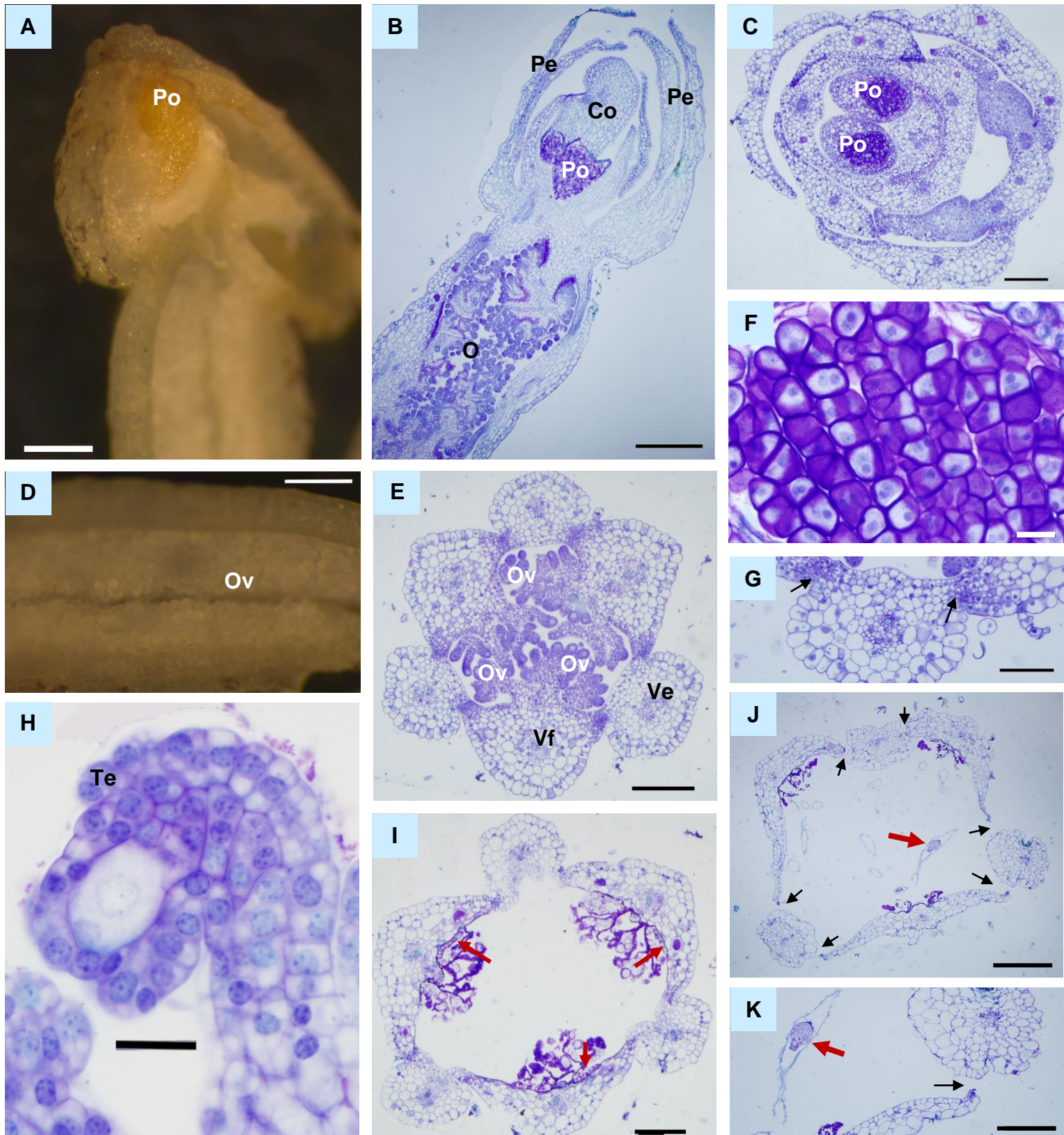
Realizando-se cortes transversais na porção mais apical das flores, as polínias são evidentes como na Fig. 2C: os grãos de pólen (Fig. 3F) se desenvolvem, sendo constituídos de uma célula generativa e uma vegetativa (Fig. 3F), com funções de formação de gametas e crescimento de tubo polínico, respectivamente.

O gineceu de *W. aphylla* é tricarpelar, como observado na Fig. 2E: em corte transversal, identificamos os óvulos (Ov) em desenvolvimento nas paredes do ovário unilocular (Fig. 2E). Três valvas férteis (Vf) e três valvas estéreis (Ve) formam o ovário. Na Fig. 2H, é possível observar o óvulo em maior aumento.

Já na fase de fruto em desenvolvimento na Fig. 2I, células secretoras (ponta da seta vermelha) com origem no endocarpo sintetizam substâncias que guiam o crescimento dos tubos polínicos para fecundação dos óvulos. O desenvolvimento do fruto (Fig. 2I) formará diversas sementes (Fig. 2J-K, ponta da seta vermelha). O fruto maduro se abre (Fig. 2J) e libera as sementes, sendo então um fruto do tipo deiscente. Na Fig. 3G podem ser observadas as regiões das linhas de deiscência (ponta da seta), na qual as células se degeneram para rompimento das paredes do fruto já em estágio maduro (Fig. 2J-K, ponta da seta).

## Referências

- Jacquemyn, Hans; Merckx, Vincent SFT. 2019. Mycorrhizal symbioses and the evolution of trophic modes in plants. **Journal of Ecology**, 107(4):1567-1581.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, 27:137-138.
- Lallemand, F.; Figura, T.; Damesin, C.; Fresneau, C.; Griveau, C.; Fontaine, N.; Selosse, M.A. 2019. Mixotrophic orchids do not use photosynthates for perennial underground organs. **New Phytologist**, 221(1):12-17.
- Leake, J.R. 1994. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. **New Phytologist**, 127(2):171-216.
- Massicotte, H.B.; Peterson, R.L.; Melville, L.H.; Luoma, D.L. 2012. Biology of mycoheterotrophic and mixotrophic plants. In: Southworth, D. (ed.). **Biocomplexity of Plant-Fungal Interactions**, 109-130.
- Melo, A.; Alves, M. 2013. Sinopse das ervas aclorofiladas ocorrentes no norte da Floresta Atlântica, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, 11(1).
- Menini Neto, L.; Almeida, V.R.; Forzza, R.C. 2004. A família Orchidaceae na Reserva Biológica da Represa do Gramma-Descoberto, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, 55(84):137-156.
- Merckx, V.; Bidartondo, M.I.; Hynson, N.A. 2009. Myco-heterotrophy: when fungi host plants. **Annals of Botany**, 104:1255-1261.
- Miura, C.; Yamaguchi, K.; Miyahara, R.; Yamamoto, T.; Fujii, M.; Yagame, T.; Kaminaka, H. 2018. The mycoheterotrophic symbiosis between orchids and mycorrhizal fungi possesses major components shared with mutualistic plant-mycorrhizal symbioses. **Molecular plant-microbe interactions**, 31(10):1032-1047.
- Pansarin, E.R.; Pansarin, L.M. 2008. The family Orchidaceae in the Serra do Japi, São Paulo, Brazil. **Rodriguésia**, 59(1):99-111.
- Sakai, W.S. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, 48:247-249.
- Smith, S.E.; Read, D.J. 2008. **Mycorrhizal symbiosis**. Londres: Academic press.
- Stern, William Louis. 2014. **Anatomy of the Monocotyledons volume X: Orchidaceae**. Oxford University Press: Oxford.
- Těšitel, J.; Těšitelová, T.; Minasiewicz, J.; Selosse, M.A. 2018. Mixotrophy in land plants: why to stay green?. **Trends in plant science**, 23(8):656-659.



**Figura 2:** botão floral de *Wulfschlaegelia aphylla* em corte longitudinal e lupa (A e B). Cortes longitudinal (B, aumento 4x) e transversal (C, aumento 8x) de botão floral. E) CT na altura do ovário, aumento 8x. F) grãos de pólen, CT das polínias, aumento 80x. G) detalhe da região da linha de deiscência, aumento 20x. H) óvulo bitegumentado. I) CT de fruto em desenvolvimento, aumento 8x. J e K) CT fruto após deiscência, aumento 4x (J) e 10x (K). Co = coluna. O = ovário. Ov = óvulos. Pe = perianto. Po = polínias. Te = tegumento. Ve = valva estéril. Vf = valva fértil. Barras: A e D = 0,5 mm, B e J = 500 µm, C e E e K = 200 µm, F e H = 20 µm, G e I = 100 µm.