

# METODOLOGIAS UTILIZADAS NA PESQUISA COM MICORRÍZAS PARA CONSERVAÇÃO DE ORQUÍDEAS

Melissa Faust Bocayuva<sup>1</sup>, Conrado Augusto Vieira<sup>1</sup>, Tomás Gomes Reis Veloso<sup>1</sup>, Maria Catarina Megumi Kasuya<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Associações Micorrízicas, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, MG. melissabocayuva@hotmail.com

O meio mais eficiente de conservar as orquídeas é pela preservação do seu habitat, mas programas de reintrodução podem auxiliar no restabelecimento de populações em declínio. Estudos têm sido realizados no Brasil com intuito de conhecer a diversidade de fungos micorrízicos de orquídeas (FMO). Além disso, protocolos de propagação simbiótica *in vitro* e de aclimatização de orquídeas precisam ser elaborados para concretizar projetos de reintrodução e para auxiliar no conhecimento da especificidade dos diversos estágios desta interação fungo-planta. Três espécies de orquídeas em risco de extinção da Floresta Atlântica, *Hoffmannseggella caulescens*, *Hoffmannseggella cinnabarina* e *Hadrolaelia jongheana* foram selecionadas para o presente trabalho por serem ícones. Neste projeto propomos estabelecer estratégias de conservação *ex situ*, tais como enriquecer o conhecimento sobre a biodiversidade de FMO, otimizar a produção de plântulas *in vitro*, assim como realizar a aclimatização e a reintrodução de mudas das espécies de orquídeas, investigando nas diferentes etapas a sucessão dos FMO. Para identificação dos FMOs de Tulasnellaceae, Sebacinaceae e fungos em geral, fragmento de células corticais colonizadas foram utilizados para a extração do DNA total, seguido por PCR, com a utilização dos primers ITS1/ITS4-Tul, ITS3Seb/ITS4 e ITS1F/ITS4, respectivamente. Para propagação simbiótica, quatro isolados de *Tulasnella* foram testados pela inoculação do micélio fúngico em meio OMA contendo suspensão de sementes dessas orquídeas. Os controles consistiram meio OMA, B&G e KNUDSON, sem inoculação. Após 3 meses, as plântulas foram transferidas para frascos de vidro, contendo meio OMA, acrescido ou não de macro e micro nutrientes. Estes frascos foram, então, incubados em câmara de crescimento à temperatura de  $26 \pm 2$  °C e fotoperíodo regulado à 16h luz / 8h escuro. Seis meses após a semeadura, confirmada a micorrização, as plântulas foram transferidas para tubetes, em casa-de-vegetação sob tela de polipropileno de coloração preta (sombrite) ou tela termo-refletora Aluminet<sup>®</sup>, com retenção de 50% do fluxo de radiação solar. Os substratos foram: casca de pinus, casca de eucalipto e cascalho, com diferentes doses de adubação (25%, 50%, 100%) do fertilizante B&G. Mudas micorrizadas aclimatizadas de *H. jongheana* e *H. caulescens* com mais de 6 meses foram reintroduzidas em duas áreas particulares, Fazenda Engenho d'Água (Ouro Preto, MG) e Lar dos Muriquis (Serra do Brigadeiro, Rosário da Limeira, MG). Mensalmente tem sido avaliado a sobrevivência, o número de folhas e comprimento da maior folha. Foram identificados 30 *Rizoctonia*-like como *Tulasnella* spp. Isolados de *Hoffmannseggella* representam dois clados próximos a *T. calospora*. Isolados de *H. jongheana* são filogeneticamente distantes entre eles. As orquídeas estudadas são provavelmente generalistas em suas associações com FMOs de *Tulasnella* sp. Todos os isolados promoveram a germinação de sementes, sendo M65 o que proporcionou maior taxa de germinação e índice de crescimento mais elevados que os demais. Também houve germinação nos tratamentos não inoculados. *H. jongheana* mostrou ser menos dependente de micorrizas para a germinação e desenvolvimento de protocormos de que as rupícolas. Enfim, a metodologia de aclimatização proposta se demonstra eficaz, comprovando o

desenvolvimento das plântulas, com elevadas porcentagens de sobrevivência, assim como a permanência da micorrização, após um ano de aclimatização. No Lar dos Muriquis, onde foram reintroduzidos 92 indivíduos, após um período de seis meses, não houve variação no comprimento das folhas com taxas de sobrevivência de 72%.

Palavras-chave: orquídea ameaçada, *Tulasnella*, PCR, propagação *in vitro*, aclimatização e reintrodução

Apoio financeiro: CAPES, CNPq, FAPEMIG e AMERICAN ORCHID SOCIETY