

DISSERTAÇÃO

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SUBSTRATOS E DA INOCULAÇÃO DE FUNGOS RIZOCTONIÓIDES NO CRESCIMENTO INICIAL DE *Hadrolaelia perrinii*

LUIZ GUILHERME CUNHA COELHO DE SEQUEIRA

Campinas, SP
2007

INSTITUTO AGRONÔMICO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SUBSTRATOS E DA INOCULAÇÃO DE FUNGOS RIZOCTONIÓIDES NO CRESCIMENTO INICIAL DE *Hadrolaelia perrinii*

LUIZ GUILHERME CUNHA COELHO DE SEQUEIRA

Orientadora: Sueli dos Santos Freitas
Co-orientador: Giulio Cesare Stancato

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical área de concentração em Gestão de Recursos Agroambientais.

Campinas, SP
Fevereiro 2007

À minha mãe Edna e avó Guiomar, pelo amor, apoio e atenção que me dedicam, em todos os momentos.

À minha namorada, Flavia, pela força de seu amor, que me impulsiona, sempre, em busca de novos desafios.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- A DEUS, ser supremo de minha existência.

- À Profa. Dra. Sueli dos Santos Freitas, pela paciência, orientação e por sua capacidade ímpar, a mim ensinada.

- Ao Dr. Giulio Cesare Stancato, pelo encorajamento, apoio e ensinamentos diários.

- À Dra. Marília Castro pela colaboração e apoio nas análises de levantamento microscópico.

- Às pesquisadoras Dra. Flávia Rodrigues Alves Patrício e Dra. Maria Aparecida de Souza Tanaka pela identificação dos isolados fúngicos.

- Aos funcionários do laboratório de Microbiologia, Rosana, Leonilde, Tereza e Sr. Lázaro, pelo apoio e colaboração.

- A todos os professores, pessoas admiráveis, que tive a honra de conhecer....

- Aos colegas de curso, em especial Núbia, Teodoro, André, Ricardo, Eliete, Beth, Célia e Adilza, pela cumplicidade e dias prazerosos...

Meu muito obrigado a todos!!!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS vi
ÍNDICE DE FIGURAS viii
RESUMO x
ABSTRACT xi
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 Orquídeas 3
2.2 *Hadrolaelia perrinii* 4
2.3 A Relação Ecológica: Fungos – Orquídeas 4
2.4 Substratos Utilizados em Cultivos de Plantas 9
2.5 Composição Química dos Substratos 12
2.6 Necessidades Nutricionais das Orquídeas 14
2.7 Substratos e Adubação no Cultivo de Orquídeas 15
3. MATERIAL E MÉTODOS 17
3.1 Obtenção de Plântulas 18
3.2 Isolamento de Fungos das Raízes de Diferentes Espécies de Orquídeas Adultas 18
3.3 Determinação da Capacidade de Retenção de Água pelos Substratos 19
3.4 Determinação da Curva de Perda de Água dos Substratos 21
3.5 Análise Química dos Substratos 22
3.6 Desenvolvimento de *Hadrolaelia perrinii* em Substrato 22
3.7 Teste de Eficiência dos Isolados Fúngicos 23
3.8 Observação de Cortes das Raízes das Plantas 24
3.9 Variáveis Analisadas 25
3.10 Análise Estatística 25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 26
4.1 Obtenção de Plântulas 26
4.2 Isolados Fúngicos Obtidos 26
4.3 Capacidade de Retenção de Água pelos Substratos 26
4.4 Curva de Perda de Água pelos Substratos 28
4.5 Propriedades Químicas dos Substratos 30
4.6 Desenvolvimento de *Hadrolaelia perrinii* em Diferentes Substratos 32
4.7 Eficiência dos Isolados Fúngicos 36
4.8 Observação de Cortes das Raízes das Plantas 41
5. CONCLUSÕES 47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Massa da matéria seca das frações do substrato Comercial, submetidas a peneiramento em oito diferentes malhas 27

Tabela 2 – Valores obtidos da CMRA para os cinco substratos 27

Tabela 3 – Porcentagem de água retida pelos cinco substratos em casa de vegetação 28

Tabela 4 – Características químicas dos substratos.....31

Tabela 5 – Massa da matéria seca de raízes, parte aérea, total e relação entre a massa de raízes e parte aérea, avaliadas no início do experimento. Média de sete repetições.....33

Tabela 6 – Massa da matéria seca de orquídeas cultivadas em casa de vegetação durante 135 dias, em três substratos. Médias de dez repetições.....33

Tabela 7 – Massa da matéria seca para dez plântulas; início do experimento 36

Tabela 8 – Massa de matéria seca de raízes (g) de *Hadrolaelia perrinii* em função da inoculação de nove isolados fúngicos, cultivadas em quatro substratos em casa de vegetação, durante dez meses. Médias de cinco repetições.....36

Tabela 9 – Massa de matéria seca da parte aérea (g) de *Hadrolaelia perrinii* em função da inoculação de nove isolados fúngicos, cultivadas em quatro substratos em casa de vegetação, durante dez meses. Médias de cinco repetições.....37

Tabela 10 – Massa de matéria seca total (g) de *Hadrolaelia perrinii* em função da inoculação de nove isolados fúngicos, cultivadas em quatro substratos em casa de vegetação, durante dez meses. Médias de cinco repetições.....38

Tabela 11 – Relação entre as massas de matéria seca da raiz e da parte aérea de *Hadrolaelia perrinii* em função da inoculação de nove isolados fúngicos, cultivadas em quatro substratos em casa de vegetação, durante dez meses. Médias de cinco repetições 39

Tabela 12 – Aparência (Int., Dig., Inter.), localização (Quad., Quad.Op., Esp.) e freqüência (+, ++, +++) de *pelotons* em raízes de orquídeas no substrato Coxim.....43

Tabela 13 – Aparência (Int., Dig., Inter.), localização (Quad., Quad.Op., Esp.) e freqüência (+, ++, +++) de pelotons em raízes de orquídeas no substrato Comercial.....44

Tabela 14 – Aparência (Int., Dig., Inter.), localização (Quad., Quad.Op., Esp.) e freqüência (+, ++, +++) de pelotons em raízes de orquídeas no substrato Casca de *Pinus* 45

Tabela 15 – Aparência (Int., Dig., Inter.), localização (Quad., Quad.Op., Esp.) e freqüência (+, ++, +++) de pelotons em raízes de orquídeas no substrato Biomax 46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Retenção diária de água, em porcentual da capacidade máxima de retenção, do substrato Biomax mantido em casa de vegetação. Média de cinco repetições. Seta mostra o ponto no qual o substrato atingiu 60% da CMRA. 28

Figura 2 – Retenção diária de água, em porcentual da capacidade máxima de retenção, do substrato Casca de *Pinus* mantido em casa de vegetação. Média de cinco repetições. Seta mostra o ponto no qual o substrato atingiu 60% da CMRA. 28

Figura 3 – Retenção diária de água, em porcentual da capacidade máxima de retenção, do substrato Comercial mantido em casa de vegetação. Média de cinco repetições. Seta mostra o ponto no qual o substrato atingiu 60% da CMRA. 29

Figura 4 – Retenção diária de água, em porcentual da capacidade máxima de retenção, do substrato Coxim mantido em casa de vegetação. Média de cinco repetições. Seta mostra o ponto no qual o substrato atingiu 60% da CMRA. 29

Figura 5 – Retenção diária de água, em porcentual da capacidade máxima de retenção, do substrato Xaxim mantido em casa de vegetação. Média de cinco repetições. Seta mostra o ponto no qual o substrato atingiu 60% da CMRA. 29

Figura 6 – Valores de pH dos substratos Coxim, Casca de *Pinus* e Xaxim, avaliados semanalmente, em que foram mantidas orquídeas durante 18 semanas. Média de cinco repetições.....35

Figura 7 – Valores de condutividade elétrica dos substratos Coxim, Casca de *Pinus* e Xaxim, avaliados semanalmente, em que foram mantidas orquídeas durante 18 semanas. Médias de cinco repetições.....35

Figura 8 – Valores obtidos para pH e CE da água de percolação de quatro substratos. Coletas mensais 40

Figura 9A – Contaminação do tratamento testemunha do substrato Coxim: poucos pelotons digeridos, encontrados apenas em um quadrante (aumento 10x1,6 – corante Azul de Toluidina).....42

Figura 9B – *Pelotons* intactos, digeridos e interligados no tratamento testemunha do substrato Comercial (aumento de 10x1,6 – corante Vermelho de Rutênio) 42

Figura 9C – *Pelotons* intactos no tratamento F. O. 1 do substrato Comercial (aumento de 10x1,6 – corante Vermelho de Rutênio).....42

Figura 9D – *Pelotons* digeridos no tratamento F. O. 3 do substrato Biomax (aumento de 20x1,6 – corante Azul de Toluidina) 42

Figura 9E – *Pelotons* interligados no tratamento F. O. 7 do substrato Coxim (aumento de 10x1,6 – corante Vermelho de Rutênio).....42

Figura 9F – Presença de amido nos cloroplastos (aumento de 10x1,6 – corante Azul de Toluidina).....42

Figura 9G – Confirmação da presença de amido (aumento de 10x1,6 – reagente de lugol).....42

Figura 9H – Estruturas absorventes – pêlos radiculares (aumento de 10x1,6 – corante Vermelho de Rutênio).....42

SEQUEIRA, Luiz Guilherme Cunha Coelho de. **Avaliação de diferentes substratos e da inoculação de fungos rizoctonióides no crescimento inicial de *Hadrolaelia perrinnii*.** 2007. 53f. Dissertação (Mestrado em Gestão de Recursos Agroambientais) – Pós-Graduação – IAC.

RESUMO

Orquídeas são plantas que despertam interesse devido às suas formas, cores e beleza inconfundíveis, mas também por suas características fisiológicas e mecanismos de interação na natureza. Muitos estudos têm sido realizados com vistas à utilização de fontes alternativas de substratos para o cultivo de orquídeas, uma vez que o xaxim – substrato mais utilizado – encontra-se em situação de extinção. Devido à evolução, orquídeas desenvolveram sementes de tamanho muito reduzido para beneficiar sua dispersão, mas, por causa disso, sua reserva nutricional é insuficiente para seu desenvolvimento inicial. Orquídeas associam-se a fungos micorrízicos na natureza, os quais lhes fornecem nutrientes e lhes facilitam o desenvolvimento inicial. Neste trabalho, realizou-se o isolamento de fungos presentes nas raízes de várias espécies de orquídeas adultas, com a posterior inoculação dos isolados obtidos em plântulas de *Hadrolaelia perrinii* provenientes de propagação *in vitro*. As plântulas foram cultivadas em vasos com os substratos Coxim, Casca de Pinus, Biomax e Comercial para a verificação da eficiência dos inóculos, sendo obtidas as massas de matéria seca das plântulas, os valores de pH e condutividade elétrica dos substratos e realizado um levantamento morfológico das raízes. Não foi observada especificidade entre fungos e plântulas de *Hadrolaelia perrinii* sendo os tratamentos F. O. 2 e F. O. 7 prejudiciais ao seu desenvolvimento. O substrato Comercial influenciou de forma positiva o desenvolvimento das plântulas e mostrou ter potencial como substituto ao xaxim, mas novos estudos são necessários em relação ao substrato e a outras espécies de orquídeas.

Palavras-Chave: Micorriza, fungos rizoctonióides, substratos

SEQUEIRA, Luiz Guilherme Cunha Coelho de. **Evaluation of different substrates and inoculation of rhizoctonia-like fungi on initial growth of *Hadrolaelia perrinii*.** 2007. 53p. MSc. thesis in Agrienvironmental Resources Management. IAC – graduation course in Tropical and Subtropical Agriculture.

ABSTRACT

Orchids are plants which brings interest because of their special shapes, colors and beauty, but also because of physiological characteristics and nature interactions mechanisms. Many studies have been carried out about alternative sources of substrates, since "xaxim" – the most popular substrate used in Brazil – is close to extinction. Years of evolution make orchids develop tiny seeds for easiest dispersal but their nutritional reserves are insufficient for initial development. In nature, orchids associate to mycorrhizal fungi as a mean to obtain additional reserves and make easier their initial development. Mycorrhizal fungi were isolated from several adult orchids' roots and the isolated obtained were inoculated on plantlets of *Hadrolaelia perrinii* from *in vitro* culture. The plantlets were cultivated on "Coxim", "Casca de *Pinus*", "Biomax" and "Comercial" substrates to verify the efficiency of fungi inoculated. The plantlets dry matter was measured and the values of pH and electric conductivity and a morphological survey on roots were evaluated too. There was no specificity between fungi and plantlets of *Hadrolaelia perrinii* and the treatments F. O. 2 and F. O. 7 showed no gain to its development. "Comercial" substrate was favorable to plantlets development and can be a potential substitute for "xaxim" substrate. Further studies are required about new substrates and other orchid species.

Key Words: Mycorhiza, rhizoctonia-like fungi, substrates.

1 INTRODUÇÃO

Monocotiledôneas da Família Orchidaceae, as orquídeas constituem as maiores representantes em número de espécies dentro do grupo das Angiospermas, com número estimado em cerca de 30.000 espécies. São plantas que chamam a atenção tanto por suas formas, cores e beleza inconfundíveis quanto pelo interesse que despertam na comunidade científica devido à especificidade de seus mecanismos fisiológicos e às suas interações ecológicas. Somado a isso existem mercados, especialmente os voltados à ornamentação, paisagismo e floricultura, cada vez mais seletivos e em busca de novidades, tanto em relação à variedade de tamanhos, cores e duração das florações quanto a cultivos ecologicamente corretos. Estudos voltados à utilização racional dos recursos disponíveis relacionam-se diretamente a substratos oriundos de fontes renováveis e que não tenham impactos irreversíveis na natureza, como extinção. Nesse caso, é dever mencionar o xaxim, nome dado à espécie *Dicksonia sellowiana*, planta do grupo das Pteridófitas, cuja extração sem controle vem levando-a à extinção.

Impulsionadas por essa demanda de mercados cada vez mais exigentes, novas linhas de pesquisa têm surgido e se destacado de forma notável. Exemplo disso são os trabalhos relacionados com melhoramento genético vegetal, para o desenvolvimento de novas combinações de cores e o aumento dos períodos de floração, e os que desenvolvem e disponibilizam fontes alternativas e renováveis de recursos utilizados em cultivo de orquidáceas.

Grupos de pesquisa distribuídos por todo o mundo – principalmente nos Estados Unidos, Europa e Japão – dedicam-se a estudos que visam o melhor conhecimento dos hábitos de crescimento das orquídeas – que podem ser epífitas, terrestres ou rupícolas –, e das suas interações com microrganismos, que as auxiliam no desenvolvimento inicial e que participam de determinados processos fisiológicos durante seu ciclo vital, ou com organismos, sendo esses exceções, responsáveis por etapas do desenvolvimento como na dispersão das sementes realizada por alguns insetos. Há também estudos relacionados aos substratos utilizados em seu cultivo – substratos já conhecidos ou novos substratos – para cada espécie, levando em consideração preferências fisiológicas como luminosidade, umidade e aeração.

O aumento no interesse da pesquisa relacionada ao tema em países em desenvolvimento, como o Brasil, tem reflexos não somente no aspecto econômico, com

a abertura de novos mercados e oportunidades de trabalho, mas também no aspecto ambiental.

Com a proibição imposta pelo IBAMA (Portaria N 37, 1992) à comercialização e extração de xaxim – produto comercial da espécie vegetal conhecida como samambaiaçu – houve a necessidade imediata de desenvolvimento de novos materiais que pudessem substituir de forma satisfatória e rentável a demanda proveniente do cultivo de orquidáceas. Materiais bem simples, alguns deles abundantes, vêm sendo testados em relação à sua capacidade de substituição do xaxim com boas perspectivas de utilização. Fibras de coco, cascas de árvores, cascas carbonizadas de cereais, como a de arroz, vermiculita e carvão vegetal são alguns exemplos de materiais que têm sido empregados no cultivo de orquídeas.

Pelo fato de a Portaria N 37 (1992) ser relativamente recente e de no Brasil não haver incentivo ao desenvolvimento de estudos em muitas áreas de pesquisa, a produção científica ainda é incipiente frente à variedade de espécies nativas de orquídeas e substratos possíveis de serem utilizados. Das 30.000 espécies estimadas, pouco mais de 810 são oriundas de regiões temperadas do globo, o que abrange a América do Norte (EUA e Canadá) e a Eurásia (Europa e Ásia), representando menos de 3% do número total de espécies (DRESSLER, 1981). Mesmo assim é nessas regiões que se encontra a maioria dos estudos relacionados a orquídeas no mundo.

Outro problema causado pela falta de investimentos em pesquisa científica é a utilização da “técnica” de tentativa e erro para os mais diversos cultivos, inclusive para orquidáceas. Isso implica grandes perdas econômicas, biológicas e uma deficiência pronunciada em relação à padronização de métodos de cultivo e ao desenvolvimento científico. Com o investimento no setor científico podem ser criados grupos de pesquisa, muitas vezes com parcerias entre instituições de pesquisa e produtores, cujos conhecimentos são somados, facilitando o desenvolvimento e a aplicação de técnicas.

O presente trabalho se justifica pela deficiência de pesquisas científicas nacionais sobre as relações ecológicas entre orquídeas e fungos micorrícos rizoctonióides, assim como pela necessidade de avaliar novos materiais para o cultivo de orquídeas.

O objetivo do trabalho foi obter informações referentes ao crescimento de plântulas de *Hadrolaelia perrinii* submetidas a inoculações com fungos micorrízicos e cultivadas em diferentes substratos. Para isso, foram avaliados alguns aspectos dos substratos como condutividade elétrica, pH e composição química, e alterações

fisiológicas e morfológicas das plântulas, como massa de matéria seca e presença de estruturas características da associação fúngica em células vegetais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Orquídeas

Orquídeas são plantas que possuem importância tanto ecológica quanto econômica. Seu cultivo, em nível mundial, é, em grande parte, voltado ao mercado florista e envolve grande número de aficionados e colecionadores, embora o seu cultivo também seja de interesse em outros setores da economia como nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentícia.

Especificamente em relação ao mercado alimentício, orquídeas são utilizadas como fonte de matéria-prima ou fornecedora de compostos de interesse, sendo o mais importante deles a vanilina (também conhecida como baunilha). Oriunda de regiões quentes do globo, mais precisamente do México, *Vanilla planifolia* é a principal fonte natural para a extração da baunilha.

Não somente nessa espécie se encontram características de interesse econômico. Há relatos de que compostos oriundos de *Anoectochilus formosanus* Hayata são utilizados contra hipertensão, tuberculose, impotência sexual e em crianças com subdesenvolvimento (HUANG et al., 1991).

Estimativas mostram que o número de espécies de orquídeas é algo em torno de 30.000 espécies, sendo na sua maioria encontradas em regiões tropicais devido à necessidades especiais de umidade, temperatura e luminosidade; em regiões temperadas do globo essas estimativas apontam para um número aproximado de 810 espécies, ou seja, menos de 3% do total estimado. Entretanto, a maioria dos estudos de interações micorrízicas se concentra em espécies terrestres de regiões temperadas (OTERO et al., 2002).

2.2 *Hadrolaelia perrinii*

Divididas em cerca de 830 gêneros (DRESSLER, 1981), as 30.000 espécies de orquídeas são classificadas de acordo com o local onde se fixam, sendo mais conhecidos três hábitos: epífitas – que vivem em árvores –, rupícolas – que vivem sobre rochas – ou terrestres (ASSIS et al., 2005); América Tropical e Ásia Tropical são as regiões que mais detêm gêneros de orquídeas (DRESSLER, 1981).

Descrita pelo botânico James Bateman em 1847, *Hadrolaelia perrinii* – até recentemente conhecida como *Laelia perrinii* – tem sua origem no Brasil Central. Indivíduos dessa espécie florescem no outono e suas flores têm coloração violeta intensa; há variações com coloração branca (*alba*) e coloração azul (*coerulea*). São plantas de hábito epifítico que necessitam de luminosidade de média a alta e temperatura média para o cultivo, podendo ser realizado em casa de vegetação (FROWINE, 2005).

Diferentemente de outras espécies, de cultivo mais fácil e com demanda maior de mercado, *Hadrolaelia perrinii* não tem tanta procura para floricultura e ornamentação. Tal fato é explicado pelos floricultores como reflexo da curta duração de suas flores – em média sete dias – e do longo tempo de produção de seus exemplares, em torno de sete anos. Ainda segundo produtores, no mercado orquidófilo, formado por colecionadores, há interessados, mas a preferência é dada pelas variações de *Hadrolaelia perrinii*, ou seja, pelas formas *alba*, *semi-alba* e *coerulea*.

2.3 A Relação Ecológica: Fungos – Orquídeas

Como ocorre com todos os organismos vegetais, dos mais simples aos mais complexos, orquídeas necessitam de determinados fatores ambientais para o seu adequado desenvolvimento.

Para minimizar os impactos decorrentes de possíveis estresses ambientais, as orquídeas evoluíram no sentido de favorecer absorção de água e nutrientes, economizar energia na produção de mecanismos de reprodução com o fim de balancear e direcionar essa energia para a formação de outras estruturas. Seu sistema radicular é aéreo, o que facilita a absorção de água proveniente de precipitações pluviais, do orvalho noturno e da umidade do ar (ASSIS et al., 2005). A água oriunda dessas fontes é absorvida pelo velame, uma estrutura esponjosa formada por camadas de células mortas que cobrem a raiz (FARIA et al., 2001).

Seu mecanismo de reprodução desenvolveu sementes com tamanho reduzido, o que possibilita um decréscimo no valor energético utilizado durante o processo reprodutivo e possibilita o direcionamento de tal energia para outras finalidades, como a produção de flores. No entanto, não proporciona a quantidade suficiente de material nutritivo ao seu desenvolvimento inicial, o que resulta em uma dependência de fontes externas de carbono (McKENDRICK et al., 2000). Por isso, orquídeas encontram-se associadas a fungos micorrízicos (PERKINS & MCGEE, 1995) em ambiente natural; a germinação das sementes necessita de suprimento externo de nutrientes provenientes da associação com fungos compatíveis (SHAN et al., 2002). CAMERON et al. (2006) realizaram um trabalho no qual fontes isotopicamente marcadas de carbono e nitrogênio foram utilizadas para a investigação de processos metabólicos envolvendo a orquídea *Goodyera repens* e seu fungo associado. As investigações mostraram a presença dos radioisótopos tanto no micélio fúngico quanto em tecidos vegetais, demonstrando o caráter bidirecional do transporte de carbono entre os simbiontes. Outra observação realizada pelos autores foi a dependência da planta pelo nitrogênio orgânico fornecido pela associação com o fungo. Em laboratório há estudos que demonstram a germinação de sementes de orquídeas apenas com a utilização de certos hormônios ou meios de cultura específicos (PEREIRA et al., 2005b).

Fungos são organismos encontrados nos mais variados ambientes, de forma independente ou em associações com animais e vegetais. Quando estão associados a outros organismos, os fungos assumem funções ecológicas que podem ser prejudiciais, benéficas ou neutras; os dois primeiros casos são chamados, respectivamente, de parasitismo e mutualismo, em que se classificam as micorrizas.

Parasitismo é a associação ecológica pela qual um dos organismos, no caso o fungo, utiliza a planta hospedeira como fornecedora de todos os metabólitos necessários ao seu desenvolvimento, ou seja, é uma associação caracterizada por um transporte de nutrientes unidirecional no sentido hospedeiro-fungo; os principais elementos drenados do hospedeiro pelo fungo são nitrogênio e carbono proveniente de aminoácidos (SMITH & SMITH, 1990).

Nas orquídeas, os fungos assumem papel justamente oposto ao do parasitismo, ou seja, o mutualismo. A diferença existente entre parasitismo e mutualismo, segundo SMITH & SMITH (1990) consiste na disponibilidade de nutrientes na solução do solo. Dessa forma, é possível que ocorra parasitismo entre simbiontes que se encontram em ambientes nos quais a oferta de nutrientes (como nitrogênio, carbono e fósforo) é baixa,

ou seja, baixa quantidade de nutrientes impõe competição aos simbiontes; essa competição induzida leva ao parasitismo uma vez que o metabolismo fúngico é muito mais intenso do que o das plantas – especialmente orquídeas – facilitando a aquisição nutricional por parte dos fungos.

Como definição pode-se descrever o mutualismo micorrízico como a infecção de raízes e órgãos subterrâneos de organismos vegetais por fungos específicos sem o aparecimento de sintomas referentes à instalação de doenças. Há a formação de estruturas compatíveis entre os simbiontes – que permanecem por longos períodos – sem o aparecimento de sintomas que relacionem a infecção fúngica com doença (SMITH & SMITH, 1990).

Em outras palavras, micorrizas são associações pelas quais plantas vasculares são invadidas por fungos específicos demonstrando perfeita integração morfológica entre os simbiontes (SILVEIRA, 1992).

As micorrizas são classificadas em três grandes grupos caracterizados de acordo com o *modus operandi* dos mecanismos de infecção dos tecidos das raízes: ectomicorrizas, endomicorrizas e ectoendomicorrizas (SILVEIRA, 1992). Cada qual caracteriza-se pela formação de interfaces específicas entre os simbiontes, o que lhes proporciona conectividade e possibilita a transferência de nutrientes. Tais interfaces constituem pré-requisito para a movimentação de nutrientes entre os simbiontes e caracterizam-se por modificações morfológicas e fisiológicas de tecidos vegetais e dos fungos (SMITH & SMITH, 1990).

As endomicorrizas caracterizam-se pela ausência de manto de hifas fúngicas e a infecção ocorre tanto inter quanto intracelularmente na região do córtex. Dentro do grupo das endomicorrizas há três divisões: micorrizas ericóides, como as encontradas em azaléias (*Rhododendron* sp.); arbusculares, que possuem ocorrência quase que universal nas mais variadas ordens e grupos de plantas superiores; e orquidóides, que ocorrem em orquídeas (SILVEIRA, 1992).

Com a instalação da micorriza há um aumento significativo no volume de solo explorado, independentemente do tipo de micorriza. Esse aumento tem reflexo direto no metabolismo da planta proporcionando maior absorção de água e nutrientes para seu desenvolvimento. Todavia, o desenvolvimento da simbiose leva a alterações da permeabilidade da membrana no apoplasma, o que pode influenciar a transferência de nutrientes entre os simbiontes (SMITH & SMITH, 1990).

A troca de nutrientes entre fungos e plantas se dá através de estruturas formadas após a penetração de hifas fúngicas nas células hospedeiras. Como relatado por WARCUP & TALBOT (1967), em ambiente natural, orquídeas são infectadas, principalmente intracelularmente, por fungos que formam novelos de hifas em tecidos celulares das raízes. Os dois autores deram o nome de "*peloton*" a esses novelos de hifas formados e esse foi o primeiro relato na literatura da formação de tais estruturas.

Os *pelotons* são normalmente observados de dois modos distintos, de acordo com o estádio de desenvolvimento da associação fungo-planta: *pelotons* intactos ou *pelotons* digeridos. Os *pelotons* intactos correspondem ao período inicial de colonização fúngica e caracterizam-se por uma massa de hifas em desenvolvimento contínuo que pode chegar a ocupar todo o espaço intracelular. Já os *pelotons* digeridos representam os momentos finais da associação e caracterizam-se por massas de hifas condensadas que ocupam pequeno espaço na célula hospedeira (UETAKE et al., 1997).

Tanto *pelotons* intactos quanto *pelotons* digeridos são, tradicionalmente, agrupados em dois tipos histológicos reconhecidos para micorrizas orquidóides: tolipofágico e ptiofágico (RASMUSSEN, 2002).

O tipo tolipofágico tem por característica a formação de novelos bem estruturados de hifas – *pelotons* intactos – nas células infectadas; isso ocorre antes de qualquer atividade de lise. Outra característica do tipo tolipofágico é que seu mecanismo de atuação é cíclico; ocorre a infecção da célula hospedeira por hifas fúngicas, há a formação de *pelotons*, ocorre a lise total dessas hifas que se condensam dando origem a *pelotons* digeridos. Posteriormente, ocorre a re-infecção e o surgimento de novos *pelotons* (RASMUSSEN, 1995). Esse é o tipo histológico encontrado na maioria das espécies (RASMUSSEN, 2002).

O tipo ptiofágico caracteriza-se por um processo contínuo e o escoamento de compostos ocorre através da lise das extremidades das hifas fúngicas, o que possibilita o acesso da planta a novos materiais. Esse tipo é encontrado apenas em plantas tropicais cujo grau de micotrofismo é muito alto. Devido a sua incidência em regiões tropicais e à falta de estudos relacionados ao assunto, o tipo ptiofágico é pouco conhecido (RASMUSSEN, 1995).

Em espécies de orquídeas há uma estrutura específica que se forma entre os estádios de semente e plântula – chamada de protocórmio – que é a responsável pela digestão enzimática de fungos simbiontes, a qual serve como fonte de energia alternativa (RASMUSSEN, 1995). A partir dessa obtenção de energia, instala-se um

mecanismo de alimentação no qual a planta é nutrida pelo fungo e cujo nome dado é micotrofismo (RASMUSSEN & WHIGHAM, 2002). Assim, o fungo passa a ser responsável pela quebra de compostos complexos em compostos mais simples e da sua transferência para a planta (SMITH et al., 1994). Os compostos originados de fontes como celulose, hemicelulose, amido e pectina podem ser decompostos pela ação de enzimas produzidas pelos fungos e serem transportados até a planta (RASMUSSEN, 1995).

Outro composto importante fornecido pelo fungo à planta é o hormônio auxina (ácido indol acético, ou AIA). Um estudo realizado por EK et al. (1983) utilizou 19 fungos micorrízicos para verificação da produção de AIA – no meio de cultura e no micélio – através de cromatografia gasosa por espectrômetro de massa. Em 17 dos 19 fungos micorrízicos foi possível a detecção de AIA presente meio de cultura. Já para a avaliação realizada no micélio, 11 fungos apresentavam AIA em sua constituição. Os autores citaram a possível participação de AIA no processo de infecção.

Em troca da nutrição mineral, a planta funciona como abrigo ao fungo contra agentes externos e, após o período inicial de seu desenvolvimento, fornece ao fungo produtos de seu metabolismo fotossintético – fotossintatos (BARKER et al., 1998).

A especificidade entre fungos e orquídeas é fundamental ao estabelecimento das associações micorrízicas e pode ser diferenciada por dois tipos: especificidade absoluta ou especificidade ecológica. Ambas as especificidades têm relação com o número de espécies fúngicas com as quais as plantas são capazes de se associar. No caso de orquídeas se associarem a apenas uma espécie fúngica durante seu desenvolvimento tem-se especificidade absoluta. Quando a associação permite que um número maior de fungos atue tem-se a especificidade ecológica (McCORMICK et al., 2004).

Seguindo essa linha de pesquisa, ZETTLER et al. (1999) realizaram germinação simbiótica de sementes de *Encyclia tampensis* utilizando um fungo isolado de *Epidendrum conopseum*. Para a verificação da germinação, os autores subdividiram os estádios do desenvolvimento em seis fases denominadas de 0 a 5 (0 – correspondia a nenhuma germinação, 1 – surgimento de pêlos absorventes pelo embrião, 2 – ruptura da parede do embrião, 3 – aparecimento de protomeristema, 4 – surgimento da primeira folha e 5 – crescimento da primeira folha). A maioria das sementes de *E. tampensis* germinou aos 21 dias atingindo o estádio 2 de desenvolvimento. Observaram também que durante 13 semanas o desenvolvimento foi contínuo e quase metade das sementes (46,6%) chegaram a desenvolver protomeristema (estádio 3). Por outro lado, poucas

sementes se desenvolveram até a formação de uma base sustentadora para as folhas (2,2%) representada pelo estádio 4. O fato de não terem observado a continuidade do desenvolvimento germinativo após as 13 semanas pode ter mascarado alguns estímulos requisitados para o crescimento da planta e isso, segundo os autores, continua sem esclarecimentos.

Até há algum tempo, assumia-se que os fungos que se associam a orquídeas pertenciam ao gênero *Rhizoctonia*, mas com os avanços nas técnicas moleculares foi possível uma identificação mais confiável de fungos. Isso pôde ser comprovado por SEN et al. (1999) que citam como processos importantes na identificação recente de fungos aqueles baseados nas características de grupos de anastomose de hifas (*anastomosis group* – AG) e técnicas moleculares de impressões de DNA. Para tanto, isolaram fungos pertencentes ao gênero *Rhizoctonia* de viveiros de pinheiros (*Pinus sylvestris* L.) e os caracterizaram segundo os parâmetros acima citados – anastomose de hifas e impressões digitais de DNA. Os resultados para AG passaram por triagem e foram comparados a testes conhecidos para identificação de *Ceratobasidium* e para *Rhizoctonia* patogênico. Por essa comparação obtiveram a confirmação dos isolados obtidos.

Estudos relacionados à associação entre fungos e orquídeas se restringem aos primeiros estádios de desenvolvimento das plantas. Não foram encontrados relatos na literatura sobre a participação dos fungos no metabolismo vegetal nos estádios posteriores à germinação, dessa forma, o papel, a longo prazo, do fungo mantém-se sem esclarecimentos (ZETTLER et al., 1999).

2.4 Substratos Utilizados em Cultivos de Plantas

Até pouco tempo atrás o material mais indicado e utilizado nos cultivos comerciais de orquídeas era o xaxim. Xaxim é o nome dado ao produto comercial oriundo de uma popular pteridófita cujo nome científico é *Dicksonia sellowiana* Hook (também chamada samambaiaçu). Suas raízes são utilizadas há muito tempo por cultivadores de orquídeas e de outras espécies, graças à característica que possui como textura relativamente grossa de drenagem livre, o que possibilita às raízes uma maior facilidade de acesso ao ar e à luz, fatores importantes para orquídeas de hábitos epifíticos, principalmente (COLOMBO et al., 2005).

Porém sua extração não racional e a demora para que se atinja o estádio correto para sua utilização (cerca de 15 a 18 anos) levou o Instituto Brasileiro do Meio

Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA) a publicar em 3 de abril de 1992 a Portaria nº 37N declarando o xaxim como um organismo ameaçado de extinção, juntamente com uma série de outras espécies vegetais.

Por conta disso, alguns materiais vêm sendo testados como substratos nos mais variados cultivos com resultados promissores. Um desses materiais é a casca de várias espécies do gênero *Pinus* proveniente, na maioria das vezes, de resíduos da indústria de papel. Esse resíduo possui, basicamente, celulose em sua constituição e sua utilização ocorre após o material obtido ser compostado e moído, o que lhe permite grande amplitude granulométrica, desde pó até vários centímetros (MARTIN et al., 2006). Essa amplitude granulométrica é característica importante para a retenção de água, fator diretamente relacionado ao sucesso de produção para a maioria das culturas, já que cada uma delas necessita de quantidades diferenciadas de umidade. Fisicamente trata-se de um material que se caracteriza por fácil drenagem e baixa absorção de água, além de, quimicamente, possuir pH em torno de 3,7 (MARTIN et al., 2006). Os valores de pH tão baixos apresentados pela casca de *Pinus* representam um problema em relação à disponibilidade de nutrientes para as plantas, mas a sua correção pode ser realizada de forma simples pelo uso de doses calculadas de calcário.

Características biológicas – como germinação de sementes – também são avaliadas quando da utilização de substratos à base de casca de *Pinus*. Para tal, MACHADO NETO et al. (2005) utilizaram papel umedecido com extrato aquoso lixiviado de três diferentes substratos (xaxim, musgo e casca de *Pinus*) para a verificação da germinação de alface, rabanete, tomate e pepino. Os resultados não mostraram diferenças significativas em relação à germinação para nenhuma das três espécies, o que indica ausência de elementos tóxicos nos lixiviados ou sua presença em baixas concentrações, insuficientes para causar qualquer inibição da germinação.

Outro produto de consumo alimentar – o pimentão – também já foi submetido ao cultivo em casca de *Pinus* comparado a outras fontes de nutrientes; entendendo-se por fonte de nutrientes a fase líquida que o substrato possui (MARTIN et al., 2006).

Todavia, FARIA et al. (2001) obtiveram resultados diferentes com *Oncidium baueri* e *Maxillaria picta*. Isso foi verificado com a instalação de um experimento contendo 13 substratos: xaxim (desfibrado e em cubos), vermiculita (utilizada isoladamente, acrescida de carbono, associada com casca de arroz carbonizada e adicionada com carvão vegetal e isopor), carvão vegetal (isoladamente, adicionado a casca de arroz carbonizada, acrescido de isopor e associado a casca de *Pinus* e isopor),

“crocks”, casca de arroz (utilizada isoladamente) e casca de *Pinus* onde foram avaliados o comprimento das plantas (CP), número de brotos (NB), comprimento (CB) e largura (LB) dos pseudobulbos para *O. baueri*. Para *M. picta* foram observados, além de comprimento e largura dos peseudobulbos, o comprimento (CF) e a largura das folhas (LF). Os piores resultados obtidos – no cultivo de *O. baueri* – para CP corresponderam ao substrato formado por casca de *Pinus*, vermiculita adicionada com carvão vegetal e utilizada isoladamente. Para CB o melhor resultado foi obtido em vermiculita (isolada) e cubos de xaxim, por outro lado, os piores resultados correspondem à vermiculita acrescida com carvão vegetal. Xaxim (em cubos) e vermiculita foram os substratos que mostraram os melhores resultados para o cultivo de *O. baueri* em casa de vegetação. Já para o cultivo de *M. picta* os melhores resultados para CF foram obtidos com os dois tipos de xaxim (desfibrado e cubos), seguidos por vermiculita acrescida com carvão vegetal. Casca de *Pinus* foi o que apresentou o valor mais baixo para a CF. Como sugestão, os autores assinalaram a substituição de xaxim por vermiculita acrescida com carvão vegetal. De qualquer maneira, há a necessidade de realização de novos trabalhos.

Outro material que vem sendo utilizado como substrato em diversos setores do cultivo é a fibra de coco, tanto de coco verde quanto de coco maduro. A fibra de coco representa um problema de saúde pública em muitas regiões do país devido à sua grande disponibilidade e dificuldade de decomposição de forma natural, sendo necessários mais de oito anos para sua decomposição (CARRIJO et al., 2002). A fibra de coco maduro é obtida, principalmente, como resíduo da indústria nordestina de capachos e possui utilização no segmento do cultivo ornamental.

Exemplo de sua utilização em cultivo ornamental, especificamente no mercado de orquidáceas, pode ser verificado de acordo com o trabalho realizado por ASSIS et al. (2005) que utilizou materiais à base de coco para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. obtidas *in vitro*. Os autores utilizaram diversas misturas de substratos formadas com xaxim desfibrado e fibra de coco (em pó e em cubos). Realizaram adubações foliares (NPK 10-10-10) a cada trinta dias e adubações orgânicas, compostas por farinha de osso e torta de mamona, a cada noventa dias; analisaram parâmetros de crescimento como altura das plantas, diâmetro dos pseudobulbos, comprimento da maior raiz, massa de matéria seca das raízes, número de brotações e pH dos substratos. Os resultados mostraram diferenças significativas para as variáveis: diâmetro do pseudobulbo, número de brotos (esse, segundo os autores, tem

grande importância na comercialização de orquídeas, pois quanto maior o seu número, maior será o número de flores), comprimento da maior raiz. Para a variável pH os resultados para todos os substratos mantiveram-se entre 6,19 e 6,71, valores adequados para o cultivo de *Dendrobium* sp. segundo a literatura. Como conclusão, os autores sugeriram a utilização de substratos à base de coco – coco desfibrado e mistura de coco em cubos com pó de coco – em substituição ao xaxim.

Outro exemplo da aplicação de fibra de coco no cultivo de plantas ornamentais é verificado em *Syngonium angustatum* (singônio). O singônio é uma planta cultivada em vasos à base de tutores e que tem aplicação na decoração de ambientes internos ou em jardins, como forração (SOUZA & JASMIN, 2004). Os autores compararam o crescimento de *Syngonium angustatum* Schott em substratos distintos – mesocarpo de coco, xaxim e um substrato comercial não especificado no trabalho. Observaram que os valores obtidos para o pH – entre 4,52 e 5,40 – encontravam-se dentro da faixa tida como adequada na literatura. Já os valores de condutividade elétrica, embora altos, não interferiram no crescimento do singônio.

Já a fibra de coco verde para uso como substrato de cultivo é proveniente, em sua maior parte, da extração de sua água para o consumo humano. Sua aplicação agrícola ainda é pequena, se comparada à aplicação da fibra de coco maduro, porém, além de servir como incentivador à geração de novos empregos (catadores, tratadores, distribuidores, entre outros), mostrando sua importância econômica e social, a fibra de coco verde tem importância ambiental, podendo se tornar matéria-prima de substratos para a produção de mudas ou em cultivos que não utilizam solo (CARRIJO et al., 2002).

Independentemente da sua origem, a fibra de coco precisa passar por tratamentos antes de se tornar apta à utilização agrícola. Para isso, as fibras são desmembradas formando enormes cordões que, posteriormente, são secados. Depois de secos, os cordões de fibras têm destinos diversos, podendo ser prensados com a utilização de colas inertes, que não modificam a estrutura química da fibra, ou triturados, para serem utilizados no cultivo de espécies que necessitam de granulometrias mais finas, ou ainda mesmo utilizados soltos, sem prensagem.

2.5 Composição Química dos Substratos

Materiais que possuem aplicabilidade agrícola devem ser submetidos, antes de sua utilização, a avaliações de sua composição química. Os valores de pH e condutividade elétrica são de fundamental importância em estudos relacionados à

germinação de sementes e desenvolvimento de plantas, desde plântulas até o estádio adulto (KÄMPF, 2005). Ainda segundo KÄMPF (2005), faixas ideais de pH adotadas para os cultivos de espécies pertencentes aos gêneros *Cattleya* e *Dendrobium* correspondem de 5 a 5,5 e 5,5 a 7, respectivamente.

Segundo HIGASHI et al. (2002) valores baixos de pH provocam competição iônica entre H^+ e íons essenciais para as plantas, como NH_4^+, K^+, Ca^{++},Mg^{++}, Cu^{++}, Fe^{++}, Mn^{++} e Zn^{++}, enquanto valores altos de pH diminuem a absorção dos ânions NO_3^-, $H_2PO_4^-$, SO_4^-, Cl^- e MoO_4^-.

Outro parâmetro importante que necessita de ser avaliado é a condutividade elétrica. A condutividade elétrica refere-se à quantidade de sais dissolvidos na água e possui relação direta com a pressão osmótica. Como conseqüência do aumento de sais dissolvidos na água há um aumento na pressão osmótica, levando a uma diminuição na penetração da solução nas raízes das plantas. Em casos mais acentuados, uma concentração muito elevada de sais dissolvidos leva à perda de água pelas raízes das plantas, ocasionando sua morte (HIGASHI et al., 2002).

Algumas plantas, chamadas halófitas, possuem a habilidade de se desenvolver em ambientes onde as concentrações de sal são muito altas; exemplo disso é a erva-sal (*Atriplex nummularia*). Originada de regiões áridas, a erva-sal vem sendo utilizada no descarte de rejeito proveniente da dessalinização da água na região nordeste do Brasil (PORTO et al., 2000). Durante todo o ciclo reprodutivo anual, plantas de erva-sal foram cultivas e submetidas a irrigações com água de rejeito. Medidas foram realizadas em três camadas de solo (0-30; 30-60 e 60-90cm), antes e depois das irrigações, para as variáveis pH e condutividade elétrica (CE) (PORTO et al., 2000).

Previamente à irrigação do local escolhido por PORTO et al. (2000) com a água do rejeito, à profundidade de 0-30 cm, o pH registrado foi 6,7 e a CE, 0,41 dS/m. Na profundidade seguinte (30-60 cm), o pH foi 6,6 e a CE, 0,80 dS/m. Na camada mais profunda (60-90 cm) o valor de pH foi de 5,9 e a CE 0,72 dS/m. Esses valores originaram as médias para pH e CE que foram de 6,4 e 0,64 dS/m, respectivamente. Após a irrigação os valores obtidos foram: 0-30 cm – pH = 6,7 e CE = 13 dS/m; 30-60 cm – pH = 6,2 e CE = 12,61 dS/m; 60-90 cm – pH = 5,9 e CE = 12,62 dS/m (gerando médias de pH iguais a 6,26 e de CE iguais a 12,74 dS/m). Em comparação, a condutividade elétrica recomendada para cultivo de eucalipto está entre 1,25 e 2,3 mS/cm (HIGASHI et al., 2002). Trabalhos como este podem representar avanços no estudo de orquídeas, uma vez que não há estudos sobre ao tema, e informações sobre a

concentração de sais nos meios de cultura são importantes fatores da nutrição de plantas; para isso, há a necessidade da aplicação de tais procedimentos em experimentos de cultivo de orquídeas.

A perda de água pelas plantas é um aspecto importante para o processo de assimilação de dióxido de carbono (CO_2). Plantas que possuem metabolismo do tipo CAM (metabolismo ácido das crassuláceas) desenvolveram adaptações para evitar perda de água através do fechamento diurno de seus estômatos e realização da fixação de CO_2 à noite, fator que leva a um crescimento muito vagaroso. São plantas que se caracterizam por aspecto suculento e por serem oriundas de regiões desérticas ou sujeitas a secas periódicas (ALVES, 2004). Indivíduos representantes desse tipo de metabolismo são encontrados em diversas famílias: como Bromeliaceae (*Aechmea tillandsioides*, *Tillandsia paraensis*, por exemplo), Orchidaceae (*Cattleya violacea*, *Maxillaria discolor*, *Epidendrum sculptum* e *Octomeria lancipetala*, por exemplo) e Cactaceae (*Epyphillum phyllanthus*, por exemplo), apenas para citar algumas (HERNÁNDEZ-ROSAS, 1999).

Outras adaptações que ocorreram ao longo da evolução das espécies de orquídeas envolvem a formação de órgãos subterrâneos (gêneros *Orchis*, *Habenaria* e *Platanthera*, por exemplo) e rizomas suculentos (gêneros *Cypripedium* e *Goodyera*, por exemplo) (PRIDGEON et al., 1999).

2.6 Necessidades Nutricionais das Orquídeas

Durante muito tempo não houve interesse pela adubação de orquídeas, pois se acreditava que os nutrientes seriam todos fornecidos pelos meios de cultivo (RODRIGUES, 2005).

Em relação à adubação *in vitro*, não se tem um meio de cultivo padrão que possa ser utilizado para todas as espécies, híbridos ou clones, e segundo DIJK & ECK (1995), há grande especificidade entre meios de cultivo e genótipos de orquídeas, ou seja, cada espécie teria um meio de cultivo mais apropriado.

Para a adubação realizada em orquídeas de vasos, percebeu-se que plantas adubadas produziam melhores flores, antecipavam sua fase adulta e possuíam maior resistência a pragas e doenças (RODRIGUES, 2005). Mas da mesma forma que trazem benefícios, as adubações também proporcionam prejuízos, principalmente quando os limites naturais das plantas são ultrapassados. Entre os orquidófilos, estabeleceu-se que

a utilização de 1 g/L de um fertilizante hidrossolúvel seria suficiente para o crescimento e desenvolvimento adequados em orquídeas.

Na natureza, uma grande fonte de nutrientes é a solução formada pelos nutrientes e a água das chuvas e, embora não haja grande concentração de fósforo nessa solução, as orquídeas desenvolveram mecanismos para sua obtenção, o que envolve a sua associação com fungos micorrízicos (RODRIGUES, 2005).

2.7 Substratos e Adubação no Cultivo de Orquídeas

O cultivo de orquídeas tem se destacado como um mercado rentável em muitas partes do mundo, mas a preocupação com a utilização de materiais de cultivo provenientes de fontes renováveis vem aumentando ao longo dos últimos anos. Como, no Brasil, a maioria da matéria-prima utilizada no cultivo de orquidáceas é proveniente de xaxim, alguns materiais, muitas vezes inusitados, ganham notoriedade e entram nas listas de testes de pesquisadores ao redor do mundo.

Em um trabalho realizado por RODRIGUES (2005), utilizou-se o xaxim como substrato na avaliação do comportamento de plântulas obtidas pelo cruzamento entre *Laelia purpurata* "werkhauseri" e *Laelia lobata* "Jenni" submetidas a diferentes fertilizações. O autor utilizou quatro fertilizantes – dois minerais (nitrato de Cálcio e adubo Peters® 20-20-20) e dois orgânicos (um comercial e um doméstico, produzido por uma mistura de torta de mamona, farinha de osso e cinza na proporção 2:1:1 v/v/v) – e algumas combinações entre eles em plântulas obtidas de germinação *in vitro*, sendo os fertilizantes orgânicos aplicados a cada dois meses e os minerais, semanalmente. O autor observou que o fertilizante orgânico comercial produziu folhas mal formadas, com coloração verde muito intensa, excessivo número de brotações e perdas significativas das raízes, possivelmente ocasionados pela concentração muito alta de boro em sua constituição. A mistura produzida por Peters® e o fertilizante orgânico doméstico resultou em um incremento de matéria seca da parte aérea quando comparada à utilização isolada de ambos, provavelmente pelo complemento na adubação de N, P, K e Ca. A adubação, segundo o autor, produz um efeito tampão na superfície do substrato, diminuindo a aeração das raízes e provocando sua morte. Por fim, o autor propôs a utilização de fertilizações orgânicas, desde que sejam realizadas de forma a permitir a aeração do substrato, ou seja, em volta da borda do vaso.

As espécies preferenciais para a realização dos testes de viabilidade de novos substratos têm sido, preferencialmente, as pertencentes aos gêneros *Cattleya*, *Oncidium* e *Dendrobium* devido aos seus apelos econômicos.

Testes realizados em um híbrido obtido pelo cruzamento de *C. labiata* Lindl. e *C. forbesii* Lindl. utilizaram sete combinações diferentes de substratos que incluíam: xaxim, fibra de coco, casca de *Pinus* + casca de arroz carbonizada nas proporções de 1:1, 2:1 e 1:2 (volume/volume), casca de *Pinus* e casca de arroz carbonizada utilizados isoladamente (YAMAKAMI et al., 2006). Os autores realizaram adubações mensais foliares (formulação NPK 10-10-10) e trimestrais (adubação orgânica com farinha de osso e torta de mamona) até que se completasse um ano. De acordo com os resultados obtidos para massa da matéria fresca total, os tratamentos constituídos por xaxim, fibra de coco e casca de *Pinus* + casca de arroz carbonizada na proporção de 2:1 não mostraram diferença significativa entre si. Mesmo assim, os autores comentaram que estes substratos obtiveram os melhores valores. Já para a variável altura da planta o tratamento menos favorecido – e estatisticamente diferente – foi casca de arroz carbonizada. Por conta de o tratamento à base de fibra de coco estar entre os que obtiveram os melhores resultados para todas as variáveis, os autores sugeriram a substituição do xaxim por esse material. O experimento foi realizado com o híbrido obtido e nenhum comentário foi realizado em relação à sua utilização em outras espécies de orquídeas, apenas foram citados valores obtidos para as mesmas variáveis em outros trabalhos, esses sim utilizando outras espécies.

Em outro trabalho realizado com *Cattleya* as observações dos autores se dirigiram a uma fase importante do desenvolvimento de orquídeas: a aclimatização. COLOMBO et al. (2005) testaram quatro substratos – esfagno, pó de coco, fibra de coco e xaxim – avaliando qual o mais adequado para a aclimatização juntamente com dois sistemas de irrigação – um manual e outro com nebulização; a orquídea utilizada no experimento foi *Cattleya* Chocolate Drop, obtida pelo cruzamento de *C. guttata* Lindl. e *C. aurantiaca* Lindl. Mesmo não havendo diferença significativa entre os dois sistemas de irrigação, os autores afirmam que a irrigação manual mostrou-se mais eficiente na altura da planta enquanto a irrigação com nebulização favoreceu a formação de um número maior de raízes. Independentemente do sistema de irrigação, esfagno foi o substrato que obteve a menor taxa de sobrevivência das plântulas. Outras variáveis foram observadas: altura da parte aérea (cm), número de raízes, massa de matéria fresca da planta (g) e número de plantas com brotos. Para altura da parte aérea e número de

raízes não foi verificada significância pelo teste de Tukey (5%). Quanto à variável massa de matéria fresca da planta, os substratos à base de fibra de coco e xaxim não diferiram de pó de coco e esfagno porém, plantas cultivadas em pó de coco mostraram massa superior a apresentada em esfagno. Como conclusão, os autores sugeriram que substratos que contêm fibra de coco em sua mistura podem substituir o xaxim para aclimatização de *Cattleya* Chocolate Drop. Isso se deve, além dos resultados obtidos, ao extrativismo indiscriminado que pode levar à extinção o xaxim e o esfagno, segundo os autores.

Outros trabalhos também abordam a fase de aclimatização, porém em espécies diferentes. MORAES et al. (2002) utilizaram quatro diferentes substratos – em comparação ao xaxim – para aclimatização de exemplares de *Dendrobium nobile* Lindl; mais uma vez foram avaliados a taxa de sobrevivência das plântulas, a altura da parte aérea das plântulas e o comprimento do sistema radicular. Em relação à taxa de sobrevivência das plântulas não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Já para o comprimento da parte aérea o tratamento que mostrou melhor resultado foi o composto por plantmax + carvão vegetal e isopor moído. Segundo especulação dos autores, este substrato foi capaz de fornecer os nutrientes adequados às plântulas, refletindo na obtenção do melhor valor para o comprimento da parte aérea; plantamax e carvão teriam fornecido nutrientes enquanto o isopor, aeração. O comprimento do sistema radicular foi maior no tratamento composto por xaxim.

A literatura confirma a excelência do xaxim no cultivo de orquídeas, mas sua situação de planta ameaçada exige sua substituição. Por conta dos resultados obtidos nos parâmetros analisados, MORAES et al. (2002) sugeriram a substituição do xaxim por substratos à base de plantmax + carvão vegetal + isopor moído e vermiculita + plantmax.

3 MATERIAL & MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nas dependências do Instituto Agronômico (IAC), em Campinas.

Todas as etapas realizadas seguiram um cronograma constituído basicamente de três partes: a primeira etapa teve relação com a realização de testes prévios realizados nos substratos (obtenção da capacidade máxima de retenção e curva de perda de água); a segunda etapa observou o desempenho da *Hadrolaelia perrinii* em alguns substratos; a

terceira etapa consistiu da verificação da eficiência de tratamentos de inoculação de fungos possivelmente micorrízicos em plântulas obtidas *in vitro*.

Todas as etapas foram realizadas em casa de vegetação.

3.1 Obtenção de Plântulas

O material vegetal utilizado no experimento – plântulas de *Hadrolaelia perrinii* – foi obtido por semeadura sob condições controladas de umidade e temperatura, em meio de cultura apropriado (FARIA & STANCATO, 1998). Todas as plântulas de *Hadrolaelia perrinii* utilizadas durante o experimento foram obtidas dessa forma, permitindo padronização de tamanho e massa.

3.2 Isolamento de Fungos das Raízes de Diferentes Espécies de Orquídeas Adultas

Para o isolamento de fungos potencialmente micorrízicos foram coletadas amostras de raízes de orquídeas adultas nos orquidários do Instituto de Botânica, em São Paulo, e da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ)/USP, em Piracicaba. Foram coletadas amostras de raízes das seguintes 39 espécies de orquídeas: *Brassavola nodosa, Bulbophyllum purpureorhachis, Cattleya amethystoglossa, C. aurantiaca, C. bowringhiana, C. elongata, C. forbesii, C. granulosa, C. guttata, C. harrisoniana, C. intermedia, C. labiata, C. leopoldii, C. loddigesii, C. mossiae, C. skinneri, C. trianae, Dendrobium aggregatum, Encyclia acuta, E. flava, Hadrolaelia cinnabarina, H. lobata, H. longipes, H. perrinii, H. pumila, H. purpurata, H. rupestris, H. tenebrosa, Hormidium cochleatum, H. crassilabium, H. ionophlebium, Maxillaria subulata, M. tenuifolia, Octomeria loefgrenii, Oncidium ornithoryncum, Pleurothalis glumacea, Schomburgkia crispa, Stelis leinigii, Trichotosia barbarossa*. As raízes foram aleatoriamente cortadas com a utilização de tesoura previamente mergulhada em álcool 70%. Esse procedimento foi realizado toda vez que houve mudança na espécie de orquídea. Foram coletados de cinco a dez fragmentos de raízes – raízes aéreas ou em contato com o substrato – de cada uma das espécies acima citadas.

As amostras foram etiquetadas, armazenadas em sacos plásticos e levadas ao laboratório, onde foram submetidas, inicialmente, a tratamentos de limpeza e assepsia. O tratamento de limpeza consistiu da lavagem de alguns fragmentos das raízes em água corrente pelo tempo necessário até que todo resíduo externo fosse retirado; amostras que não foram prontamente utilizadas permaneceram armazenadas em geladeira a 4^{o}C. Após a lavagem dos fragmentos, seus velames foram removidos. Os fragmentos, já sem

velame, foram então mergulhados em um recipiente contendo álcool a 70% e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio a 2% por dois minutos e meio (PEREIRA, 2001). Na seqüência, os fragmentos de raízes foram depositados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e mantidos em incubadora a 28°C pelo tempo necessário ao crescimento miceliano.

Realizaram-se observações diárias do material nas placas de Petri para identificação de características macroscópicas típicas de fungos rizoctonióides, com especial atenção ao crescimento miceliano – coloração da colônia, textura e quantidade de hifas (PEREIRA et al., 2005). Fungos com as características compatíveis foram isolados e, depois, observados ao microscópio, para a confirmação da presença de outras características rizoctonióides: hifas septadas, com constrições nos septos, ramificações em ângulos de 90^{o} e ausência de esporos. A confirmação da identificação dos fungos foi realizada pela Dra. Maria Aparecida de Souza Tanaka, fitopatologista do IAC.

Os isolados obtidos foram nomeados de acordo com a data de sua obtenção e a nomenclatura consistiu da sigla "F. O." (Fungo da Orquídea) seguida de números seqüenciais (1,2,3,...).

Após identificação, os microrganismos foram transferidos para tubos contendo meio inclinado de BDA e mantidos sob refrigeração (4^{o}C) para que pudessem ser utilizados posteriormente.

3.3 Determinação da Capacidade de Retenção de Água pelos Substratos

Consideram-se, entre diversos materiais apropriados para o cultivo de *Hadrolaelia perrinii*, cinco substratos de diversas origens: Xaxim, Coxim, Biomax, substrato comercial e uma mistura de Cascas de *Pinus* com carvão vegetal. Tais materiais consistem, basicamente, de fibras vegetais.

O xaxim foi usado como testemunha. No experimento, utilizaram-se como substrato pedaços de xaxim, de tamanho compatível com o dos vasos.

Coxim e Biomax são constituídos por fibras de coco, mas são apresentados em granulometrias diferentes. Coxim é fibra do coco prensada com cola inerte para a formação de placas enquanto Biomax se apresenta na forma de fibras de coco soltas. Ambos possuem coloração parda. Apesar de serem materiais de mesma origem, a inclusão de Coxim e Biomax foi baseada justamente na diferença granulométrica

existente, fator que pode alterar o comportamento físico-químico do substrato e fisiológico da planta.

O substrato aqui chamado Comercial possui coloração escura e composição turfosa. Caracteriza-se por uma mistura de pequenos pedaços de galhos, folhas secas e fibras vegetais não especificadas pelo produtor.

A casca de *Pinus* sp. tem coloração castanha e apresenta-se na forma de pequenos fragmentos. A adição de carvão vegetal tem como objetivo aumentar a capacidade de retenção de água pelo substrato.

Para a padronização da utilização dos substratos realizou-se um peneiramento seqüencial do substrato Comercial para determinação da capacidade de retenção de água em cada uma de suas frações; apenas esse substrato foi submetido a tal tratamento por se tratar de um material pouco conhecido.

Para o peneiramento foram medidos dois litros do substrato comercial em frascos de Erlenmayer e tomados como volume inicial. Esse volume foi passado por peneiras com poros de diâmetros diferentes; os diâmetros dos poros das peneiras utilizadas foram: 9,52 mm (ABNT 3/8), 7,63 mm (ABNT 5/16), 6,35 mm (ABNT 1/4), 4,00 mm (ABNT 5), 2,00 mm (ABNT 10), 0,71 mm (ABNT 25), 0,250 mm (ABNT 60) e 0,074 mm (ABNT 200).

Cada uma das frações separadas foi colocada em placas de Petri e pesada para a obtenção da massa da matéria fresca (MMF), que representa a fração do substrato com água. As placas foram colocadas em estufa a 55^{o}C e pesadas a cada 24 horas até massa constante, que representa o material que não possui mais água, ou seja, a massa da matéria seca (MMS) para cada fração do substrato.

Para definição de qual peneiramento seria o mais adequado foi observada qual fração (ou quais frações) representava o maior volume em relação ao volume inicial. A soma das frações maiores que 2 mm representou aproximadamente 60 % do volume inicial. Significou economia no substrato para a montagem do experimento, isto é, utilizou-se menor quantidade do total de substrato Comercial originalmente disponível. Além disso, recomenda-se que seja feito um peneiramento com o intuito de se retirarem as frações menores que apresentam alta absorção de água, já que, um grande número de espécies de orquídeas é suscetível a excessos de umidade, o que poderia comprometer o experimento. Levando-se em consideração esses dois fatores decidiu-se adotar o peneiramento em malha de 2 mm.

Todos os substratos passaram por peneiramento em malha de 2 mm, mas cada um deles passou por tratamentos diferenciados que os tornassem compatíveis com o volume dos vasos utilizados e aptos à utilização no cultivo de orquídeas.

O xaxim foi cortado em fragmentos de 3 a 4 cm com a utilização de tesoura de poda lavada em água corrente.

Coxim e Biomax passaram por imersões sucessivas em água destilada que, a cada 24 horas, foi descartada. A operação foi realizada por três dias consecutivos e teve o intuito de se retirarem os taninos dos materiais. Os taninos vegetais são compostos fenólicos que possuem a capacidade de associação e combinação com proteínas (TRUGILHO et al., 1997), podendo prejudicar o desenvolvimento do cultivo. Antes de serem submetidas às imersões, as placas de coxim foram cortadas em cubos de 2 cm^3.

A casca de *Pinus* sp. não sofreu tratamento diferenciado, apenas foi submetida a peneiramento.

Após esses tratamentos prévios, montou-se um experimento com o objetivo de conhecer melhor sua capacidade máxima de retenção de água (CMRA).

Para a montagem do experimento, um volume suficiente para encher cinco vasos de 100 mL de cada um dos substratos foi separado e colocado em bandejas para secar ao ar durante sete dias.

Os vasos foram preenchidos e pesados, tendo-se obtido, assim, a tara correspondente à soma da massa do vaso e do substrato seco.

Depois de pesados, os vasos foram mantidos submersos em água destilada por um período de 48 horas com posterior drenagem por 24 horas. Após a drenagem, os vasos foram novamente pesados e suas massas definidas como a capacidade máxima de retenção de água (CMRA), ou seja, 100% da quantidade de água que o substrato poderia absorver.

3.4 Determinação da Curva de Perda de Água dos Substratos

A curva de perda de água (CPA) foi determinada com o fim de facilitar a irrigação das plântulas no momento em que todos os substratos se encontrassem com a mesma porcentagem de umidade, cada um a seu tempo.

Para a determinação da CPA dos diferentes substratos, os vasos preenchidos com substrato saturado (em CMRA; item 3.3) foram pesados diariamente – por um período de oito dias, no mesmo horário do dia.

A freqüência de rega para cada um dos cinco substratos foi definida a partir do cruzamento dos dados obtidos em relação à CPA, em gráficos de perda de massa dos vasos em porcentagem – perda de água – ao longo do tempo, e informações de cultivo para *Hadrolaelia perrini*: preferência por verões úmidos e luminosidade de média a alta (FROWINE, 2005). A partir dessas informações as freqüências de rega foram estabelecidas com o objetivo de manter os substratos com umidade entre 60% e 80% da CMRA.

Todo o experimento foi desenvolvido em casa de vegetação cujas bancadas receberam cobertura com sombrite para amenizar a incidência direta de luz solar.

3.5 Análise Química dos Substratos

Para a análise química dos substratos, amostras de 300 g foram submetidas à análise pelo Método Holandês 1:1,5, que faz parte do Sistema IAC de Análise de Solos. Esse método consiste em produzir uma pasta com uma porção de amostra para cada porção e meia de água deionizada e, nessa pasta, avaliar a concentração de nitrogênio (N) nas formas nítrica e amoniacal pelo método de Kjeldahl, fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) por ICP-OES (*inductively coupled plasma - optical emission spectroscopy*), sódio (Na) por condutividade elétrica (CE), boro (B), cloro na forma de cloreto (Cl^-) e pH.

3.6 Desenvolvimento de *Hadrolaelia perrinii* em Substrato

Montou-se um experimento cujo objetivo foi avaliar os valores de condutividade elétrica e de pH nos substratos e o desenvolvimento de *Hadrolaelia perrinii* em cada um deles. O desenvolvimento das plântulas foi avaliado pelas massas de matéria seca de raízes (MMSR) e de parte aérea (MMSPA). Foram utilizados apenas três dos cinco substratos – xaxim, coxim e cascas de *Pinus* – devido à disponibilidade desses materiais no momento da instalação do experimento.

Plântulas de *Hadrolaelia perrinii*, crescendo há dois anos em cultura *in vitro*, foram transplantadas de seus frascos de cultivo para vasos com capacidade para 100 mL contendo os três substratos utilizados. Foram implantadas dez repetições de cada substrato, totalizando 30 vasos. Em cinco vasos de cada substrato foram feitas coletas semanais de 150 mL de água de percolação, por um período de 135 dias. Na água coletada mediram-se os valores de pH e CE.

No início do experimento, mediram-se MMSR e MMSPA de uma amostra de sete plântulas retiradas dos frascos. No final do experimento, 135 dias depois, as mesmas variáveis foram avaliadas nas plântulas do experimento.

Com dados obtidos calculou-se a relação MMSR / MMSPA que tem implicação direta com o crescimento das plântulas.

Durante a experimentação foram utilizadas as freqüências de rega estabelecidas segundo o experimento previamente descrito no item 3.4. Foi utilizada água deionizada para a rega das plântulas.

3.7 Teste de Eficiência dos Isolados Fúngicos

Foi realizado um experimento em casa de vegetação com delineamento experimental fatorial 4x10 (4 substratos x 9 isolados e um controle sem inoculação), com cinco repetições de cada tratamento. Utilizaram-se os seguintes substratos: Coxim, Biomax, Casca de *Pinus* e Comercial. O xaxim foi excluído do experimento devido à proibição da sua comercialização.

Vasos de 100 mL foram preenchidos com os quatro substratos, que receberam, posteriormente, plântulas de *Hadrolaelia perrinii* e inóculo dos isolados fúngicos obtidos previamente.

Para a produção do inóculo, 500 g de sementes de trigo foram embebidos em água destilada por 24 horas, na proporção de 100 mL de sementes para 70 mL de água, e fervidas por 15 minutos após esse período. O excesso de água foi removido e 30 g de sementes foram autoclavados por uma hora, em dois dias consecutivos. Após o resfriamento dos frascos, porções de micélio dos isolados (item 3.2) em crescimento ativo em BDA foram depositadas em cada um deles, que foram mantidos a 28°C por 7 dias. Previamente, os isolados haviam sido mantidos em meio de cultura BDA a 28^{o}C por três dias. Realizou-se um controle como acima descrito, exceto pelo fato de que as sementes foram incubadas sem a presença de microrganismos.

Para a confirmação do crescimento dos isolados fúngicos sobre as sementes de trigo, retirou-se aleatoriamente uma semente de cada frasco com os diferentes isolados e do tratamento controle e transferiu-se para placas de Petri com BDA, todas mantidas a 28°C por três dias, após os quais observou-se o crescimento miceliano, para a confirmação da presença ou ausência do fungo nas sementes.

Para a inoculação, pequenas porções do substrato de cada um dos vasos foram retiradas e os espaços gerados foram preenchidos com 1 g do inóculo produzido nas

sementes de trigo. Em seguida, plântulas foram depositadas e o substrato retirado foi devolvido aos vasos de maneira a cobrir tanto os inóculos quanto as raízes das plântulas.

Durante o experimento foram realizadas avaliações de pH e CE de 120 vasos do número total – 200 vasos – além da obtenção da MMSR e MMSPA no início e após os 10 meses de experimentação, de maneira semelhante à descrita no item 3.6; as avaliações de pH e CE foram realizadas mensalmente por quatro meses.

3.8 Observação de Cortes das Raízes das Plantas

Para o início desta etapa do trabalho foi realizada uma breve observação anatômica das raízes de *Hadrolaelia perrinii*. As raízes caracterizavam-se por estruturas delicadas com coloração verde clara.

Oito meses depois da inoculação, três parcelas de cada tratamento foram coletadas ao acaso para observação microscópica das raízes das plantas segundo técnicas de coloração utilizadas em anatomia vegetal. O procedimento foi realizado no Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP sob orientação da Dra. Marília Castro.

As plantas amostradas foram retiradas de seus vasos de cultivo para observação da presença ou ausência de estruturas absorventes – pêlos radiculares. As raízes que apresentaram tais estruturas foram seccionadas – apenas uma raiz por planta – para a realização de cortes transversais; raízes que não apresentaram pêlos radiculares foram seccionadas segundo padronização adotada, que consistia em seccionar regiões das raízes com tortuosidade de crescimento e presença de velame.

Foram utilizadas lâminas de barbear para a realização dos cortes em material fresco, sem nenhum tipo de tratamento para a fixação.

Com o material seccionado foram montadas lâminas para observação em microscópio óptico com a utilização de dois tipos distintos de corantes – vermelho de rutênio e azul de toluidina. Cada um dos corantes tem afinidade por estruturas com composições químicas diferentes: vermelho de rutênio tem afinidade por estruturas que contêm polissacarídeos enquanto azul de toluidina, no pH em que foi utilizado, de 4,5, tem afinidade tanto por estruturas ácidas quanto básicas; isso proporciona um efeito visual chamado metacromasia, que consiste em colorações diferentes numa mesma lâmina de acordo com as composições químicas das estruturas observadas.

As lâminas foram observadas em microscópio Olympus BX 51, acoplado a uma câmera fotográfica analógica, a qual permitiu o registro fotográfico da morfologia dos cortes das raízes.

No material corado procurou-se observar modificações específicas que evidenciassem a interação entre fungos e orquídeas, sendo tais modificações, expressas pela presença de estruturas chamadas *pelotons*.

Em relação aos *pelotons* nas raízes das orquídeas observou-se sua aparência (intactos, digeridos e/ou interligados), sua localização dentro do campo de observação ao microscópio (em apenas um quadrante, em quadrantes opostos ou espalhados) e sua freqüência medida em número de *pelotons* (poucos, intermediário, muitos): poucos – de um a cinco *pelotons*; médios – entre seis e quinze *pelotons*; muitos – acima de quinze *pelotons*, no campo de observação ao microscópio.

De acordo com as observações realizadas no material foram elaboradas quatro tabelas adotando como valor para cada material o que tivesse acontecido em dois dos três materiais seccionados, ou seja, as observações realizadas em duas das três raízes seccionadas serviram como referência para o material em questão.

Outras estruturas, como hifas características e cloroplastos, foram observadas quanto à presença ou ausência nas células das raízes das orquídeas.

3.9 Variáveis Analisadas

Foi avaliada a capacidade máxima de retenção de água (CMRA) para os cinco substratos utilizados ao longo do experimento como descrito no item 3.3. Também para os cinco substratos foi avaliada a curva de perda de água (CPA) como descrito no item 3.4.

Condutividade elétrica (CE) e pH foram variáveis analisadas em relação aos substratos Xaxim, Coxim e Casca de *Pinus*, como descrito no item 3.6, utilizando regressão polinomial.

3.10 Análise Estatística

As variáveis referentes às massas de matéria seca de raiz, de parte aérea e total foram analisadas estatisticamente pelo teste unilateral de Dunnett com a utilização de transformação dos números originais em log x, para a comparação dos tratamentos de inoculação. Para a comparação de médias dos substratos, independentemente da inoculação, utilizou-se o teste de Tukey a 5 %. Apenas para a variável relação entre

MMSR/MMSPA não houve transformação dos números originais, mas a análise estatística aplicada foi a mesma (teste unilateral de Dunnett). Esse teste utiliza uma das variáveis como testemunha e compara sua média com as médias das demais variáveis ao nível determinado de significância de 5 %.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção de plântulas

Partiu-se de 80 frascos de cultivo, a partir de semeadura, contendo, cada um, 5 plântulas de *Hadrolaelia perrinii*. Do total, 230 plântulas foram selecionadas segundo padronização de altura e massa para utilização durante o experimento.

O valor médio obtido para a altura das plântulas foi de 4,48 cm, com variação de 2,7 a 6,6 cm e desvio padrão de 0,76 cm.

A massa das plântulas utilizadas foi, em média, 0,63 g, com variação de 0,27 g a 1,51 g e desvio padrão de 0,24 g.

4.2 Isolados Fúngicos Obtidos

Foram obtidos nove isolados das 39 amostras de raízes de orquídeas coletadas. Os isolados obtidos, com as numerações que receberam entre parêntesis, originaram-se das seguintes espécies: *Bulbophyllum purpureorachis* (F. O. 6), *Cattleya harrisoniana* (F. O. 7), *Cattleya intermedia* (F. O. 5), *Cattleya labiata* (F. O. 4), *Cattleya loddigesii* (F. O. 8), *Dendrobium aggregatum* (F. O. 2), *Hadrolaelia cinnabarina* (F. O. 9), *Hadrolaelia perrinii* (F. O. 3) e *Maxillaria subulata* (F. O. 1).

O número de isolados obtidos corresponde a 23 % do número de amostras coletadas, e esse baixo número pode ter relação com a presença de matéria orgânica nas raízes, motivo para o grande aparecimento de fungos endofíticos não rizoctonióides (NOGUEIRA et al., 2005). As 30 espécies restantes não forneceram fungos rizoctonióides devido à presença de estruturas não desejadas como esporos, o que inviabilizou sua utilização como inóculo.

4.3 Capacidade de Retenção de Água pelos Substratos

A tabela 1 mostra as massas obtidas das frações do substrato Comercial e o período a que foram submetidas em estufa para secagem. Para a seqüência do experimento, adotaram-se frações maiores que 2 mm, por se tratar de um material mais

maleável e por proporcionar economia na quantidade final de material a ser utilizado, pois as frações acima de 2 mm corresponderam a 60% do volume total do substrato.

Tabela 1. Massa da matéria seca das frações do substrato Comercial, submetidas a peneiramento em oito diferentes malhas.

Malha da peneira (mm)	Massa de matéria seca (g)				
	Inicial	**24 horas**	**48 horas**	**72 horas**	**96 horas**
9,52	327,44	320,47	320,05	320,05	320,05
7,93	443,56	434,69	434,41	434,41	434,41
6,35	128,12	124,50	124,27	124,27	124,27
4,00	86,25	84,99	85,27	84,78	84,78
2,00	197,63	196,63	196,63	196,63	196,63
0,71	82,83	81,63	81,50	81,48	81,48
0,25	79,53	78,35	78,30	78,30	78,30
0,074	54,24	54,08	53,62	53,62	53,62

Outro motivo para a exclusão das frações menores que 2 mm é que estas aumentam a retenção de água o que poderia gerar problemas em cultivo de orquídeas por diminuir a aeração do substrato com conseqüente morte de raízes (RODRIGUES, 2005).

Obteve-se, também, a capacidade máxima de retenção de água (CMRA) para todos os substratos, com valores mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Valores obtidos da CMRA para os cinco substratos.

Substratos	**CMRA (%)**
Biomax	72
Casca de *Pinus*	56
Comercial	43
Coxim	58
Xaxim	73

Como se vê, o Xaxim foi o substrato com maior capacidade máxima de retenção de água e o Comercial foi o que apresentou o menor valor dessa variável. O substrato Comercial retém cerca de 2/3 da água retida pelo Xaxim, o que tem implicações importantes no desenvolvimento de orquídeas e na forma de cultivá-las; um substrato adequado para o cultivo de orquídeas deve ter as seguintes características: economia hídrica, boa aeração, permeabilidade, poder de tamponamento para valores de pH e capacidade de retenção de nutrientes (KÄMPF, 2005).

4.4 Curva de Perda de Água pelos Substratos

As figuras a seguir, numeradas de 1 a 5, mostram a retenção de água, em porcentagem da CMRA, pelos cinco substratos utilizados mantidos em casa de vegetação, sendo que na tabela associada às figuras estão representados os valores obtidos diariamente.

Tabela 3. Porcentagem de água retida pelos cinco substratos em casa de vegetação.

Substratos	Dias							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Água retida (%)							
Biomax	100	87	65	60	55	52	48	36
Casca de *Pinus*	100	85	78	72	65	59	56	53
Comercial	100	79	68	60	55	52	49	48
Coxim	100	86	76	70	64	58	55	51
Xaxim	100	83	68	56	46	39	34	30

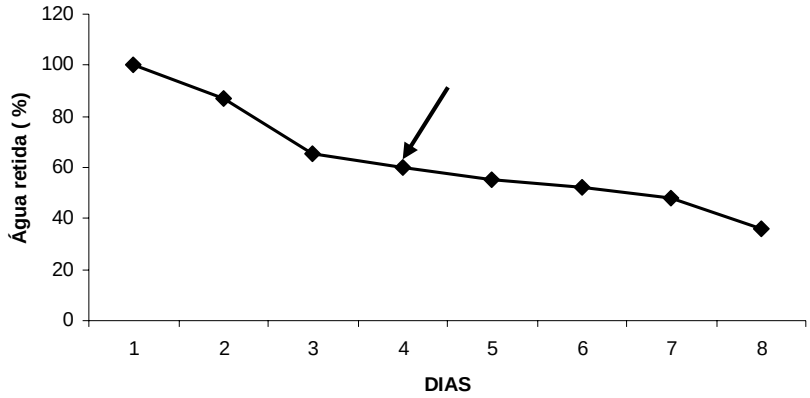


Figura 1 – Retenção diária de água, em porcentual da capacidade máxima de retenção, do substrato Biomax mantido em casa de vegetação. Média de cinco repetições. Seta mostra o ponto no qual o substrato atingiu 60% da CMRA.

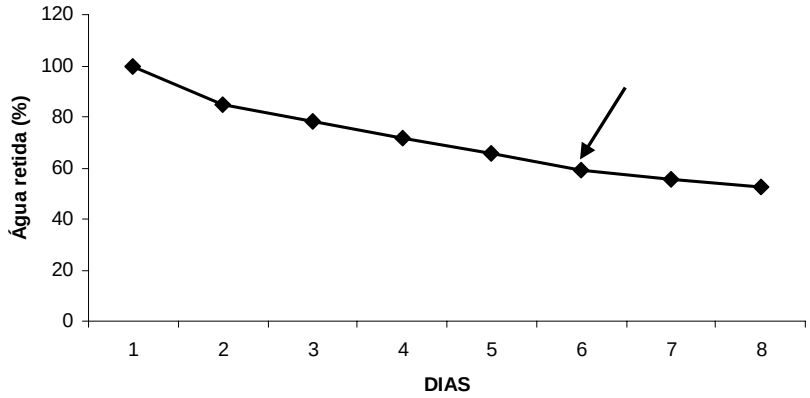


Figura 2 – Retenção diária de água, em porcentual da capacidade máxima de retenção, do substrato Casca de *Pinus* mantido em casa de vegetação. Média de cinco repetições. Seta mostra o poonto no qual o substrato atingiu 60% da CMRA.

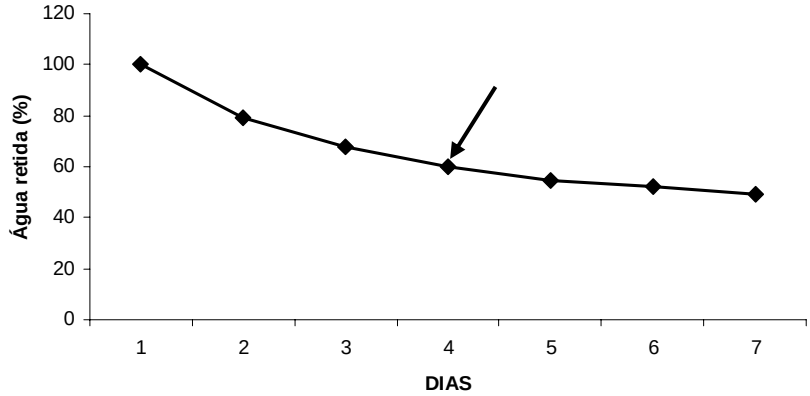


Figura 3 – Retenção diária de água, em porcentual da capacidade máxima de retenção, do substrato Comercial mantido em casa de vegetação. Média de cinco repetições. Seta mostra o ponto no qual o substrato atingiu 60% da CMRA.

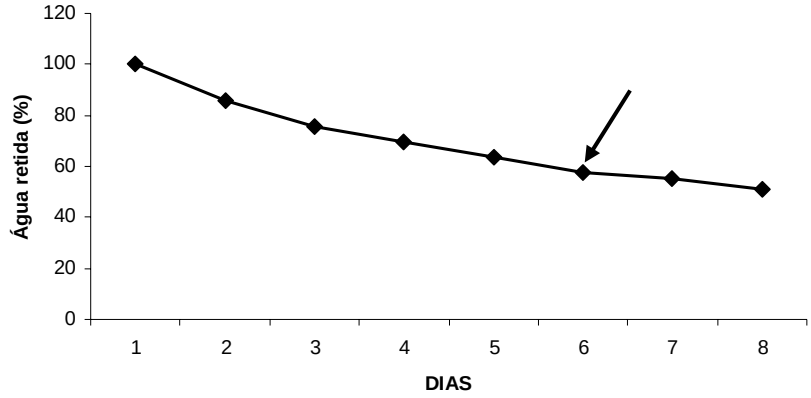


Figura 4 – Retenção diária de água, em porcentual da capacidade máxima de retenção, do substrato Coxim mantido em casa de vegetação. Média de cinco repetições. Seta mostra o ponto no qual o substrato atingiu 60% da CMRA.

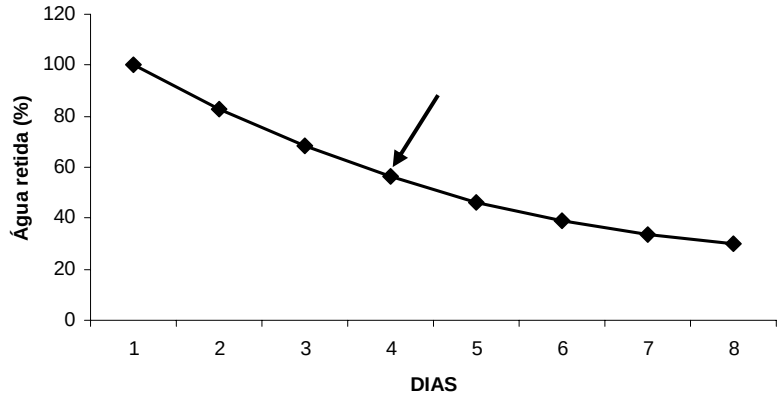


Figura 5– Retenção diária de água, em porcentual da capacidade máxima de retenção, do substrato Xaxim mantido em casa de vegetação. Média de cinco repetições. Seta mostra o ponto no qual o substrato atingiu 60% da CMRA.

O substrato Xaxim foi o que perdeu água mais rapidamente, chegando ao valor mínimo adotado para o experimento – 60% da CMRA – entre o terceiro e o quarto dias.

Esse substrato foi seguido pelo Biomax e Comercial, no quarto dia, e, por fim, Coxim e Casca de *Pinus*, entre o quinto e sexto dias.

Os resultados aqui obtidos para os substratos Xaxim e Casca de *Pinus* são diferentes dos relatados por MACHADO NETO et al. (2005), que mostraram o Xaxim como o que perdeu água mais lentamente e Casca de *Pinus* como o que perdeu de forma mais rápida, atingindo 40% da CMRA no quinto e no décimo primeiro dias, respectivamente; o oposto do que foi observado neste trabalho. Para MORAES et al. (2002), o Xaxim é tido como ótimo substrato para o cultivo de orquídeas justamente devido à sua capacidade de retenção prolongada de água, novamente diferente do que foi obtido aqui.

Não é simples explicar as diferenças na retenção e, por conseguinte, na perda de água dos diferentes substratos. É certo que, de maneira geral, essas diferenças devem ser resultado da composição granulométrica e do material utilizado para a formação dos substratos (MACHADO NETO et al., 2005). Com relação aos solos, sabe-se que a água é retida preferencialmente nos microporos e que a retida nos macroporos é mais facilmente perdida por percolação e evaporação ou absorvida pelas plantas. Microporos são definidos como poros capilares que atuam na armazenagem da água e macroporos, como os que têm como função principal a aeração do solo, atuando também na condução da água no solo (LIBARDI, 2005).

O substrato Coxim, juntamente com o substrato Casca de *Pinus*, foi o que se manteve úmido pelo maior período. Coxim é composto por fibra de coco, exatamente como Biomax, mas apresenta-se na forma de cubos, o que pode ter sido o responsável pela maior retenção de água; embora substratos formados por grânulos maiores permitam livre drenagem da água irrigada, podem ser responsáveis por uma retenção maior de água em seu interior, liberando-a gradativamente ao ambiente.

Embora todos os substratos tenham passado por peneiramento em malha de 2 mm, os resultados obtidos têm relação direta com a granulação e composição de cada um dos substratos, exatamente como argumentado por MACHADO NETO et al. (2005).

4.5 Propriedades Químicas dos Substratos

Os substratos foram submetidos a análise química de rotina, cujos resultados estão mostrados na tabela 4, a seguir.

Tabela 4. Características químicas dos substratos.

Variáveis	Substratos				
	Xaxim	**Coxim**	**Casca de *Pinus***	**Comercial**	**Biomax**
pH	4,7	5,2	4,9	6,8	6,7
CE (dS/m)	0,1	1,6	0,1	0,3	0,2
			mg L^{-1}		
N – nitrato	4,8	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Fósforo (P)	0,9	17,1	1,3	0,8	0,2
Cloreto (Cl^-)	0,7	562,3	18,1	17,4	2,1
Enxofre (S)	1,2	3,2	2,1	13	3,2
N – amônia	2,6	7,6	0,8	1,3	1,5
Potássio (K)	13,8	312,9	15,6	37,1	11,9
Sódio (Na)	7,5	138	3,3	7,9	5,5
Cálcio (Ca)	1	1,7	1,6	18,3	23,8
Magnésio (Mg)	0,2	2	0,5	8,3	3,4
Boro (B)	0,01	0,1	0,02	0,02	0,02
Cobre (Cu)	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01
Ferro (Fe)	0,1	0,1	0,4	0,6	0,2
Manganês (Mn)	0,02	0,02	0,1	0,3	0,3
Zinco (Zn)	0,02	0,1	0,1	0,8	1,9

Os valores obtidos para pH mostraram-se bastante diversos. Valores abaixo de 5, como os obtidos para Xaxim e Casca de *Pinus*, podem representar problemas na disponibilidade de nutrientes às plantas em geral e resultar em sintomas de deficiência de nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio e boro (KÄMPF, 2005). Todavia, para KÄMPF (2005), deficiências de fósforo e micronutrientes, principalmente ferro, manganês, zinco e cobre, são esperados em substratos que possuem pH acima de 6,5, como o que ocorreu com Biomax e Comercial. Porém, valores mais baixos de pH em xaxim já foram relatados por vários autores (SOUZA & JASMIN, 2004; ASSIS et al., 2005; MACHADO NETO et al., 2005).

Quanto aos elementos analisados, o substrato Coxim mostrou valores altos de cloreto e potássio, que têm influência sobre a condutividade elétrica e podem explicar a CE obtida, de 1,6 dS/m. Outro valor encontrado no mesmo substrato que superou marcadamente os dos outros substratos foi o sódio; outro importante componente a influenciar a salinidade do meio.

No entanto, utilizando-se o umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) como base de comparação devido às suas características de tolerância a estresses hídricos e à salinidade – típica de plantas cujo metabolismo é do tipo CAM, como algumas orquídeas – os valores obtidos para CE dos substratos aqui avaliados foram muito

baixos. Já se observou menor crescimento das plantas de umbuzeiro em comparação com o tratamento sem adição de NaCl, mas sintomas visuais de toxicidade só foram observados em soluções cuja CE encontrava-se muito alta (60 mmol/L) (NEVES et al., 2004).

Há muita variabilidade nos resultados dos parâmetros analisados nos substratos entre diferentes avaliações e essa variabilidade pode ser observada nos resultados de dois trabalhos distintos: enquanto MACHADO NETO et al. (2005) encontraram valores de pH em casca de *Pinus* de 5,8, MARTIN et al. (2006) encontraram valores de pH para o mesmo substrato da ordem de 3,7.

A recomendação de valores específicos de pH varia grandemente com as espécies de orquídeas, tornando difícil a recomendação geral de um substrato. Como exemplo, pode-se citar KÄMPF (2005), que determina como ideais as faixas de pH entre 5 e 5,5 para o cultivo de *Cattleya* e entre 5,5 e 7 para o cultivo de *Dendrobium*.

Em comparação à recomendação para a cultura hidropônica de alface, por exemplo, a concentração de nutrientes minerais apresentada nos substratos foi muito baixa, exceção feita aos teores de potássio para o substrato Coxim, que se aproximou do valor referência (320mg L^{-1}) (VITAL et al., 2002). Os valores mostrados por VITAL et al. (2002) são de 240 de N; 36 de P; 320 de K; 80 de Ca; 50 de Mg; 126 de S; 0,6 de B; 0,08 de Cu e Mo; 5 de Fe; 2,4 de Mn e 0,8 de Zn, todos medidos em mg/L de solução nutritiva. A comparação com a cultura de alface foi utilizada pela falta de estudos relacionados à recomendações em orquídeas; não foi encontrado nenhum relato na literatura.

As concentrações de nutrientes minerais observadas em substratos foram muito variáveis, pois estão relacionados com a origem do material, com seu estado nutricional no momento da sua extração, com a idade da planta e condições ambientais (SOUZA & JASMIN, 2004).

Assim, de maneira geral, a análise química revelou que os substratos não foram fontes adequadas de nutrientes para as plantas neles cultivadas.

4.6 Desenvolvimento de *Hadrolaelia perrinii* em diferentes Substratos

Os valores de MMSR e MMSPA ao início do experimento foram calculados com sete plântulas retiradas diretamente de seus frascos de cultivo e os dados estão na tabela 5.

Tabela 5. Massa da matéria seca de raízes, parte aérea, total e relação entre a massa de raízes e parte aérea, avaliadas no início do experimento. Média de sete repetições.

	Massa de matéria seca (mg)			
	Raiz	**P.aérea**	**Raiz/P.aérea**	**Total**
Médias	27,5	23,4	1,2	50,9
Desvio Padrão	4,48	6,39	0,20	10,16

Os valores de MMSR, MMSPA, relação entre MMSR/MMSPA e massa de matéria seca total (MMST) das plântulas estão na tabela 6.

Tabela 6. Massa da matéria seca de orquídeas cultivadas em casa de vegetação durante 135 dias, em três substratos. Médias de dez repetições.

	Matéria seca (mg)			
Substratos	**Raízes**	**Parte aérea**	**Total**	**Raízes/Parte aérea**
Casca de *Pinus*	58,80a	90,00a	148,80a	0,81b
Xaxim	48,70a	76,00a	124,70a	0,84b
Coxim	47,10a	38,10a	85,20a	1,41a
coeficiente de variação	38,02%	74,86%	12,13%	46,26%

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey (5 %).

Não houve diferenças nas médias obtidas entre MMSR, MMSPA e MMST entre os quatro substratos estudados, embora para MMSPA tenha havido valores tão discrepantes, não foi verificada diferença estatística pelo programa utilizado. Já para a relação entre MMSR/MMSPA o substrato Coxim apresentou a maior média, diferindo estatisticamente dos outros dois substratos.

A relação MMSR/MMSPA mostra a assimilação de matéria nas raízes e na parte aérea das plantas, relacionando-as. É uma relação que permite a observação de como a planta se desenvolveu, e se esse desenvolvimento foi proporcional. Para o substrato Coxim houve maior desenvolvimento de raízes em relação à parte aérea, o inverso foi verificado para os demais substratos. Para CORREIA & NOGUEIRA (2004), o aumento dessa relação é resultado de estresse hídrico. Ainda que neste trabalho não seja possível distinguir o fator que influenciou esse resultado, pode-se concluir, tomando como base apenas a possibilidade de um estresse, que o Coxim foi menos adequado às plantas do que os outros dois substratos, uma vez que, neles, durante o desenvolvimento das plântulas, a relação raiz/parte aérea diminuiu em comparação com os valores iniciais.

As figuras 6 e 7, a seguir, mostram os valores médios obtidos para pH e CE em cada um dos substratos utilizados nesta etapa do experimento.

Houve uma variação muito grande nos valores de pH obtidos sendo os menores valores observados para o substrato Xaxim, na primeira e última coletas, confirmando a tendência de valores de pH mais baixos relacionados a esse material (SOUZA & JASMIN, 2004; ASSIS et al., 2005; MACHADO NETO et al., 2005; YAMAKAMI et al., 2006).

De maneira geral, os valores de pH diminuíram para os três substratos comparados. No entanto, pelos valores de R^2, nota-se que o tempo foi o maior responsável pela diminuição desses valores apenas para o Xaxim. Para os outros dois substratos, fatores não especificados podem ter sido responsáveis pelas alterações. Ainda que a equação de segundo grau resultante tenha um ponto de máximo, não é possível afirmar que a diminuição dos valores de pH continue, pois não houve uma observação continuada.

Em relação aos valores obtidos para CE, estes também decresceram com o tempo, ainda que, no intervalo avaliado, os resultados tenham sido explicados por uma equação de segundo grau. A diferença em relação aos valores de pH é que os coeficientes R^2 foram mais altos, indicando que o tempo, representado pelas várias coletas, foi o principal fator a influenciar o decréscimo da salinidade. Ainda como para o pH, não é possível afirmar que esses valores continuariam a se elevar com o aumento no número de coletas.

É necessário lembrar que as plântulas estavam em fase de aclimatização, a qual é definida pela adaptação climática de uma planta envolvendo a transferência do indivíduo de seu ambiente inicial para outro por um processo artificial, representando uma fase delicada para a planta, devido a possíveis estresses hídricos, fotossintéticos, nutricionais e fitossanitários (MORAES et al., 2002). Por causa dessa adaptação as plântulas teriam absorvido maior quantidade de nutrientes no início dessa fase, diminuindo sua concentração na água de percolação. Após breve período de adaptação à nova situação, o cultivo em substrato, as plântulas absorveram os sais dissolvidos mais uniformemente.

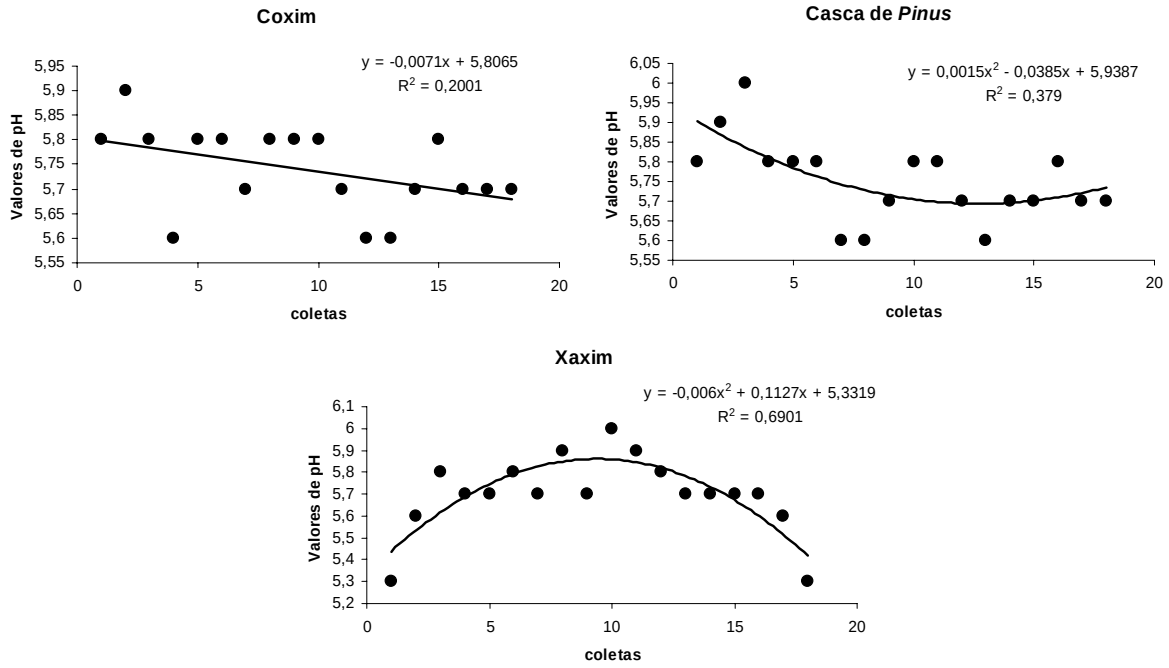


Figura 6 – Valores de pH dos substratos Coxim, Casca de *Pinus* e Xaxim, avaliados semanalmente, em que foram mantidas orquídeas durante 18 semanas. Médias de cinco repetições.

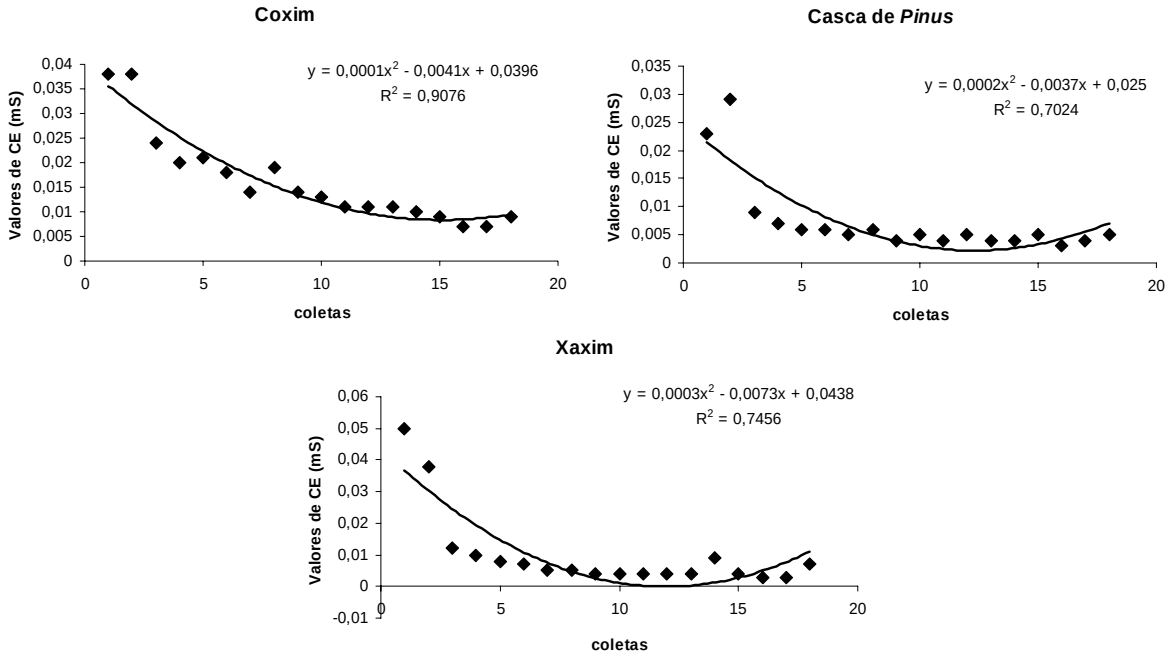


Figura 7 – Valores de condutividade elétrica dos substratos Coxim, Casca de *Pinus* e Xaxim, avaliados semanalmente, em que foram mantidas orquídeas durante 18 semanas. Médias de cinco repetições.

4.7 Eficiência dos Isolados Fúngicos

Para a verificação da eficiência dos isolados fúngicos foram realizadas medidas da MMSR, MMSPA, MMST e calculou-se a relação entre MMSR/MMSPA das plântulas inoculadas no início do experimento (tabela 7).

Tabela 7. Massa de matéria seca para dez plântulas; início do experimento.

	Massa de matéria seca (mg)			
	Raiz	**P.aérea**	**Total**	**Raiz/P.aérea**
Médias	18,5	18,1	36,6	1
Desvio Padrão	5,80	2,70	6,26	0,37

É importante destacar o fato de o valor médio obtido para a relação entre MMSR e MMSPA ter sido 1. Esse valor indica que as plântulas inicialmente utilizadas tinham um crescimento equilibrado entre raízes e parte aérea, permitindo que se avaliassem os reais efeitos sobre essas estruturas após a inoculação fúngica.

Os resultados do efeito da inoculação com isolados fúngicos estão mostrados nas tabelas 8, 9, 10 e 11.

Tabela 8. Massa de matéria seca de raízes (g) de *Hadrolaelia perrinii* em função da inoculação de nove isolados fúngicos, cultivadas em quatro substratos em casa de vegetação, durante dez meses. Médias de cinco repetições.

Tratamentos de inoculação	**Substratos**				**Médias (inoculação)**
	Comercial	**Coxim**	**Biomax**	**Casca de *Pinus***	
Testemunha	59,49	57,20	44,03	64,79	56,38
F. O. 1	47,74	58,20	32,95	25,43	41,08
F. O. 2	48,11	37,27	22,52	20,89	32,20*
F. O. 3	65,70	53,69	40,39	32,36	40,04
F. O. 4	81,71	70,77	47,88	65,33	66,42
F. O. 5	38,19	49,32	34,79	39,92	40,56
F. O. 6	50,80	43,75	32,80	58,15	46,38
F. O. 7	36,89	37,13	25,19	48,42	36,91*
F. O. 8	56,34	53,08	18,88	50,70	44,75
F. O. 9	47,71	53,22	29,48	46,74	44,29
Médias (substratos)	53,27a[1]	51,36a	32,89b	45,27a	
					Coeficiente de variação = 18,48%

* Tratamentos que diferem da testemunha ao nível de 5 % pelo teste unilateral de Dunnett.
[1]Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5 %).

Tabela 9. Massa de matéria seca da parte aérea (g) de *Hadrolaelia perrinii* em função da inoculação de nove isolados fúngicos, cultivadas em quatro substratos em casa de vegetação, durante dez meses. Médias de cinco repetições.

Tratamentos de inoculação	Substrato				Médias (inoculação)
	Comercial	Coxim	Biomax	Casca de *Pinus*	
Testemunha	59,91	24,59	37,39	47,71	42,40
F. O. 1	53,04	35,84	33,06	36,10	39,51
F. O. 2	57,09	21,57	21,26	24,91	31,21*
F. O. 3	70,72	23,87	29,41	32,88	39,22
F. O. 4	77,19	41,85	36,28	57,89	53,30
F. O. 5	47,22	33,69	26,86	36,85	36,16
F. O. 6	61,59	35,14	30,37	55,99	45,77
F. O. 7	45,83	26,28	24,13	40,40	34,16
F. O. 8	67,27	24,17	17,95	43,04	38,11
F. O. 9	73,84	35,45	22,66	48,69	45,16
Médias (substratos)	61,37a	30,25c	27,94c	42,45b	
					Coeficiente de variação = 12,30*

* Tratamentos que diferem da testemunha ao nível de 5 % pelo teste unilateral de Dunnett.
[1]Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5 %).

O crescimento da raiz foi significativamente menor no Biomax e não houve diferença estatística entre os outros substratos. Isso pode ser explicado pelo fato de Biomax ter sido o substrato com a maior porcentagem de retenção de água (72%) e orquídeas, em especial as epífitas, terem seu desenvolvimento prejudicado em substratos com alto grau de umidade. Além disso, situações de estresse hídrico podem estimular o crescimento de raízes, com o objetivo de tais estruturas terem maior possibilidade de encontrar a água; o substrato Comercial foi o que teve a menor retenção de água e o que obteve a média mais alta de massa seca de raízes.

Quanto à inoculação com os fungos, observou-se diferença entre as plântulas que receberam inoculação com os fungos F. O. 2 e F. O. 7. A inoculação com esses dois isolados fúngicos resultou em menor produção de matéria seca de raízes do que o observado na testemunha sem inoculação. Igual ao observado para as raízes, o crescimento da parte aérea foi afetado pela inoculação do isolado F.O. 2, diminuindo em relação à testemunha.

Em relação à MMSPA o substrato Comercial foi o que obteve o melhor desempenho, sendo estatisticamente diferente de todos os demais substratos; apenas Coxim e Biomax não diferiram entre si. Sendo assim, os resultados obtidos mostraram

que os substratos tiveram influência no ganho de matéria seca de parte aérea pelas plantas.

Tabela 10. Massa de matéria seca total (g) de *Hadrolaelia perrinii* em função da inoculação de nove isolados fúngicos, cultivadas em quatro substratos em casa de vegetação, durante dez meses. Médias de cinco repetições.

Tratamentos de inoculação	**Substratos**				**Médias (inoculação)**
	Comercial	**Coxim**	**Biomax**	**Casca de *Pinus***	
Testemunha	117,67	83,09	82,32	113,05	99,03
F. O. 1	103,25	94,64	66,82	61,87	81,65
F. O. 2	113,28	59,15	44,17	48,04	66,16*
F. O. 3	137,69	78,69	70,62	65,70	88,18
F. O. 4	159,39	113,16	84,24	49,48	101,57
F. O. 5	86,17	84,43	63,15	76,92	77,67
F. O. 6	113,75	84,66	64,78	114,58	94,44
F. O. 7	84,81	64,13	51,16	88,93	72,26
F. O. 8	126,19	77,32	36,90	93,90	83,58
F. O. 9	122,32	89,18	52,77	95,67	89,99
Médias (substratos)	116,45a[1]	82,85b	61,69c	80,81bc	
					Coeficiente de variação = 12,13%

* Tratamentos que diferem da testemunha ao nível de 5 % pelo teste unilateral de Dunnett.
[1]Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5 %).

Em relação às médias obtidas para MMST, o substrato Comercial foi o que resultou no maior valor, diferindo estatisticamente de todos os demais. Isso pode ser conseqüência do fato de o substrato Comercial ter a menor porcentagem de retenção de água (43%) de todos os utilizados e isso é algo desejável em cultivo de orquídeas, principalmente epífitas, cujas raízes absorvem grande parte da sua umidade de precipitações pluviais e orvalho noturno (ASSIS et al., 2005). Sua constituição, com concentrações mais altas de enxofre, magnésio e ferro, também deve ter contribuído. Nos tratamentos de inoculação foi observado prejuízo ocasionado por F. O. 2; resultado como esse já havia sido observado para as variáveis MMSR e MMSPA.

Tabela 11. Relação entre as massas da matéria seca da raiz e da parte aérea de plantas de *Hadrolaelia perrinii* que receberam inoculação de nove isolados fúngicos, cultivadas em quatro substratos em casa de vegetação, durante dez meses. Médias de cinco repetições.

Tratamentos de inoculação	Substrato				Médias (inoculação)
	Comercial	Coxim	Biomax	Casca de *Pinus*	
Testemunha	1,02	2,50	1,03	1,39	1,49
F. O. 1	0,98	1,67	1,05	0,72	1,11
F. O. 2	0,96	1,77	1,10	1,00	1,21
F. O. 3	0,96	2,40	1,44	1,01	1,45
F. O. 4	1,07	1,72	1,93	1,17	1,47
F. O. 5	0,84	1,58	1,46	1,09	1,24
F. O. 6	0,86	1,34	1,19	1,06	1,11
F. O. 7	0,87	1,48	1,18	1,21	1,19
F. O. 8	0,91	2,21	1,06	1,19	1,34
F. O. 9	0,67	1,54	1,37	0,97	1,14
Médias (substratos)	0,91c[1]	1,82a	1,28b	1,08bc	
					Coeficiente de variação = 40,35%

* Tratamentos que diferem da testemunha ao nível de 5 % pelo teste unilateral de Dunnett.
[1]Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5 %).

Para a relação entre MMSR/MMSPA, as plantas cultivadas no substrato Comercial apresentaram a menor média, situação diferente da que ocorreu para MMSR, MMSPA e MMST; não diferiu estatisticamente apenas da Casca de *Pinus*. As médias obtidas pelos substratos Comercial e Casca de *Pinus* não representam prejuízo ao desenvolvimento das plântulas, mas sim um equilíbrio entre o ganho de matéria seca pelas raízes e pela parte aérea.

Considera-se que o aumento do sistema radicular em relação à parte aérea é vantajoso em certas condições, como, por exemplo, estresse hídrico (CORREIA & NOGUEIRA, 2004). Entretanto, esse fator não influenciou o aumento da massa de raízes em relação à parte aérea: neste experimento, observou-se que o Coxim, que mostrou a maior relação MMSR/MMSPA, teve um desempenho intermediário em relação à capacidade máxima de retenção de água – de 58 % em massa – e não perdeu água muito rapidamente, tendo levado entre 5 e 6 dias para chegar a cerca de 60 % de sua CMRA, enquanto que o Xaxim, por exemplo, levou entre 3 e 4 dias.

Os fungos inoculados não tiveram nenhuma influência sobre a relação MMSR/MMSPA.

No geral, o substrato Comercial forneceu os melhores resultados. A presença de maiores teores de enxofre, magnésio e ferro, importantes componentes no metabolismo vegetal, pode ter sido responsável pelo seu melhor desempenho. Além disso, sua capacidade de retenção de água foi marcadamente menor que a obtida para os outros substratos o que influencia positivamente o desenvolvimento de orquídeas, principalmente epífitas.

A inoculação dos isolados fúngicos F. O. 2 e F. O. 7 influenciaram negativamente os parâmetros de crescimento analisados e nenhum relato de prejuízo causado por fungos, que não fossem patogênicos, foi encontrado na literatura.

Os valores de pH e condutividade elétrica (CE) obtidos durante o experimento (figura 8) mostram uma variação mais uniforme do pH em relação à CE. Os valores foram decrescendo de 6 até por volta de 5,4 mostrando uma alteração possivelmente causada pela atividade fúngica nos substratos e, dessa forma, poderiam modificar características químicas do ambiente onde se encontram através de seus produtos, principalmente a excreção de ácidos orgânicos (SMITH & SMITH, 1990).

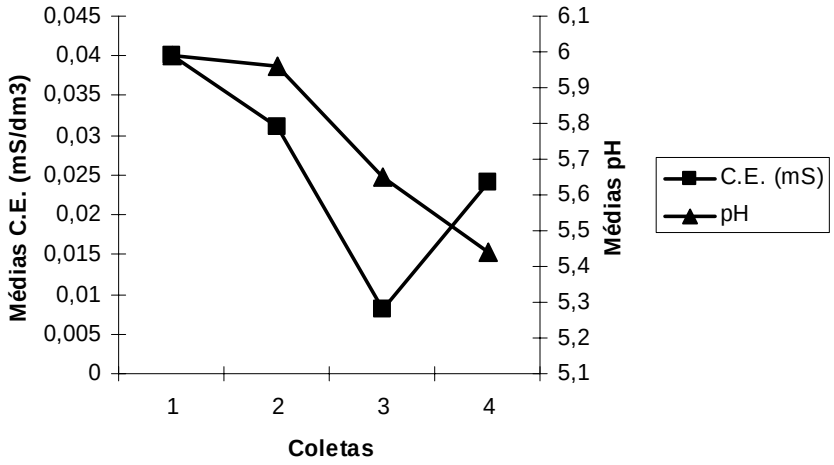


Figura 8 – Valores obtidos para pH e CE na água de percolação de quatro substratos. Coletas mensais.

Já para a variável CE, ocorreu uma queda muito acentuada da segunda para a terceira coletas, e um novo aumento após esse período. A queda no nível de sais dissolvidos pode ser explicada pelo uso desses compostos nos metabolismos vegetal e microbiano.

Já o aumento observado após esse período, pode ser devido ao acúmulo de sais no velame, o que levaria a uma menor absorção dos sais pelas plantas com conseqüente aumento nos teores desses compostos na água de percolação.

Os valores obtidos anteriormente para CE – item 4.6 – mostraram uma queda nos teores até a décima quinta coleta semanal (pouco menos de quatro meses), o que está de acordo com o observado até a terceira coleta mensal nesta etapa do experimento.

4.8 Observação de Cortes das Raízes das Plantas

Em todos os tratamentos com inoculação foram encontradas estruturas características da associação fungo-orquídea, conforme se pode observar na figura 9.

Foram encontrados *pelotons* em todas as suas formas – intactos (Figura 9C), digeridos (Figura 9D) e interligados (Figura 9E) – ilustrando, dessa forma, todos os estádios de seu desenvolvimento. Nas células das raízes colonizadas pelos fungos também foram encontrados cloroplastos (preenchidos por amido) e estruturas absorventes (pêlos radiculares). A confirmação da presença de amido foi realizada mediante teste com reagente de lugol e as estruturas estão mostradas na figura 9 (F, G e H). A presença de amido pode representar uma reserva de material potencialmente utilizável pela planta.

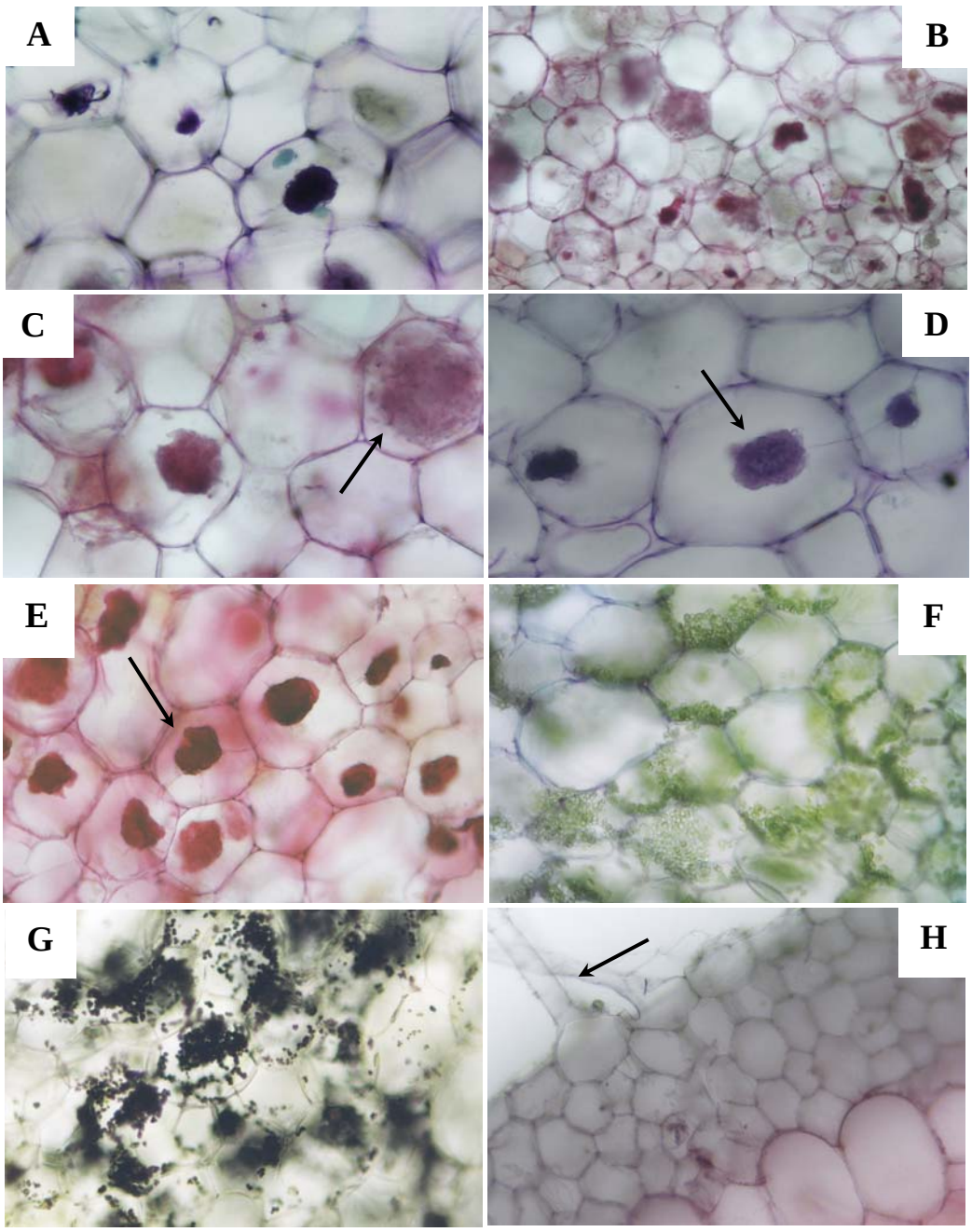


Figura 9 – Secção Transversal das raízes de *Hadrolaelia perrinii*: **A** – Contaminação do tratamento testemunha do substrato Coxim: poucos pelotons digeridos, encontrados apenas em um quadrante (aumento 10x1,6 – corante Azul de Toluidina); **B** – *Pelotons* intactos, digeridos e interligados no tratamento testemunha do substrato Comercial (aumento de 10x1,6 – corante Vermelho de Rutênio); **C** – *Pelotons* intactos no tratamento F. O. 1 do substrato Comercial (aumento de 20x1,6 – corante Vermelho de Rutênio); **D** – *Pelotons* digeridos no tratamento F. O. 3 do substrato Biomax (aumento de 20x1,6 – corante Azul de Toluidina); **E** – *Pelotons* interligados no tratamento F. O. 7 do substrato Coxim (aumento de 10x1,6 – corante Vermelho de Rutênio); **F** – Presença de amido nos cloroplastos (aumento de 10x1,6 – corante Azul de Toluidina); **G** – Confirmação da presença de amido (aumento de 10x1,6 – reagente de lugol); **H** - Estruturas absorventes – pêlos radiculares (aumento de 10x1,6 – corante Vermelho de Rutênio); estruturas destacadas pelas setas.

O levantamento realizado nas raízes de três orquídeas de cada um dos dez tratamentos de inoculação serviu como base para a elaboração das tabelas, 12, 13, 14 e 15, correspondentes a cada um dos substratos.

Tabela 12. Aparência (Int., Dig., Inter.), localização (Quad., Quad.Op., Esp.) e freqüência (+, ++, +++) de *pelotons* em raízes de orquídeas no substrato Coxim.

Tratamentos de inoculação	*Pelotons*					
	Int.	**Dig.**	**Inter.**	**Quad.**	**Quad.Op.**	**Esp.**
Coxim T	+	-	-	-	-	+
Coxim F. O. 1	+	-	-	-	-	+
Coxim F. O. 2	-	-	-	-	-	-
Coxim F. O. 3	+ + +	+ + +	+ + +	-	-	+
Coxim F. O. 4	+ + +	-	+ + +	+	-	-
Coxim F. O. 5	+	-	-	+	-	-
Coxim F. O. 6	+	-	-	-	+	-
Coxim F. O. 7	+	-	-	-	-	+
Coxim F. O. 8	+	+	-	-	-	+
Coxim F. O. 9	+	-	-	-	-	+

Pelotons quanto à aparência: **Int.** = intactos; **Dig.** = digeridos; **Inter.** = interligados. *Pelotons* quanto à localização dentro da célula: **Quad.** = em apenas um quadrante; **Quad. Op.** = em quadrantes opostos; **Esp.** = espalhados. *Pelotons* quanto à freqüência: **+** = de 1 a 5; **+ +** = de 6 a 15; **+ + +** = mais de 15. *Para **Int., Dig.** e **Inter., Quad., Quad. Op.** e **Esp.:** +, presença; -, ausência. T = testemunha. Aumento utilizado para registro de freqüência dos *pelotons* – 10x1,6.

No substrato Coxim houve contaminação do tratamento testemunha por fungos, verificada pela presença de *pelotons*. Mesmo sendo conduzido em casa de vegetação – o que possibilita maior controle de agentes externos – o experimento não se encontra livre de pequenos artrópodes, como aranhas; foi observada a presença de teias interligando vasos, uma provável causa de contaminação.

Nas parcelas que receberam o inóculo de F. O. 2, não se observaram *pelotons*. A inoculação desse fungo, de maneira geral, independentemente do substrato, resultou em diminuição do crescimento das plantas, e isso pode ter relação direta com a ausência de tais estruturas, importante interface para a troca de nutrientes entre fungos e orquídeas.

Outro fato a ser destacado é que em experimentações com substratos, especialmente aqueles que tratam da fase de aclimatização, há a possibilidade de morte das plântulas transplantadas em virtude do estresse a que elas passam a ser submetidas (MORAES et al., 2002). No caso do substrato Coxim, houve a morte de plântulas, mas esta foi verificada em apenas uma parcela do tratamento F. O. 5; as outras duas parcelas desse tratamento encontravam-se em perfeito estado.

Tabela 13. Aparência (Int., Dig., Inter.), localização (Quad., Quad.Op., Esp.) e freqüência (+, ++, +++) de pelotons em raízes de orquídeas no substrato Comercial.

Tratamentos de inoculação	*Pelotons*					
	Int.	**Dig.**	**Inter.**	**Quad.**	**Quad.Op.**	**Esp.**
Comercial T	+	+	+	+	-	-
Comercial F. O. 1	+	-	-	-	+	-
Comercial F. O. 2	+	-	-	+	-	-
Comercial F. O. 3	-	+ +	+	+	-	-
Comercial F. O. 4	+	-	-	-	-	+
Comercial F. O. 5	-	+ +	+	+	-	-
Comercial F. O. 6	-	+ + +	+	-	-	+
Comercial F. O. 7	-	+ +	+	-	-	+
Comercial F. O. 8	+ + +	+ + +	+	-	+	-
Comercial F. O. 9	+ +	-	-	+	-	-

Pelotons quanto à aparência: **Int.** = intactos; **Dig.** = digeridos; **Inter.** = interligados. *Pelotons* quanto à localização dentro da célula: **Quad.** = em apenas um quadrante; **Quad. Op.** = em quadrantes opostos; **Esp.** = espalhados. *Pelotons* quanto à freqüência: **+** = de 1 a 5; **+ +** = de 6 a 15; **+ + +** = mais de 15. *Para **Int., Dig.** e **Inter., Quad., Quad. Op.** e **Esp.:** +, presença; -, ausência. T = testemunha. Aumento utilizado para registro de freqüência dos *pelotons* – 10x1,6.

A contaminação da testemunha foi mais intensa no substrato Comercial, ocorrendo nos três materiais (vasos) seccionados. Na tabela 12 nota-se que ocorreu com maior intensidade nos três materiais seccionados – *pelotons* encontrados num só quadrante, em todas as suas formas, intactos, digeridos e interligados, e em pequena quantidade, mas também foram encontradas regiões do campo de visão ao microscópio, em todo o material, em que puderam ser observados *pelotons* intactos, digeridos ou interligados de forma isolada.

A contaminação observada pode ser resultado da composição mais diversificada do substrato: enquanto os outros são formados por apenas um material, resíduos de coco ou casca de *Pinus*, ambos uniformes, o substrato denominado Comercial é uma mistura de vários materiais, a maioria deles não definidos. Embora fungos rizoctonióides não possuam esporos que possam justificar uma contaminação maciça, a presença de poucos propágulos poderia ser a causa da contaminação. Além disso, depois de dez meses na casa de vegetação, é inevitável que essa contaminação ocorra, pela presença de pequenos insetos ou aracnídeos.

Há que se relatar a presença de duas parcelas com plantas mortas, referentes aos tratamentos F. O. 7 e F. O. 9.

Tabela 14. Aparência (Int., Dig., Inter.), localização (Quad., Quad.Op., Esp.) e freqüência (+, ++, +++) de pelotons em raízes de orquídeas no substrato Casca de *Pinus*.

Tratamentos de inoculação	*Pelotons*					
	Int.	**Dig.**	**Inter.**	**Quad.**	**Quad.Op.**	**Esp.**
Casca de *Pinus* T	-	-	-	-	-	-
Casca de *Pinus* F. O. 1	-	-	-	-	-	-
Casca de *Pinus* F. O. 2	+ +	-	-	+	-	-
Casca de *Pinus* F. O. 3	+ +	-	-	-	+	-
Casca de *Pinus* F. O. 4	+	-	-	-	+	-
Casca de *Pinus* F. O. 5	+	-	-	+	-	-
Casca de *Pinus* F. O. 6	-	-	-	-	-	-
Casca de *Pinus* F. O. 7	+ +	-	-	+	-	-
Casca de *Pinus* F. O. 8	+	-	-	-	-	+
Casca de *Pinus* F. O. 9	+	-	-	+	-	-

Pelotons quanto à aparência: **Int.** = intactos; **Dig.** = digeridos; **Inter.** = interligados. *Pelotons* quanto à localização dentro da célula: **Quad.** = em apenas um quadrante; **Quad. Op.** = em quadrantes opostos; **Esp.** = espalhados. *Pelotons* quanto à freqüência: **+** = de 1 a 5; **+ +** = de 6 a 15; **+ + +** = mais de 15. *Para **Int., Dig.** e **Inter., Quad., Quad. Op.** e **Esp.:** +, presença; -, ausência. T = testemunha. Aumento utilizado para registro de freqüência dos *pelotons* – 10x1,6.

Para o substrato Casca de *Pinus* não houve contaminação do tratamento testemunha e novamente ocorreram mortes de plântulas, que puderam ser verificadas em cinco parcelas, sendo representadas por um indivíduo em cada um dos seguintes tratamentos de inoculação: F. O. 1, F. O. 2, F. O. 3, F. O. 7 e F. O. 9.

É possível que a morte das plântulas tenha ocorrido como conseqüência do valor de pH nesse substrato, 4,9. Esse valor é considerado baixo para o cultivo de orquídeas, cujos valores de referência estão entre 5 e 5,5 (gênero *Cattleya*) e 5,5 e 7 (gênero *Dendrobium*) segundo KÄMPF (2005). Uma diferença como essa normalmente não seria causa de morte de plântulas, mas é possível que, como o experimento envolveu uma fase de aclimatização, o valor mais baixo de pH tenha sido prejudicial.

Tabela 15. Aparência (Int., Dig., Inter.), localização (Quad., Quad.Op., Esp.) e freqüência (+, ++, +++) de pelotons em raízes de orquídeas no substrato Biomax.

Tratamentos de inoculação	*Pelotons*					
	Int.	**Dig.**	**Inter.**	**Quad.**	**Quad.Op.**	**Esp.**
Biomax T	-	-	-	-	-	-
Biomax F. O. 1	+ + +	-	-	-	-	+
Biomax F. O. 2	+	-	-	-	-	+
Biomax F. O. 3	+	-	-	+	-	-
Biomax F. O. 4	-	-	-	-	-	-
Biomax F. O. 5	+ + +	-	-	+	-	-
Biomax F. O. 6	+ +	-	-	-	-	+
Biomax F. O. 7	+ +	-	-	-	+	-
Biomax F. O. 8	-	+	+	+	-	-
Biomax F. O. 9	+	-	-	-	-	+

Pelotons quanto à aparência: **Int.** = intactos; **Dig.** = digeridos; **Inter.** = interligados. *Pelotons* quanto à localização dentro da célula: **Quad.** = em apenas um quadrante; **Quad. Op.** = em quadrantes opostos; **Esp.** = espalhados. *Pelotons* quanto à freqüência: **+** = de 1 a 5; **+ +** = de 6 a 15; **+ + +** = mais de 15. *Para **Int., Dig.** e **Inter., Quad., Quad. Op.** e **Esp.:** +, presença; -, ausência. T = testemunha. Aumento utilizado para registro de freqüência dos *pelotons* – 10x1,6.

O tratamento testemunha do substrato Biomax apresentou apenas uma parcela contaminada. Em relação à morte de parcelas, somente o tratamento F. O. 7 apresentou um exemplar nessa condição, podendo estar relacionado à sua alta retenção de água (72%).

Uma observação que pode ser atribuída a todos os substratos é que nenhum tratamento de inoculação resultou em benefício. Não há relatos na literatura de interferências no desenvolvimento de plântulas de orquídeas ocorridas devido à utilização de isolados fúngicos, há sim, trabalhos que mostram êxito na utilização de tratamentos de inoculação, mas esses se referem apenas à germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* obtidas de cápsulas na natureza (PEREIRA et al., 2005b) e de *Encyclia tampensis* (ZETTLER et al., 1999). ZETTLER et al. (1999) especularam não saber qual o real papel do fungo associado às orquídeas após sua germinação.

A presença apenas de *pelotons* intactos, independentemente da sua quantidade e substrato, pode significar uma infecção tardia dos fungos micorrízicos.

Já para os tratamentos nos quais foram observados *pelotons* digeridos, pode-se dizer que houve benefício para a planta pela lise de estruturas fúngicas e quando *pelotons* intactos são encontrados juntamente com *pelotons* digeridos, fica evidente o caráter cíclico da associação (UETAKE et al., 1997). A observação de *pelotons* em

grandes quantidades – tanto intactos quanto digeridos – mostra uma infecção intensa dos tecidos das raízes.

Em relação a essas observações fica a dúvida sobre qual o período em que a planta é realmente beneficiada pela associação fúngica e quando realizar as observações. Uma situação levantada por ZETTLER et al. (1999) é que num momento inicial, as sementes se beneficiariam da associação com fungos micorrízicos, mas não há estudos suficientemente longos para observar se as necessidades futuras das plantas seriam supridas pela associação.

No trabalho não foi verificada a especificidade entre isolados fúngicos e *Hadrolaelia perrinii*, pois o fungo isolado de um exemplar adulto de *Hadrolaelia perrinii*, o F. O. 3, não obteve resultado significativo em relação aos outros tratamentos de inoculação, apresentando intensa colonização apenas no substrato Coxim.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- Não houve efeito benéfico dos fungos inoculados sobre o desenvolvimento das plântulas de orquídea.
- Houve efeito prejudicial de dois fungos, um sobre a parte aérea e raízes e outro somente sobre as raízes.
- O substrato Comercial mostrou-se adequado para o crescimento da orquídea *Hadrolaelia perrinii* e tem potencial para substituir ao Xaxim no cultivo de orquídeas.
- Há a necessidade de mais estudos relacionados, tanto aos substratos quanto a outras espécies de orquídeas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A.O. Estudo da fotossíntese de espécies dominantes em floresta de transição no sudoeste da Amazônia. 2004. Tese Dissertação (de Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá. 2004.

ASSIS,A.M.; FARIA, R.T.; COLOMBO, L.A & CARVALHO, J.F.R.P. Utilização de substratos à base de coco no cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Agronomy,** Maringá, v.27, n.2, p.255-260, 2005.

BARKER, S.J.; TAGU, D. & DELP, G. Regulation of root fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. **Plant Physiology**, v.116. p.1201-1207, 1998.

CAMERON, D.D.; LEAKE, J.R. **&** READ, D.J. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfer in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **New Phytologist.**, 171:405-416 (2), 2006

CARRIJO,O.A.; LIZ, R.S. & MAKISHIMA, N. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira,** Brasília, v.20, n.4, p.533-535, 2002.

CHOU, L.C. & CHANG, D.C.N. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Anoectochilus formosanus* and *Haemaria discolor* and their F_1 hybrids. **Bot, Bull Academia Sinica,** v.45, p.143-147, 2004.

COLOMBO, L.A.; FARIA, R.T.; ASSIS, A.M. & FONSECA, I.C.B. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum. Agronomy,** Maringá, v.27, n.1, p.145-150, 2005.

CORREIA, K.G. & NOGUEIRA, R.J.M.C. Avaliação do crescimento do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) submetido a déficit hídrico. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.4, p.1-7, 2004.

DRESSLER, L.R. The orchids: Natural History and Classification. Harvard University Press, 332p. 1981.

EK, M.; LJUNGQUIST, P.O. & STENTRÖM, E. Indole-3-acetic acid production by micorrhizal fungi determined by gas chromatography-mass spectrometry. **New Phytologist**, v.94, p.401-407, 1983.
et al., 1983.

FARIA, T.R.; REGO, L.V.; BERNARDI, A. & MOLINARI, H. Performance of differents genotypes of Brasilian orchid cultivation in alternatives substrates. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** v.44, n.4, p.337-342, 2001.

FARIA, R.T.; STANCATO, G.C. Orquídea: semeadura. Boletim Técnico – IAC, Campinas, n.174, p.37-39, 1998.

FROWINE, S.A. The Cattleya Alliance. In: Fragrant orchids. A guide to selecting, growing, and enjoying. Timber Press. p.44-66, 2005.

HERNÁNDEZ-ROSAS J.I. Diversidad de grupos funcionales de plantas del dosel de um bosque húmedo tropical del alto Orinoco, Estado Amazonas, Venezuela. **Ecotropicos,** v.12, n.1, p.33-48, 1999.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N. Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de *Eucalyptus.* Circular Técnica – IPEF. n.194, 2002.

HUANG, D.D.; LAW, R.C.S. & MAK, O.T. Effects of tissue-culture *Anoectochilus formosanus* Hay. extracts on the arachidonate metabolism. **Bot. Bull Academia Sinica,** v.32, p.113-119, 1991.

KÄMPF, A.N. Substrato. In: Produção comercial de plantas ornamentais. Editora Agrolivros. Guaíba, RS. p.45-88, 2005.

LIBARDI, P.L. Dinâmica da água no solo. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.p.335, 2005

MACHADO NETO, N.B.; CUSTÓDIO, C.C.; CARVALHO, P.R.; YAMAMOTO, N.L. & CACCIOLARI, C. Casca de pinus: avaliação da capacidade de retenção de água e da fitotoxidade. **Colloquium (UNIOESTE),** v.1, n.1, p.19-24, 2005.

MARTIN, T.N.; LIMA,L.B.; RODRIGUES,A.; GIRARDI, E.; FABRI, E.G. & MINAMI, K. Utilização de vermiculita, casca de pínus e carvão na produção de mudas de pepino e de pimentão. **Acta Scientiarum. Agronomy,** Maringá, v.28, n.1, p.107-113, 2006.

McCORMICK, M.K.; WHIGHAM, D.F. & O'NEILL, J. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. **New Phytologist,** v.163, p.425-438, 2004.

McKENDRICK, S.L.; LEAKE, J.R.; TAYLOR, D.L. & READ, D.J. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. **New Phytologist,** v.145, p.523-537, 2000.

MORAES, L.M.; CAVALCANTE, L.C.D. & FARIA, R.T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orquidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum. Agronomy,** Maringá, v.24, n.5, p.1397-1400, 2002.

NEVES, O.S.C.; CARVALHO, J.G. & RODRIGUES, C.R. Crescimento e nutrição mineral de mudas de umbuzeiro (*Sponidas tuberosa* Arr. Cam.) submetidas a níveis de salinidade em solução nutritiva. **Ciência Agrotécnica**, v.28, n.5, p. 997-1006, 2004.

NOGUEIRA, R.E.; PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M.; LANNA, M.C.S.; MENDONÇA, M.P. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do quadrilátero ferrífero, MG, Brasil. **Acta Bot. Bras.,** 19:417-424 (3), 2005

OTERO, J.T.; ACKERMAN, J.D. & BAYMAN, P. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. **American Journal of Botany,** v.89, n.11, p.1852-1858, 2002.

PEREIRA, O.L. Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécies de orquídeas neotropicais. 2001. Dissertação (de Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2001.

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. **Canadian Journal of Botany,** v.83, p.54-65, 2005.

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 rizoctonióides. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** v.29, p. 199-206, 2005b.

PERKINS, A.J. & McGEE, P.A. Distribution of orchid micorrhizal fungus, *Rhizoctonia solani*, in relation to its host, *Pterostylis acuminata*, in the field. **Australia Journal of Botany**, v.43, p.565-575, 1995.

PORTO, E.R.; AMORIM, M.C.C. & ARAÚJO, O.J. Potencialidades da erva-sal (*Atriplex nummularia)* irrigada com o rejeito da dessalinização de água salobra no semi-árido brasileiro como alternativa de reutilização. In: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, Porto Alegre, Brasil, p.1-8, 2000.

PRIDGEON, A.M; CRIBB, P.J. & CHASE, M.W. Genera Orchidacearum: General introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. Oxford University Press, 197p. 1999.

RASMUSSEN, H.N. Recent development in the study of orchid mycorrhiza. **Plant and Soil,** v.244, p.149-163, 2002.

RASMUSSEN, H.N. Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press, 444p. 1995.

RASMUSSEN, H.N. & WHIGHAM, D.F. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. **New Phytologist,** v.154, p.797-807, 2002.

RODRIGUES, D.T. Nutrição e fertilização de orquídeas *in vitro* e em vasos. 2005. Dissertação (de Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2005.

SEN, R.; HIETALA, A.M. & ZELMER, C.D. Common anastomosis and internal transcribed spacer RFLP groupings in binucleate *Rhizoctonia* isolates representing root endophytes of *Pinus sylvestris*, *Ceratorhiza* spp. From orchid mycorrhizas and a phytopathogenic anastomosis group. **New Phytologist,** v.144, p.331-341, 1999.

SHAN, X.C.; LIEW, E.C.Y. & WEATHERHEAD, M.A.; HODGKISS, I.J. Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. **Mycologia,** v.94, n.2, p.230-239, 2002.

SILVEIRA, A.P.D. Micorrizas. In: Microbiologia do Solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Piracicaba, SP. p.257-282, 1992.

SMITH, S.E. & SMITH, F.A. Tansley Review No.20. Structure and function of the interfaces in grotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. **New Phytologist,** v.114, p.1-38, 1990.

SMITH, S.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; KOIDE, R. & CAIRNEY, J.W.G. Nutrient transport in micorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. **Plant and Soil**, v.159, p.103-113, 1994.

SOUZA, N.A. & JASMIN, J. Crescimento de singônio com diferentes tutores e substratos à base de mesocarpo de coco. **Horticultura Brasileira,** Brasília, v.22, n.1, p.39-44, 2004.

TRUGILHO,P.F.; MORI, F.A.; LIMA, J.T. & CARDOSO, D.P. Determinação do teor de taninos na casca de *Eucalyptus* spp. **Cerne,** Lavras, v.9, n.2, p.246-254, 2003.

UETAKE, Y. FARQUHAR, M.L. & PETERSON, R.L. Changes in microtubule arrays in symbiotic orchid protocorms during fungal colonization and senescence. **New Phytologist,** v.135, p.701-709, 1997.

UETAKE, Y. & PETERSON, R.L. Association between microtubules and symbiotic fungal hyphae in protocorm cells of the orchid species, *Spiranthes sinensis.* **New Phytologist,** v.140, p.715-722, 1998.

VITAL, W.M.; TEIXEIRA, N.T.; SHIGIHARA, R.; FERRARO, A.E.; DAMAGLIO, E.L. & ALVERO, P. Comportamento de variedade de alface (*Lactuca sativa* L.) cultivadas em hidroponia com diferentes soluções nutritivas. **Revista Ecossistema**, v.27, p.59-62, 2002.

WARCUP, J.H & TALBOT, P.H.B. Perfect states of rhizoctonias associated with orchids. **New Phytologist,** v.66, p.631-641, 1967.

YAMAKAMI, J.K.; FARIA, R.T.; ASSIS, A.M. & OLIVEIRA, L.V.R. Cultivo de *Cattleya* Lindley (Orchidaceae) em substratos alternativos ao xaxim. **Acta Scientiarum. Agronomy,** Maringá, v.28, n.4, p.523-526, 2006.

ZETTLER, L.W.; BURKHEAD, J.C & MARSHALL, J.A. Use of mycorrhizal fungus from *Epidendrum conopseum* to germinate seed of *Encyclia tampensis in vitro.* **Lindleyana,** v.14, p.102-105, 1999.