FERNANDA DE SIQUEIRA PIECZAK

MICROMORFOLOGIA E ANATOMIA DA FLOR DE GOODYERINAE KLOTZSCH (ORCHIDACEAE:
ORCHIDOIDEAE)

Orientadora: Dra. Cleusa Bona.

Co-orientador: Dr. Eric de Camargo Smidt.

CURITIBA

2017

RESUMO

A subtribo Goodyerinae Klotzsch (Cranichideae, Orchidoideae, Orchidaceae) é representada no Brasil por 36 espécies nativas em dois gêneros: *Aspidogyne* Garay e *Microchilus* C. Presl. No estado do Paraná são conhecidas 14 espécies do gênero *Aspidogyne* Garay e duas espécies do gênero *Microchilus* C. Presl. Os gêneros desta subtribo possuem a formação de um calcar, originado do labelo, cuja morfologia tem importância taxonômica. Considerando a escassez de conhecimentos morfológicos, anatômicos e da micromorfologia floral desta subtribo, o propósito do trabalho é caracterizar a estrutura anatômica das sépalas, pétalas, labelo e calcar de *Aspidogyne* e *Microchilus*, com o objetivo de comparar as estruturas secretoras entre as espécies do grupo e caracterizar o tecido secretor no calcar. As análises dos materiais serão realizadas no Laboratório de Botânica Estrutural e no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba. Os materiais serão processados de acordo com técnicas convencionais para microscopia de luz e microscopia eletrônica (varredura e transmissão).

Palavras-chave: Anatomia do calcar, *Aspidogyne*, *Microchilus*, anatomia do labelo, estruturas secretoras.

1 INTRODUÇÃO

A tribo Cranichideae Lindl. representa o grupo das orquídeas terrestres (DRESSLER, 1993). Em sua maioria herbáceas terrestres, litófitas ou raramente epífitas, possuem raízes grossas agrupadas ou espalhadas ao longo de um rizoma espesso. Suas folhas membranáceas são arrançadas em uma roseta basal ou em espiral em torno de uma haste. Apresenta inflorescências terminais, racemosas e flores pequenas que se abrem parcialmente; o estigma é frequentemente bilobado. Compreende 93 gêneros e cerca de 600 espécies distribuídas em sete subtribos e seus representantes são extensamente distribuídos pelos trópicos e subtropicais, com espécies em regiões temperadas da Austrália, Ásia e das Américas do Norte e do Sul (PRIDGEON *et al.* 2003).

A subtribo Goodyerinae Klotzsch (tribo Cranichideae - Orchidaceae) possui 32 gêneros e 744 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do Novo e Velho Mundo (ORMEROD, 2009, 2013). Apresentando no Brasil 2 gêneros: *Aspidogyne* Garay e *Microchilus* C. Presl com 36 espécies nativas(ENGELS, 2014).

As Goodyerinae Klotzsch são caracterizadas pelo hábito distinto, com uma porção basal e horizontal do caule, de onde partem as raízes, e uma porção ereta e mais desenvolvida de onde surgem as folhas. Embora as características vegetativas das Goodyerinae sejam relativamente uniformes, as flores são variadas e frequentemente bastante especializadas. Encontramos estipes tegulares, caudículos bem desenvolvidos, colunas assimétricas, torcidas, e muita variação na estrutura do lábio e da coluna (DRESSLER, 1993).

As características anatômicas dos órgãos vegetativos em Goodyerinae são muito semelhantes as demais Cranichideae. Embora o padrão comum das raízes em Cranichideae é a presença de velame com paredes espessadas ou com discretos espessamentos escalariformes e presença de espirantossomos (PRIDGEON *et al.*, 2003, BERNAL *et al.*, 2015), Goodyerinae possui epiderme radicular simples, exoderme com paredes delgadas, presença de colênquima na raiz, e raros espirantossomos (ENGELS *et al.*, dados não publicados). Segundo (ENGELS *et al.*, dados não publicados) esses caracteres podem estar associados ao tipo de vida humícola.

O caule apresenta cutícula fina; estrias de Caspary na endoderme, sendo um novo caractere na tribo, e variação no número de feixes vasculares, passando de 15-48 na tribo para 10-50 no grupo; presença de espirantossomos no caule é constante em todas as espécies. Estômatos do tipo anomocíticos. Caule radicular contendo mais amido do que o caule foliar. Folhas com cutícula fina hipoestomáticas e com xilema binário (ENGELS *et al.*, dados não publicados) corrobora com a descrição de Cranichideae (PRIDGEON *et al.*, 2003), exceto em

algumas espécies de *Pterostylis* com cutícula estriada; multipapiladas sobre cada célula de *Goodyera oblongifolia*, e folhas anfiestomáticas em *Spiranthes* e algumas *Pterostylis* (STERN, 2014).

As Goodyerinae possuem flores ressupinadas com ovário piloso; sépalas normalmente pilosas na face abaxial; pétalas aderidas lateralmente à sépala dorsal; labelo dotado de calcar e coluna diferenciada devido as especializações no rostelo e no viscídio (ENGELS, 2014). Em alguns gêneros, durante a remoção do polinário, o viscídio rompe parte do rostelo, deixando no remanescente rostelar uma “cicatriz” com padrão definido, utilizado como caráter taxonômico (ENGELS, 2014).

Estudos anatômicos em Orchidaceae apresentam importância ecológica relacionada a fatores ambientais (ANDREOTA *et al.*, 2015; NUNES *et al.* 2015; OLIVEIRA & SAJO, 1999; SILVA *et al.*, 2010) ou taxonômico (NUNES *et al.*, 2014, 2017). Contudo, de acordo com Pridgeon *et al.*, (2003) não há informações anatômicas florais sobre os gêneros pertencentes a Goodyerinae.

De acordo com estudos realizados dentro da família Orchidaceae, o néctar é a substância mais comumente secretada, no entanto pode ocorrer óleos, fragrâncias, ceras ou outras substâncias resinosas e lipídicas, sendo fatores de atração das plantas aos insetos (DAVIES & STPICZYNSKA, 2014; KOWALKOWSKA *et al.*, 2014; NUNES *et al.*, 2014, 2015). Há ainda a possibilidade da presença de secreções não aparentes que só são acessíveis a insetos roedores pois estas encontram-se em papilas dentro do labelo e calcar (DAVIES *et al.*, 2003; DAVIES & STPICZYNSKA, 2008, 2009; DAVIES & TURNER, 2004).

Localizar e conhecer a morfologia das estruturas secretoras podem auxiliar no entendimento da funcionalidade dessas em relação aos polinizadores (SWIECZKOWSKA & KOWALKOWSKA, 2015, TEIXEIRA *et al.*, 2004). Estruturas secretoras de néctar são bastante variadas, podendo ocorrer na forma de papilas, esporões, tricomas glandulares e cunículos (estrutura proveniente de um tubo floral entre o ovário e a base do perianto) (DAVIES *et al.*, 2003; DAVIES & TURNER, 2004; PRIDGEON *et al.*, 1999), e embora as papilas também sejam encontradas nas sépalas e pétalas (MOREIRA *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2004), na coluna e na antera da flor e não somente no labelo, estas ainda não são bem estudadas e possuem valor taxonômico (DAVIES & STPICZYNSKA, 2006, 2014).

Apesar do grande número de gêneros em Goodyerinae, são poucos os que têm a ecologia reprodutiva conhecida (PRIDGEON *et al.*, 2003). E considerando a falta de informações anatômicas e ecológicas sobre a Subtribo Goodyerinae no Estado do Paraná, as mudanças de circunscrição, a diminuição das áreas naturais e possível vulnerabilidade dos táxons, além do

provável surgimento de novos registros, combinações e descobertas, justifica-se o presente trabalho.

Portanto, no presente trabalho pretende-se responder as seguintes questões: 1). Qual o nível de variação micromorfológica da flor que ocorre entre as espécies ou gêneros em questão? 2). Ocorrem osmóforos nas peças florais? Qual sua morfologia e distribuição? 3). O calcar apresenta estruturas secretoras internas? Qual a morfologia dessas nas diferentes espécies?

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo analisar os caracteres florais micromorfológicos e anatômicos nas espécies de *Aspidogyne* e *Microchilus* (subtribo Goodyerinae, Tribo Cranichideae). Temos como propósito localizar e caracterizar o tecido secretor no calcar; avaliar as variações micromorfológicas do calcar, labelo e demais peças florais; averiguar a presença de osmóforos na superfície do perianto e caracterizar sua estrutura anatômica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Serão analisadas as flores dos representantes de Goodyerinae que ocorrem no Paraná. As coletas serão realizadas em campo durante o período entre março de 2017 e dezembro de 2018, nas seguintes unidades de conservação (Tabela 1):

Tabela 1: Lista das Unidades de Conservação de interesse no interior do Paraná por mesorregião.

Mesorregião	Unidade de Conservação
Metropolitana	PE Graciosa
	PE Ilha do Mel
	PE Lauráceas
	PE Boguaçu
	PE Pau Oco
	PE Pico do Marumbi
	PE Pico Paraná
	PE Roberto Ribas Lange
	PE do Palmito
Centro-Oriental	PE Vila Velha
	PE Guartelá
	PE Vale do Codó
Sudeste	EE Fernandes Pinheiro
	MN Salto São João
Norte Pioneiro	PE Penhasco Verde
	PE Mata São Francisco
Centro-Sul	PE Santa Clara
	PE Serra da Esperança
Norte Central	PE Mata dos Godoy

A princípio serão analisadas as espécies *Aspidogyne argentea*, *A. bidentifera*, *A. commelinoides*, *A. juruenensis*, *A. kuczynskii*, *A. longicornu*, *Microchilus arietinus* e *M. austrobrasiliensis*, que já foram coletadas além de outras espécies que serão coletadas durante o desenvolvimento do projeto. Os materiais serão analisados a partir de materiais frescos ou fixados.

As amostras vivas serão fixadas em FAA 50 (JOHANSEN, 1940) e armazenadas em álcool 70% até o momento do seccionamento e preparação das lâminas.

Lâminas permanentes das flores inteiras ou peças florais serão montadas, sendo o material processado e incluso em historesina (Leica®) segundo informações do fabricante, e coradas com Azul de Toluidina (O'BRIEN *et al.*, 1964). Será utilizada a técnica de inclusão em Paraplast® (JOHANSEN, 1940) para cortes seriados. As fotomicrografias serão obtidas através de microscópio Zeiss Axiolab com câmera digital acoplada.

Serão feitos testes para detecção de possíveis lipídeos totais com Sudan Black III (DAVIES *et al.*, 2014); para proteínas com azul brilhante de Coomassie R250 (FISCHER, 1968); mucilagens com ácido tânico/cloreto férrico (PIZZOLATO & LILLIE, 1973); amido com Lugol (JOHANSEN, 1940) e polissacarídeos totais Reação PAS (McMANUS, 1948).

As superfícies das peças florais serão analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para essa análise serão utilizadas amostras reidratadas ou fixadas em FAA 50. Essas serão desidratadas em série etílica até etanol absoluto e secas via ponto crítico com CO₂ no aparelho BalTec CPD 030. Em seguida serão fixadas, com fita de cobre adesiva, em suportes metálicos e metalizadas com ouro no equipamento Balzers Union FL 9496 SCD 030. A análise e eletromicrografias serão feitas no MEV Jeol e JSM – 6360LV Scanning Electron Microscope (Jeol Ltd, Tokyo, Japan), no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Pequenas amostras das estruturas secretoras serão fixadas em solução de glutaraldeído 1%, formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio e pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio 1% (OSO₂). Após desidratação em série etílica o material será incluído em resina acrílica hidrofílica LR White® “Hard Grade” (Fluka). As seções ultrafinas serão feitas em Ultramicrótopo Leica Ultracut UCT, em navalha de diamante, colocadas em suportes (“grids”) de cobre, contrastados em solução de acetato de uranila 2% e solução de chumbo por 5 minutos. As análises serão realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL – 1200 EX II) no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba.

A análise anatômica e ultraestrutural encontra-se em andamento. Foram analisadas previamente sete espécies das citadas inicialmente, sendo que dessas, duas já estão fixadas e incluídas para seccionamento e análise em microscópio eletrônico de transmissão. Buscas a campo serão feitas para inclusão de novas espécies ainda não coletadas para análise anatômica.

REFERÊNCIAS

- ANDREOTA, R. C.; BARROS, F.; SAJO, M. G. Root and leaf anatomy of some terrestrial representatives of the Cranichideae tribe (Orchidaceae). **Braz. J. Bot.**, n. 38, v. 2, p. 367-378. 2015.
- BERNAL, A. A.; SMIDT, E. C.; BONA, C. Spiral root hairs in Spiranthinae (Cranichideae: Orchidaceae). **Braz. J. Bot.**, 2015.
- DAVIES, K. L.; TURNER, M. P.; GREGG, A. Lipoidal labellar secretions in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 91, p. 439-446. 2003
- DAVIES, K. L.; STPICZYNSKA, M. Labellar micromorphology of Bifrenariinae Dressler (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 98, p. 1215–1231. 2006.
- DAVIES, K. L.; STPICZYNSKA, M. Labellar micromorphology of two Euglossine-pollinated Orchid Genera; *Scuticaria* Lindl. and *Dichaea* Lindl. **Annals of Botany**, v. 102, p. 805–824. 2008.
- DAVIES, K. L.; STPICZYNSKA, M. Comparative histology of floral elaiophores in the orchids *Rudolphiella picta* (Schltr.) Hoene (Maxillariinae *sensu lato*) and *Oncidium ornithirhynchum* H.B.K. (Oncidiinae *sensu lato*). **Annals of Botany**, v. 104, p. 221-234. 2009.
- DAVIES, K. L.; STPICZYNSKA, M. Labellar anatomy and secretion in *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae: Bulbophyllinae) sect. *Racemosae* Benth. & Hook. f. **Annals of Botany**, p. 1- 23. 2014.
- DAVIES, K. L.; TURNER, M. P. Morphology of floral papillae in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 93, p. 75–86. 2004.
- DRESSLER, R. Phylogeny and classifications of the orchid family. Portland: Dioscorides press. 1993.
- ENGELS, M. E. **A subtribo Goodyerinae (Orchidaceae: Orchidoideae) no estado do Paraná, Brasil.** 185 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- FISCHER, D. B. Protein staining of ribboned Epon sections for light microscopy. **Histochemie**, v. 16, p. 92-96. 1968.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechniques.** New York,:McGraw-Hill book company, 1940.
- KOWALKOWSKA, A. K.; KOZIERADZKA-KISZKURNO, M; TURZYNSKI, S. Morphological, histological and ultrastructural features of osmophores and nectary of *Bulbophyllum wendlandianum* (Kraenzl.) Dammer (*B.* section *Cirrhopetalum* Lindl., Bulbophyllinae Schltr., Orchidaceae). **Springer.** 2014.
- MCMANUS, J.F.A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, v. 23, p. 99-108. 1948.

MOREIRA, A. S. F. P.; FUHRO, D.; ISAIAS, R. M. S. Anatomia floral de *Epidendrum fulgens* Brongn. (Orchidaceae – Epidendroidea) com ênfase no nectário e sua funcionalidade. **Rev. Bio. Neotrop.** v.5, n. 1, p. 23-39. 2008.

NUNES, E. L. P.; MALDONADO, P. E.; SMIDT, E. C.; STÜTZEL, T.; COAN, A. I. Floral micromorphology and anatomy and its systematic application to Neotropical *Bulbophyllum* section *Micranthae* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. XX, p. 1-22. 2017.

NUNES, E. L. P.; SMIDT, E. C.; STÜTZEL, T.; COAN, A. I. What do floral anatomy and micromorphology tell us about Neotropical *Bulbophyllum* section *Didactyle* (Orchidaceae: Bulbophyllinae)? **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 175, p. 438-452. 2014.

NUNES, E. L. P.; SMIDT, E. C.; STÜTZEL, T.; COAN, A. I. Comparative floral micromorphology and anatomy of species of *Bulbophyllum* section *Napelli* (Orchidaceae), a Neotropical section widely distributed in forest habitats. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2015.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373. 1964.

OLIVEIRA, V. C.; SAJO, A. G. Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 3, p. 365-374, 1999.

ORMEROD, P. Studies of Neotropical Goodyerinae (Orchidaceae) 4, **Harvard papers in Botany**, v. 14, n.2, p. 111-128. 2009.

ORMEROD, P. Studies of Neotropical Goodyerinae (Orchidaceae) 5, **Harvard papers in Botany**, v. 18, n. 1, p. 51-60. 2013.

PIZZOLATO, T. D.; LILLIE, R. D. Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 21, p. 56-64. 1973.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W. Gênera Orchidacearum. v.1. General Introduction, Apostasioidea, Cyripedioidea. Oxford University Press. 189 p. 1999.

PRIDGEON, A. M., CRIBB, P. J., CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. Genera Orchidacearum. v.3: **Orchidoideae. pt. 2: Vanilloideae.** Oxford University Press, Oxford. 2003.

SILVA, I. V.; MEIRA, R. M. S. A.; AZEVEDO, A. A. Anatomia de raízes de espécies de Orchidaceae do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais. **Hoehnea**, v. 37, n. 1, p. 147-161, 2010.

STERN, W.L. 2014. **Anatomy of the Monocotyledons.** Volume X: Orchidaceae. Oxford University Press.

SWIECZKOWSKA, E.; KOWALKPWSKA, A. K.; Floral nectary anatomy and ultrastructure in micoheterotrophic plant, *Epipogium aphyllum* Sw. (Orchidaceae). **The Scientific World Journal.** 11 p. 20015

TEIXEIRA, S. P.; BORBA, E. L.; SEMIR, J. Lip anatomy and implications for the pollination mechanisms of *Bulbophyllum* species (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 93, p. 499-505. 2004.