

ANGÉLICA PATRICIA PAVEZZI BARBERO

Morfologia das sementes e influência do déficit hídrico na germinação em espécies de Pleurothallidinae (Orchidaceae)

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2010

ANGÉLICA PATRICIA PAVEZZI BARBERO

Morfologia das sementes e influência do déficit hídrico na germinação em espécies de Pleurothallidinae (Orchidaceae)

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. FÁBIO DE BARROS

CO-ORIENTADOR: DR. EMERSON ALVES DA SILVA

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Barbero, Angélica Patrícia Pavezzi

B234f Morfologia das sementes e influência do déficit hídrico na germinação em espécies de Pleurothallidinae (Orchidaceae) / Angélica Patrícia Pavezzi Barbero -- São Paulo, 2010.

101 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2010

Bibliografia.

1. Orchidaceae. 2. Estresse hídrico. 3. Microscopia eletrônica . I. Título

CDU: 582.594.2

*"Se não houver frutos
Valeu a beleza das flores
Se não houver flores
Valeu a sombra das folhas
Se não houver folhas
Valeu a intenção da semente"*

Maurício Francisco Ceolin

*Dedico aos meus pais, Odail e Maria,
que sempre me apoiaram incondicionalmente.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades que tive em minha vida, em especial a de realizar esse trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Fábio de Barros, e meu co-orientador, Dr. Emerson Alves da Silva, por se responsabilizarem pela minha orientação, pelos ensinamentos, confiança, paciência, amizade e disponibilidade.

Ao Dr. Rogério Mamoru Suzuki e à bióloga Vânia Carolina Moreira, pela ajuda fundamental nos experimentos de germinação. Sem vocês eu não teria resolvido os problemas que surgiram!

À Dra. Maria Amélia Vitorino da Cruz-Barros, por dedicar parte de seu tempo me ajudando nas análises de microscopia eletrônica de varredura. Sua contribuição foi de extrema importância.

À Dra. Andréa Macedo Corrêa, pelo aprendizado, amizade e grande ajuda na rotina de laboratório e na obtenção de protocolos para os estudos de morfologia.

Ao Dr. Gilberto Barbante Kerbauy, pelas sugestões sobre a montagem do experimento de germinação.

Aos amigos Franklin Vinhos, Vinicius Trettel Rodrigues, Leonardo Alves Seixas Guimarães, Túlio Luiz Laitano Penha e Luciano, pela coleta de sementes.

Ao Instituto de Botânica, em especial ao Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado.

À Pós-Graduação do Instituto de Botânica, em especial à Marcinha, pela eficiência e simpatia com que sempre realiza seu trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Botânica, pelo pronto atendimento sempre que necessitei de seus serviços.

Aos curadores do herbário SP e da coleção viva do Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado, por receber o depósito do material testemunho e por autorizar o uso de exemplares da coleção nesse trabalho.

Às Dras. Jane Elizabeth Kraus, Mizué Kijizawa e ao Dr. Cláudio José Barbedo, pelas sugestões e observações feitas na aula de qualificação.

Aos professores das disciplinas: Dr. Emerson Alves da Silva, Dr. Marco Aurélio Tiné, Dra. Catarina Carvalho Niévola, Dra. Vivian Tamaki e Dr. Paulo Edson Chu, por partilhar um pouco de seu vasto conhecimento durante suas aulas.

À professora Cláudia Maria Fernandes Correia, pela revisão dos abstracts.

Aos funcionários e pesquisadores do Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado, Carlito Gomes Pereira, Eduardo Luís Martins Catharino, Fábio de Barros, João Rodrigues Chaves (Romário), dona Maria, Odila, Osmar José da Silva Gomes, Rodrigo Alexandre Torres, Rogério Mamoru Suzuki, Rosana Paiva Peres e Sandra Rossino, aos alunos e estagiários Andréa Macedo Corrêa, Carina Zorzeti, Jaqueline de Souza Souto, Juliana Missae Morimoto, Túlio Luiz Laitano Penha, Vânia Carolina Moreira, e todos que por lá passaram, pelo convívio harmonioso, pelo carinho e apoio. E aos meus “irmãos científicos” Fábio Pinheiro, Franklin Vinhos, Leonardo Alves Seixas Guimarães, Rebeca Politano Romanini e Vinicius Trettel Rodrigues pela amizade, ajuda, partilha, enfim, por tudo que vocês fizeram por mim desde que cheguei ao Orquidário.

Aos amigos da E.E. Prof. Raul Cardoso de Almeida, pelo carinho e pela torcida.

A toda minha família, tios, primos, avós, vizinhos e amigos de Potirendaba, que em muitos casos, mesmo sem entenderem direito o que eu vim fazer em São Paulo, sempre torceram muito por mim.

Aos meus pais, Odail e Maria, e meu irmão Rondineli, pelo apoio incondicional, por sonharem junto comigo, e estarem presentes em cada uma das minhas conquistas.

Ao meu marido, Luciano Okayama, por estar presente em cada etapa desse trabalho, por me apoiar, mesmo sabendo que isso faria com que houvesse momentos em que a tese estaria em primeiro plano, e por ajudar no tratamento e organização das figuras e na impressão da tese. Muito obrigada pela paciência, pela dedicação, compreensão, apoio e carinho!

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho...

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	1
RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO GERAL	8
Orchidaceae Juss. e a subtribo Pleurothallidinae Lindl.....	9
Germinação e desenvolvimento inicial em Orchidaceae	14
Objetivos	16
Literatura citada.....	17
CAPÍTULO 1: MORFOLOGIA DAS SEMENTES EM ESPÉCIES DE PLEUROTHALLIDINAE (ORCHIDACEAE)	20
Resumo.....	21
Abstract	21
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	25
Resultados	29
Discussão.....	69
Literatura citada.....	71
CAPÍTULO 2: INFLUÊNCIA DO DÉFICIT HÍDRICO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO INICIAL EM TRÊS ESPÉCIES DE PLEUROTHALLIDINAE (ORCHIDACEAE).	74
Resumo.....	75
Abstract	75
Introdução.....	77
Material e Métodos.....	79
Resultados e Discussão	84
Literatura citada.....	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS	94

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Tipos de crescimento em orquídeas. A: Crescimento monopodial em *Campylocentrum* sp. B: Crescimento simpodial em *Aspasia* sp. (Adaptado de Pinheiro *et al.* 2004)..... 10

Figura 2: A-B: Comparação da estrutura de uma flor típica de monocotiledônea com uma flor de orquídea. A: Flor de uma espécie de Amaryllidaceae (*Crinum* sp.); B: Flor de uma espécie de Orchidaceae (*Cattleya* sp.). C-E: Estrutura de um ginostêmio típico de uma orquídea (*Hadrolaelia caulescens*). C: Vista lateral; D: Vista ventral; E: Vista ventral após a retirada da antera e das polínias. F: Polínias retiradas da antera. (Adaptado de Pinheiro *et al.* 2004). 11

CAPÍTULO 1

Figuras 1-5. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Acianthera criptophoranthoides*. 1. Aspecto geral. 2. Extremidade micropilar. 3. Detalhe da extremidade micropilar. 4. Extremidade chalazal. 5. Detalhe das células da região mediana da testa. 30

Figuras 6-9. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Acianthera micrantha*. 6. Aspecto geral. 7. Extremidade micropilar. 8. Extremidade chalazal. 9. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando o espessamento triangular sobre as zonas de adesão das paredes anticlinais. 31

Figuras 10-13. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Acianthera ochreatea*. 10. Aspecto geral. 11. Extremidade micropilar. 12. Extremidade chalazal. 13. Detalhe das células da região mediana da testa. 33

Figuras 14-17. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Acianthera recurva*. 14. Aspecto geral. 15. Extremidade micropilar. 16. Extremidade chalazal. 17. Detalhe das células da região mediana da testa. 34

Figuras 18-22. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Acianthera saundersiana* 1. 18. Aspecto geral. 19. Extremidade micropilar. 20. Detalhe da extremidade micropilar. 21. Extremidade chalazal. 22. Detalhe das células da região mediana da testa. 36

Figuras 23-26. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Acianthera saundersiana* 2. 23. Aspecto geral. 24. Extremidade micropilar. 25. Extremidade chalazal. 26. Detalhe das células da região mediana da testa. 37

Figuras 27-30. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Acianthera saundersiana</i> 3. 27. Aspecto geral. 28. Extremidade micropilar. 29. Extremidade chalazal. 30. Detalhe das células da região mediana da testa.	38
Figuras 31-34. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Acianthera teres</i> . 31. Aspecto geral. 32. Extremidade micropilar. 33. Extremidade chalazal. 34. Detalhe das células da região mediana da testa.	40
Figuras 35-38. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Anathallis linearifolia</i> . 35. Aspecto geral. 36. Extremidade micropilar. 37. Extremidade chalazal. 38. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa.....	41
Figuras 39-41. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Anathallis obovata</i> . 39. Extremidade micropilar. 40. Extremidade chalazal. 41. Detalhe das células da região mediana da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.	42
Figuras 42-46. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Anathallis sclerophylla</i> . 42 e 43. Aspecto geral. 44. Extremidade micropilar. 45. Extremidade chalazal. 46. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa.....	44
Figuras 47-50. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Dryadella edwallii</i> . 47. Aspecto geral. 48. Extremidade micropilar. 49. Extremidade chalazal. 50. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa.....	45
Figuras 51-54. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Masdevallia infracta</i> . 51. Aspecto geral. 52. Extremidade micropilar. 53. Extremidade chalazal. 54. Detalhe das células da região mediana da testa.	46
Figuras 55-58. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Myoxanthus lonchophyllus</i> . 55. Aspecto geral. 56. Extremidade micropilar. 57. Extremidade chalazal. 58. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa.....	48
Figuras 59-62. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Octomeria crassifolia</i> . 59. Aspecto geral. 60. Extremidade micropilar. 61. Extremidade chalazal. 62. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa.....	49

Figuras 63-67. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Octomeria gracilis</i> . 63 e 64. Aspecto geral. 65. Extremidade micropilar. 66. Extremidade chalazal. 67. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa.....	51
Figuras 68-71. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Octomeria grandiflora</i> . 68. Aspecto geral. 69. Extremidade micropilar. 70. Extremidade chalazal. 71. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa.....	52
Figuras 72-75. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Octomeria juncifolia</i> . 72. Aspecto geral. 73. Extremidade micropilar. 74. Extremidade chalazal. 75. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa.....	53
Figuras 76-80. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Pabstiela tripterantha</i> . 76 e 77. Aspecto geral. 78. Extremidade micropilar. 79. Extremidade chalazal. 80. Detalhe das células da região mediana da testa.	55
Figuras 81-84. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Platystele</i> sp. 81. Aspecto geral. 82. Extremidade micropilar. 83. Extremidade chalazal. 84. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa.....	56
Figuras 85-88. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Pleurothallis ruscifolia</i> . 85. Aspecto geral. 86. Extremidade micropilar. 87. Extremidade chalazal. 88. Detalhe das células da região mediana da testa.	58
Figuras 89-92. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Specklinia grobyi</i> . 89. Aspecto geral. 90. Extremidade micropilar. 91. Extremidade chalazal. 92. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa.....	59
Figuras 93-96. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Stelis deregularis</i> . 93. Aspecto geral. 94. Extremidade micropilar. 95. Extremidade chalazal. 96. Detalhe das células da região mediana da testa.	61
Figuras 97-100. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Stelis hypnicola</i> . 97. Aspecto geral. 98. Extremidade micropilar. 99. Extremidade chalazal. 100. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa.....	62

Figuras 101-104. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Stelis</i> sp. 101. Aspecto geral. 102. Extremidade micropilar. 103. Extremidade chalazal. 104. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa. ..	63
Figuras 105-108. Eletromicrografias (MEV) de sementes de <i>Zootrophion atropurpureum</i> . 105. Aspecto geral. 106. Extremidade micropilar. 107. Extremidade chalazal. 108. Detalhe das células da região mediana da testa.	65
Figuras 109–116. Fotomicrografias (MO) de sementes de espécies de Pleurothallidinae, evidenciando os embriões. 109. <i>Acianthera ochreatea</i> . 110. <i>Acianthera recurva</i> . 111. <i>Acianthera saundersiana</i> 1. 112. <i>Acianthera saundersiana</i> 2. 113. <i>Acianthera saundersiana</i> 3. 114. <i>Acianthera teres</i> . 115. <i>Anathallis obovata</i> . 116. <i>Anathallis sclerophylla</i>	66
Figuras 117– 124. Fotomicrografias (MO) de sementes de espécies de Pleurothallidinae, evidenciando os embriões. 117. <i>Dryadella edwalli</i> . 118. <i>Masdevallia infracta</i> . 119. <i>Myoxanthus lonchophyllus</i> . 120. <i>Octomeria crassifolia</i> . 121. <i>Octomeria gracilis</i> . 122. <i>Octomeria grandiflora</i> . 123. <i>Octomeria juncifolia</i> . 124. <i>Pabstiella tripterantha</i>	67
Figuras 125–131. Fotomicrografias (MO) de sementes de espécies de Pleurothallidinae, evidenciando os embriões. 125. <i>Platystele</i> sp. 126. <i>Pleurothallis ruscifolia</i> . 127. <i>Specklinia grobyi</i> . 128. <i>Stelis deregularis</i> . 129. <i>Stelis hypnicola</i> 130. <i>Stelis</i> sp. 131. <i>Zootrophion atropurpureum</i>	68

CAPÍTULO 2

Figuras 1-4: Fases de desenvolvimento observadas em <i>Acianthera teres</i> , <i>Octomeria crassifolia</i> e <i>Octomeria gracilis</i> . 1a. Fase 0 (semente não germinada). 1b. Fase 1 (protocormo morto). 1c. Fase 2 (protocormo vivo, sem estruturas diferenciadas). 2. Fase 3 (plântula com a primeira estrutura semelhante à folha). 3. Fase 4 (plântula com duas ou mais folhas). 4. Fase 5 (plântula com folha e raiz).	83
Figuras 5-7. Gráficos representando a germinação e desenvolvimento inicial de <i>Acianthera teres</i> em meios de cultura com potenciais hídricos diferentes. 5. Aos 45 dias de cultivo, representando a porcentagem de indivíduos vivos em cada tratamento. 6. Aos quatro meses de cultivo, indicando a porcentagem de indivíduos em cada uma das fases de desenvolvimento para os quatro tratamentos. 7. Aos seis meses de cultivo, indicando a porcentagem de indivíduos em cada uma das fases de desenvolvimento para os quatro tratamentos.	88

Figuras 8-10. Gráficos representando a germinação e o desenvolvimento inicial de *Octomeria crassifolia* em meios de cultura com potenciais hídricos diferentes. 8. Aos 45 dias de cultivo, representando a porcentagem de indivíduos vivos em cada tratamento. 9. Aos quatro meses de cultivo, indicando a porcentagem de indivíduos em cada uma das fases de desenvolvimento para os quatro tratamentos. 10. Aos seis meses de cultivo, indicando a porcentagem de indivíduos em cada uma das fases de desenvolvimento para os quatro tratamentos. 89

Figuras 11-13. Gráficos representando a germinação e desenvolvimento inicial de *Octomeria gracilis* em meios de cultura com potenciais hídricos diferentes. 11. Aos 45 dias de cultivo, representando a porcentagem de indivíduos vivos em cada tratamento. 12. Aos quatro meses de cultivo, indicando a porcentagem de indivíduos em cada uma das fases de desenvolvimento para os quatro tratamentos. 13. Aos seis meses de cultivo, indicando a porcentagem de indivíduos em cada uma das fases de desenvolvimento para os quatro tratamentos. 90

RESUMO

As sementes de Orchidaceae são geralmente minúsculas e leves, sem endosperma, constituídas pelo embrião, que é uma massa de células sem estruturas diferenciadas, envolvido pela testa. Apesar da semelhança macroscópica, há grande variabilidade das características da testa e das células que a constituem. A subtribo Pleurothallidinae abrange cerca de 4.100 espécies em 36 gêneros, e ocorre somente nas Américas. Este trabalho está dividido em duas partes. No primeiro capítulo, o objetivo foi estudar a morfologia das sementes de espécies selecionadas de Pleurothallidinae. Para tanto foram analisadas 24 espécies de 12 gêneros, utilizando microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Várias espécies analisadas possuem ornamentações nas paredes das células da testa, característica comum em Epidendroideae, porém, não foram encontradas características informativas para a delimitação de gêneros, uma vez que muitas delas se estendem a toda subtribo. No segundo capítulo foi observada a influência do estresse hídrico, simulado por adição de polietileno glicol (PEG) no meio de cultura, na germinação e no desenvolvimento inicial em três espécies de Pleurothallidinae, provenientes de ambientes com diferentes graus de disponibilidades de água. *Acianthera teres* é rupícola, enquanto *Octomeria gracilis* e *O. crassifolia* são epífitas em floresta, contudo a primeira ocorre em áreas úmidas e a segunda em locais mais expostos. As sementes foram semeadas em meio MS/2, sob quatro tratamentos: controle, com 50 g.L⁻¹, 100 g.L⁻¹ e 200 g.L⁻¹ de PEG, induzindo potenciais hídricos de -0,53, -0,70, -0,86 e -1,60 MPa, respectivamente. Foram realizadas análises aos 45, 120 e 180 dias. Em *A. teres*, quanto menor o potencial hídrico do meio, menor foi a taxa de germinação, e maior o retardo no desenvolvimento. Já em *O. crassifolia*, quanto menor o potencial hídrico do meio, maior a taxa de germinação. *O. gracilis* apresentou certa tolerância à redução do potencial hídrico até 120 dias.

Palavras-chave: Epidendroideae, estresse hídrico, orquídeas, PEG.

ABSTRACT

Orchid seeds are tiny and light, without endosperm, consisting of an embryo, which is a mass of cells without differentiated structures surrounded by the testa. Despite the macroscopic similarity, there is a large variability of characteristics between the testa and the cells that constitute the seed. The subtribe Pleurothallidinae has about 4,100 species in 36 genera, and it occurs only in the Americas. This work consists of two parts. In the first chapter the objective was to study the morphology of seeds selected species of Pleurothallidinae. Therefore, we analyzed 24 species of 12 genera using light microscopy and scanning electron microscopy. Some species analyzed presented ornamentations on the walls of the cells in the testa, a common feature in the Epidendroideae subfamily, but no informative features for the delimitation of genera were found, because many of the features also occur within the whole subtribe. In the second chapter the objective was to observe the influence of water stress, simulated by the addition of polyethylene glycol (PEG) in the culture medium, both in the germination and early development in three species of Pleurothallidinae, proceeding from environments with different degrees of water availability. *Acianthera teres* is rupicolous while *Octomeria gracilis* and *O. crassifolia* are epiphytes in forests, but the first occur in moist and the second in more exposed locations. Seeds were sown on MS/2 germinating medium under four treatments: control, with 50 g.L⁻¹, 100 g.L⁻¹ and 200 g.L⁻¹ of PEG, inducing water potentials of -0.53, -0.70, -0.86 and -1.60 MPa, respectively. Observations were carried out at 45, 120 and 180 days. In *A. teres*, the lower the water potential of the medium, the lower the germination rate, and the greater the delay in the development. In *O. crassifolia*, the lower the water potential of the medium, the higher the rate of germination. *O. gracilis* showed some tolerance to reduced water potential up to 120 days.

Keywords: Epidendroideae, water stress, orchids, PEG.

INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae Juss. e a subtribo Pleurothallidinae Lindl.

Orchidaceae é a maior família de monocotiledôneas, sendo constituída por cerca de 24.500 espécies (Dressler 2005), distribuídas em cerca de 800 gêneros (Dressler 1993), e pertencendo à ordem Asparagales (APG 2008). Tem distribuição cosmopolita, com exceção da região Antártica, sendo mais abundante e diversificada nas regiões tropicais. No Brasil, estima-se que o número de espécies seja aproximadamente 3.000 (Barros 1999).

A família inclui plantas herbáceas perenes, terrestres, epífitas, rupícolas, saxícolas ou, mais raramente, micoheterotróficas. As raízes das Orchidaceae são fasciculadas, possuem associação com fungos (micorriza), e em inúmeras espécies, principalmente as epífitas, possuem externamente uma ou mais camadas de células suberificadas e mortas, constituindo o que é denominado velame, cuja função está associada à proteção mecânica, redução da perda de água e absorção de água e nutrientes.

Quanto à forma de crescimento, as Orchidaceae podem ser monopodiais ou simpodiais (figura 1a, b). As plantas monopodiais crescem sempre a partir de uma única gema apical, possuindo crescimento indeterminado. Já as plantas simpodiais crescem a partir de gemas laterais, sendo que cada gema se desenvolve durante certo período, formando um simpódio, e quando o desenvolvimento dessa gema cessa ou diminui, outra gema lateral passa a se desenvolver, e assim sucessivamente. Nas plantas com crescimento simpodial, o caule geralmente é dividido em rizoma e cauloma (também chamado na literatura de caule secundário e ramicaule); este último pode ser delgado ou espessado, neste caso recebendo o nome de pseudobulbo.

As flores das orquídeas (figura 2a, b) são trímeras, geralmente zigomorfas, raramente assimétricas, monoclinas, raramente diclinas; as três sépalas são livres ou unidas entre si em vários níveis; possuem três pétalas, sendo que duas são semelhantes entre si e a terceira, geralmente aquela oposta ao estame fértil, é diferenciada das demais quanto à forma e/ou coloração, recebendo o nome de labelo. A maioria das espécies possui apenas um estame fértil, mas podem ocorrer dois ou três; o filete é condescido com o estilete formando o ginostêmio ou coluna (figura 2c, d, e). A antera fértil geralmente tem a forma de capuz, em cujo interior ficam alojados os grãos de pólen. Na maioria das espécies os grãos de pólen formam massas aglutinadas, denominadas polínias (figura 2f), que podem ser nuas ou possuir apêndices (caudícula, estipe e/ou viscidio) e cuja textura é variável na família. O conjunto das polínias e seus apêndices é chamado polinário. O estigma, na maioria das espécies, constitui uma cavidade (cavidade estigmática), porém um dos lobos é modificado em rostelo, uma estrutura geralmente laminar que impede o contato do pólen com o estigma. O ovário é ínfero,

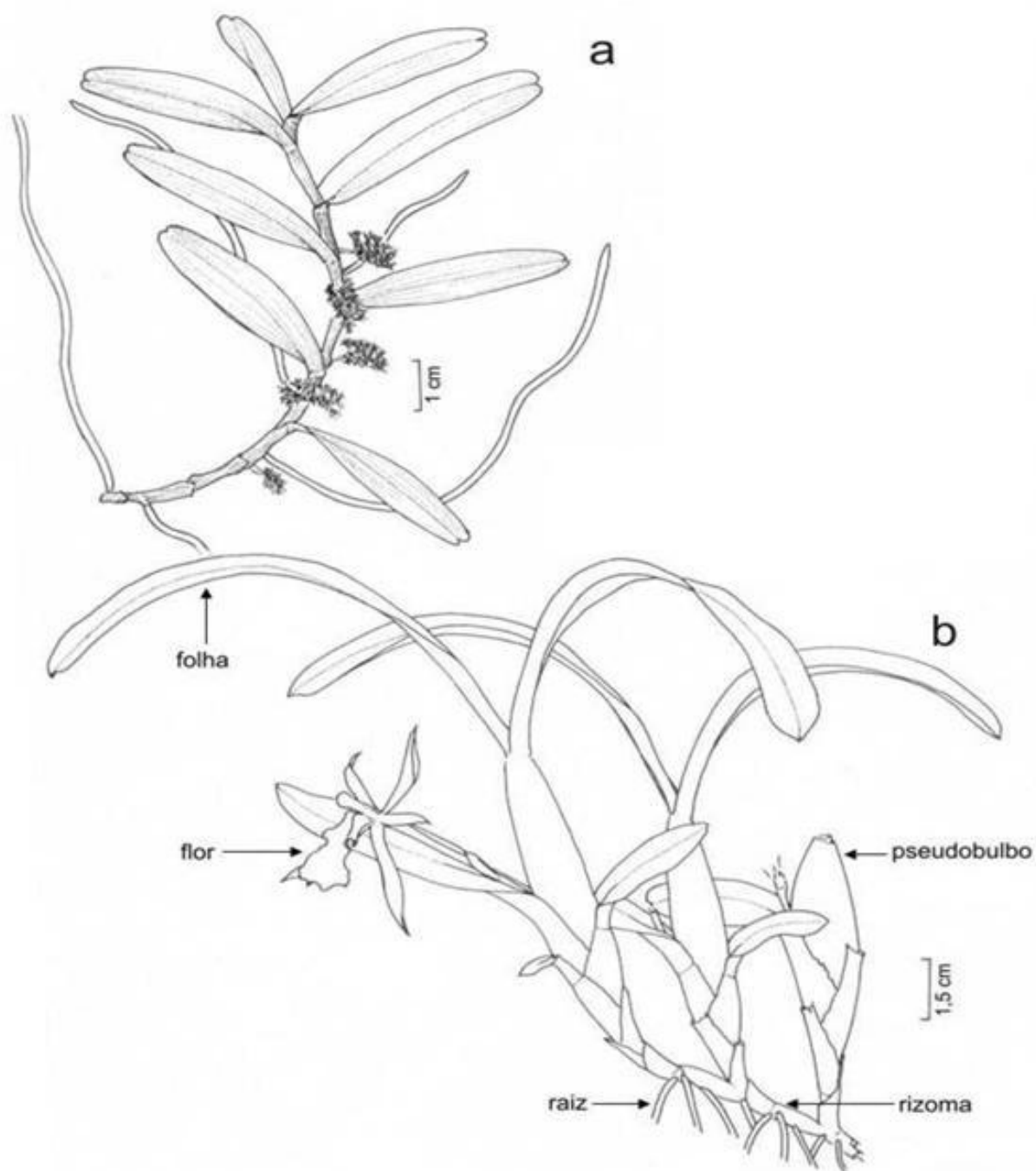


Figura 1: Tipos de crescimento em orquídeas. A: Crescimento monopodial em *Campylocentrum* sp. B: Crescimento simpodial em *Aspasia* sp. (Adaptado de Pinheiro *et al.* 2004).

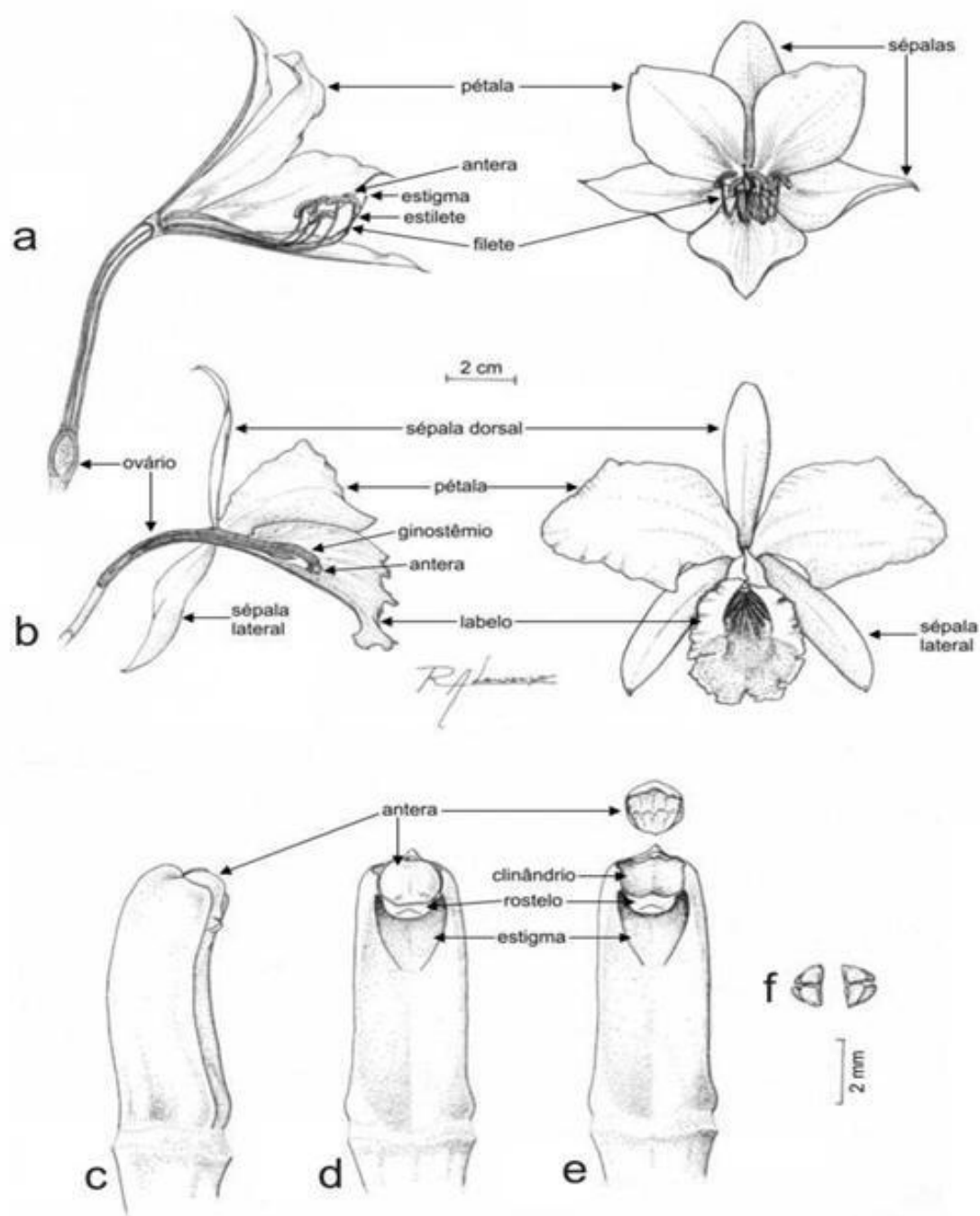


Figura 2: A-B: Comparação da estrutura de uma flor típica de monocotiledônea com uma flor de orquídea. A: Flor de uma espécie de Amaryllidaceae (*Crinum* sp.); B: Flor de uma espécie de Orchidaceae (*Cattleya* sp.). C-E: Estrutura de um ginostêmio típico de uma orquídea (*Hadrolaelia caulescens*). C: Vista lateral; D: Vista ventral; E: Vista ventral após a retirada da antera e das polínias. F: Polínias retiradas da antera. (Adaptado de Pinheiro *et al.* 2004).

tricarpetal, geralmente unilocular, com numerosos óvulos que quase sempre só completam seu desenvolvimento após a polinização. O fruto é considerado do tipo cápsula, sendo na maioria das espécies deiscente em uma a três valvas longitudinais, com grande número de sementes. As sementes são minúsculas (10 µm a 6 mm de comprimento), leves, sem endosperma, sendo que a epiderme unisseriada do integumento externo, na maturidade da semente, forma uma testa ao redor do embrião rudimentar. A forma da semente geralmente varia de oval a elipsóide (Pridgeon *et al.* 1999).

Os sistemas de classificação mais recentes para Orchidaceae são os de Dressler (1993), Szlachetko (1995) e Pridgeon *et al.* (1999). Os dois primeiros baseiam-se principalmente em características morfológicas. Dressler (1993) considera cinco subfamílias em Orchidaceae: Apostasioideae, Cyripedioideae, Orchidoideae, Spiranthoideae e Epidendroideae. Já Szlachetko (1995) considera as orquídeas como uma ordem (Orchidales), composta por três famílias: Apostasiaceae, Cyripediaceae e Orchidaceae, esta última com oito subfamílias. O sistema de Pridgeon *et al.* (1999), por sua vez, baseia-se principalmente em dados moleculares, e considera cinco subfamílias para Orchidaceae: Apostasioideae, Cyripedioideae, Orchidoideae, Vanilloideae e Epidendroideae. O sistema de Pridgeon e colaboradores foi publicado em cinco volumes (Pridgeon *et al.* 1999, 2001, 2003, 2005 e 2009), sendo que a subtribo Pleurothallidinae foi tratada no quarto volume, como parte da subfamília Epidendroideae.

Epidendroideae é constituída principalmente por plantas epífitas, mas também inclui espécies terrícolas, rupícolas, palustres, aquáticas e mais raramente micoheterotróficas. É caracterizada por possuir inflorescência lateral ou terminal, um único estame fértil, e duas, quatro, seis ou oito polínias, geralmente com apêndices. O ginostêmio pode apresentar um pé em sua base. Na maioria das espécies, a antera, que no botão floral apresenta-se ereta, curva-se gradativamente para baixo durante seu desenvolvimento, tornando-se incumbente. Apresenta distribuição cosmopolita e é a maior subfamília de Orchidaceae, com cerca de 18.000 espécies em 650 gêneros. Inclui 16 tribos, sendo Epidendreae a maior delas (Pridgeon *et al.* 2005).

A tribo Epidendreae (subfamília Epidendroideae) possui cerca de 5.870 espécies, que ocorrem exclusivamente no Novo Mundo (Pridgeon *et al.* 2005). É constituída por plantas epífitas, rupícolas, terrestres e, mais raramente, micoheterotróficas. As raízes possuem velame, o caule geralmente tem vários nós, a inflorescência pode ser terminal ou lateral, o labelo pode ser livre ou unido à coluna em vários níveis, e podem ocorrer 2, 4, 6 ou 8 polínias, achatadas, ovóides ou clavadas, com caudícula. É dividida em seis subtribos:

Bletiinae, Chysinae, Coeliinae, Laeliinae, Pleurothallidinae e Ponerinae (Pridgeon *et al.* 2005).

A subtribo Pleurothallidinae Lindl. *ex* G. Don abrange cerca de 4.100 espécies, distribuídas em 36 gêneros (Pridgeon *et al.* 2005). Ocorre dos Estados Unidos, no sul da Flórida, até o sul do Brasil e Argentina, sendo os Andes da Colômbia, Equador e Peru as regiões com maior riqueza de espécies (Pridgeon *et al.* 2005). É constituída por plantas terrestres, rupícolas ou epífitas, de crescimento simpodial. O rizoma pode ser inconspícuo ou longo. O cauloma não é espessado em pseudobulbo e, muitas vezes, possui um “annulus” ao redor do ponto de inserção da inflorescência; essa estrutura ocorre devido ao espessamento dos vasos condutores de seiva nessa região, de modo a formar um anel mais espesso na base da inflorescência. As folhas são conduplicadas, geralmente uma por cauloma, raramente muitas e, neste caso, dísticas, delgadas a carnosas e coriáceas, às vezes cilíndricas, pecioladas ou sésseis. A inflorescência pode ser lateral ou terminal, ereta ou pendente, uniflora ou multiflora, em racemo ou panícula, geralmente com uma pequena espata na base. As flores variam em tamanho, podendo ser ressupinadas ou não. As sépalas são semelhantes entre si, coalescentes em vários níveis, muitas vezes atenuadas e/ou com osmóforos. As pétalas geralmente são menores que as sépalas, às vezes espessas e com osmóforos. O labelo é fortemente unido ao ginostêmio ou articulado com ele. O ginostêmio geralmente possui um pé; a antera é apical e incumbente ou dorsal e ereta. As polínias são ovóides a clavadas, em número de 2, 4, 6 ou 8, nuas ou com caudícula, às vezes com viscidio pequeno. O estigma é inteiro ou bilobado. Uma das características principais da subtribo é o ovário articulado com o pedicelo, o que não ocorre em apenas três gêneros (*Dilomilis*, *Tomzania* e *Neocogniauxia*). A cápsula é esférica a cilíndrica. As sementes são amareladas ou castanhas, possuem de 150 a 300 µm (o que corresponde a duas ou três células) de comprimento e geralmente possuem escamas ou verrugas na superfície; as células da testa são de tamanhos similares e as paredes anticlinais são espessadas (Pridgeon *et al.* 2005).

A circunscrição dos gêneros em Pleurothallidinae tem se baseado tradicionalmente no número de polínias e outras características florais, como número de lobos dos estigma, ressupinação, nível de coalescência entre as sépalas, e a similaridade entre as peças do perianto (Luer 1986).

Pleurothallidinae possui grande quantidade de homoplasias, tanto nos caracteres vegetativos quanto nos florais, o que impede o reconhecimento de sinapomorfias, dificultando a análise filogenética da subtribo. Aparentemente existem duas sinapomorfias não moleculares em Pleurothallidinae: o “annulus” do caule é uma estrutura geralmente ausente nos gêneros mais basais e presente nos gêneros mais derivados com duas polínias (Pridgeon *et*

al. 2001); a outra sinapomorfia é a ocorrência de estômatos elevados e ciclocíticos nos gêneros *Dresslerella* e *Echinosepala*, os quais não são conhecidos em nenhuma outra Orchidaceae (Pridgeon *et al.* 2005). Um estudo filogenético realizado por Neyland *et al.* (1995) analisando 45 características morfológicas e anatômicas, indicou que *Pleurothallis* s.l. é um grupo polifilético.

Dois estudos filogenéticos sobre Pleurothallidinae foram realizados a partir de dados moleculares recentemente. O primeiro é o trabalho de Pridgeon *et al.* (2001), que envolveu mais de 180 táxons e considerou seqüências de DNA nuclear (nrITS) e plastidial (trnL, trnL-F e matK). O segundo, realizado por Pridgeon & Chase (2001), seguiu a mesma metodologia do estudo anterior, porém acrescentou às análises outras duas espécies: *Pleurothallis lappacea* Luer e *P. deregularis* (Barb. Rodr.) Luer. Ambos concluíram que o gênero *Pleurothallis* é polifilético, o que se deve especialmente a homoplasias principalmente florais. Pridgeon & Chase (2001), baseando-se nos resultados das análises moleculares, reestruturaram a subtribo, redefinindo principalmente o gênero *Pleurothallis sensu lato*, com a criação, restabelecimento ou redefinição de vários gêneros como *Acianthera*, *Anathallis*, *Specklinia*, *Andinia*, *Phloeophila*, *Anthereon*, *Diodonopsis* e *Echinella*, e sinonimização de outros gêneros como *Acostaea*, *Apatostelis*, *Barbrodia*, *Condylago*, *Jostia*, *Luerella*, *Ophidion*, *Restrepiopsis* e *Salpistele*. Merece destaque a inclusão de *Dilomilis*, *Neocogniauxia* e *Tomzania* em Pleurothallidinae. Os dois primeiros haviam sido tratados por Dressler (1993) na subtribo Laellinae, e o terceiro, segregado de *Dilomilis* por Nir (1997). Esta classificação foi utilizada por Pridgeon *et al.* (2005) para o tratamento da subtribo em seu sistema de classificação.

As espécies de Pleurothallidinae são ameaçadas principalmente pelo desmatamento, já que grande parte delas é epífita, e não pela coleta indiscriminada, pois este não é um grupo de grande interesse econômico entre as Orchidaceae. Porém, nas últimas décadas, algumas espécies têm atraído os colecionadores e o público em geral, geralmente espécies de maior porte e flores mais coloridas e vistosas, com nos gêneros *Dracula* e *Masdevallia* (Pridgeon *et al.* 2005).

Germinação e desenvolvimento inicial em Orchidaceae

A semente em Orchidaceae tem uma estrutura bastante uniforme, com exceção de alguns grupos, como *Vanilla*: é constituída por uma testa, que é uma camada de células mortas, que reveste o embrião e, este, em sementes maduras, é uma massa de células histologicamente diferenciadas em três tecidos, uma epiderme unisseriada, um grupo de

células pequenas que constituem o meristema apical, e células parenquimáticas (Batygina *et al.* 2003). Apesar dessa diferenciação histológica, morfologicamente o embrião aparenta ser apenas uma massa indiferenciada, sem estruturas visíveis.

Por não conter reservas, a germinação das sementes de orquídeas na natureza ocorre somente após a infecção por um fungo, o que não acontece na germinação *in vitro*, na qual se baseia a maioria dos trabalhos sobre germinação. Entretanto, comparações entre as plântulas desenvolvidas nas duas condições sugerem que os resultados obtidos *in vitro* são válidos e representativos (Arditti & Ernst 1984).

O primeiro passo para a germinação de sementes é a embebição, ou seja, a entrada de água, que ocorre passivamente, devido à diferença de potencial hídrico entre a semente e o meio, uma vez que o fluxo da água ocorre do potencial hídrico mais alto para o mais baixo. Em orquídeas, essa embebição pode ser difícil, uma vez que a superfície das sementes geralmente possui ornamentações, que facilitam sua dispersão pelo vento e pela água, favorecendo a flutuabilidade, mas que dificultam a penetração da água (Arditti 1990). O rompimento da testa por meios mecânicos ou por ação de microorganismos, pode ser a solução desse problema, porém não há estudos que esclareçam esse aspecto (Arditti 1990).

Em Orchidaceae, as sementes apresentam, geralmente, um padrão bastante uniforme de germinação e desenvolvimento inicial: inicia-se com o intumescimento da semente, provocando o rompimento da testa e a liberação do embrião (Kraus *et al.* 2006), que se desenvolve em uma estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, chamada protocormo ou plântula (Arditti 1992). O protocormo é constituído por células parenquimáticas, revestidas pela epiderme (Kraus *et al.* 2006).

O protocormo precisa de uma fonte de carboidratos para que ocorra a formação da gema vegetativa. Na natureza, o carboidrato é fornecido por um fungo micorrizógeno, e na germinação *in vitro*, é obtido diretamente do meio de cultura (Harrison 1977). Várias espécies se desenvolvem bem com manitol, glicose e frutose no meio de cultura, porém a sacarose apresenta bons resultados para a grande maioria das espécies e suporta a autoclavagem, e por isso é mais utilizada em meios de cultura (Arditti & Ernst 1984). O desenvolvimento do protocormo *in vitro* geralmente é mais rápido que em condições naturais (Kraus *et al.* 2006).

Alguns dias após a inoculação, o embrião torna-se clorofilado. Em estudos com *Cattleya aurantiaca* (Harrison 1977, Harrison & Arditti 1978), a presença de clorofila foi detectada após 15 dias de cultura, em protocormos cultivados em meio Knudson C (Knudson 1946) com sacarose. Na ausência de sacarose, esse tempo aumentou para 25 dias. A capacidade fotossintética está diretamente associada à presença da enzima ribulose 1,5-

bifosfato carboxilase (RuBPCase), cuja síntese requer uma fonte exógena de energia que, no caso da cultura *in vitro*, é a sacarose (Harrison 1977, Harrison & Arditti 1978).

Em um período variável de espécie para espécie, o protocormo desenvolve, na porção superior, uma região meristemática e, geralmente, na porção inferior, tricomas uni ou pluricelulares, chamados de rizóides, com função de fixação e absorção (Cribb 1999, Kraus *et al.* 2006).

O meristema caulinar apical origina, lateralmente a ele, os primórdios foliares. Existe uma discussão em torno da natureza e da terminologia adequada para o primeiro órgão foliáceo em Orchidaceae: alguns autores, como Velenowsky (1907 *apud* Nishimura 1981), consideram esse órgão como um cotilédone, e somente o segundo órgão a surgir seria a folha propriamente dita; já Veyret (1974) e Batygina *et al.* (2003) consideram essa primeira estrutura uma folha. Diante da falta de um estudo ontogenético que poderia definir a natureza do órgão, considera-se mais adequado o uso do termo “estrutura semelhante à folha” para referir-se ao primeiro órgão foliáceo (Kraus *et al.* 2006).

Após o desenvolvimento de duas ou mais folhas, forma-se a primeira raiz, na porção superior ou mediana do protocormo, originada do tecido caulinar, considerada por alguns autores como raiz adventícia. O tecido parenquimático entra em degeneração. Esse processo e a presença de raiz marcam o término do estágio de protocormo, segundo Alvarez & Sagawa (1965).

Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo geral avaliar possíveis variações morfológicas das sementes de orquídeas da subtribo Pleurothallidinae e a influência de diferentes déficits hídricos na germinação e desenvolvimento inicial destas sementes. A partir deste, os objetivos específicos foram:

- Realizar um estudo sobre a morfologia das sementes de espécies selecionadas de Pleurothallidinae, ampliando o conhecimento da subtribo, gerando dados que possam ajudar a resolver problemas taxonômicos e que possam corroborar dados moleculares, auxiliando no estudo filogenético do grupo;
- observar a influência do estresse hídrico simulado por adição de polietilenoglicol (PEG) no meio de cultura, na germinação e no desenvolvimento inicial de sementes de algumas espécies de Pleurothallidinae, provenientes de ambientes com diferentes graus de disponibilidades de água;

- caso sejam constatadas diferenças morfológicas entre diferentes grupos estudados, analisar se há alguma relação entre os comportamentos germinativos decorrentes dos diferentes níveis de tolerância ao déficit hídrico e os tipos morfológicos encontrados.

Literatura citada

- Alvarez, M.R. & Sagawa, Y.** 1965. A histochemical study of embryo development in *Vanda* (Orchidaceae). *Caryologia* 18: 251-261.
- APG.** 2008. Angiosperm Phylogeny Group. www.mobot.org/MOBOT/Research/Apiweb. (acesso em 13/03/2010).
- Arditti, J.** 1990. Orchid biology: reviews and perspectives, v. 5. Timber Press, Portland.
- Arditti, J.** 1992. Fundamentals of orchid biology. John Wiley & Sons, New York.
- Arditti, J. & Ernst, R.** 1984. Physiology of germinating orchid seeds. In: J. Arditti (ed.). Orchid biology: reviews and perspectives, v. 3. Cornell University Press, Ithaca, pp. 178-222.
- Barros, F.** 1999. Tendências e pendências na sistemática de Orchidaceae no Brasil. In: 50º Congresso Nacional de Botânica: Programa e Resumos. Sociedade Botânica do Brasil, Blumenau, pp. 312-313.
- Batygina, T.B., Bragina, E.A. & Vasilyeva, V.E.** 2003. The reproductive system and germination in orchids. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 45: 21-34.
- Cribb, P.J.** 1999. Morphology. In: A.M. Pridgeon, P.J. Cribb, M.W. Chase & F.N. Rasmussen (eds.). *Genera Orchidacearum*, v. 1. Oxford University Press, New York, pp. 13-23.
- Dressler, R.L.** 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland.
- Dressler, R.L.** 2005. How many orchid species? *Selbyana* 26: 155-158.
- Harrison, C.R.** 1977. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* 138: 41-45.
- Harrison, C.R. & Arditti, J.** 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* 139: 180-189.
- Knudson, L.** 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American*

Orchid Society Bulletin 15: 214-217.

- Kraus, J.E., Kerbaudy, G.B. & Monteiro, W.R.** 2006. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb.f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. *Hoehnea* 33: 177-184.
- Luer, C.A.** 1986. Icones Pleurothallidinarum I. Systematics of the Pleurothallidinae (Orchidaceae). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 15. Missouri Botanical Garden, St. Louis.
- Neyland, R., Urbatsch, L. & Pridgeon, A.M.** 1995. A phylogenetic analysis of subtribe Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 117: 13-28.
- Nir, M.A.** 1997. The genera *Dilomilis* Raf. and *Tomzanonia* gen. nov. *Lindleyana* 12: 180-187.
- Nishimura, G.** 1981. Comparative morphology of *Cattleya* and *Phalaenopsis* (Orchidaceae) seedlings. *Botanical Gazette* 142: 306-365.
- Pinheiro, F., Barros, F. & Lourenço, R.A.** 2004. O que é uma orquídea? In: F. Barros & G.B. Kerbaudy (orgs.) *Orquidologia sul-americana: uma compilação científica*. Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, pp. 11-33.
- Pridgeon, A.M. & Chase, M.W.** 2001. A phylogenetic reclassification of Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Lindleyana* 16(4): 235-271.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 1999. *Genera Orchidacearum*, v. 1. Oxford University Press, New York.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 2001. *Genera Orchidacearum*, v. 2. Oxford University Press, New York.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 2003. *Genera Orchidacearum*, v. 3. Oxford University Press, New York.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 2005. *Genera Orchidacearum*, v. 4. Oxford University Press, New York.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 2009. *Genera Orchidacearum*, v. 5. Oxford University Press, New York.
- Pridgeon, A.M., Solano, R. & Chase, M.W.** 2001. Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* 88: 2286-2308.
- Szlachetko, D.L.** 1995. *Systema Orchidacearum*. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.

Veyret, Y. 1974. Development of the embryo and young seedling stages of orchids. *In*: C.L. Withner (ed.). The orchids: scientific studies. John Wiley & Sons, New York, pp. 223-265.

**CAPÍTULO 1: MORFOLOGIA DAS SEMENTES EM
ESPÉCIES DE PLEUROTHALLIDINAE (ORCHIDACEAE)**

Resumo- (Morfologia das sementes em espécies de Pleurothallidinae (Orchidaceae)). As sementes de Orchidaceae geralmente são minúsculas e leves, sem endosperma, com uma testa ao redor do embrião, o qual é uma massa de células sem estruturas diferenciadas. Apesar da semelhança macroscópica, há grande variabilidade nas sementes de Orchidaceae quanto às características da semente em si, da testa e das células que a constituem. O estudo da morfologia das sementes pode ser uma das áreas mais promissoras para encontrar características filogeneticamente informativas. Foram analisadas 24 espécies de 12 gêneros de Pleurothallidinae, utilizando microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Concluiu-se que várias das espécies analisadas possuem ornamentações nas paredes das células da testa, uma característica comum em Epidendroideae, porém, não foram encontradas características informativas para a delimitação de gêneros, já que muitas características se conservam dentro da subtribo.

Palavras-chave: Epidendroideae, microscopia eletrônica de varredura, orquídeas.

Abstract- (Seed morphology in species of Pleurothallidinae (Orchidaceae)). Orchidaceae seeds are tiny and light, without endosperm, with a testa around the embryo, which is a mass of cells without differentiated structures. Despite the macroscopic similarity, there is a large variability in the seeds of orchids, regarding the characteristics of the seed itself, the testa and the testa cells. The study of the morphology of seeds can be one of the most promising areas to find phylogenetically informative features. We analyzed 24 species of 12 genera of Pleurothallidinae using optical microscopy and scanning electron microscopy. Several of the species studied have ornamentations on the walls of the testa cells, a common feature in the Epidendroideae subfamily, however, informative features for the delimitation of genera were not found, because many of the features also occur within the whole subtribe.

Keywords: Epidendroideae, scanning electron microscopy, orchids.

Introdução

Segundo Yam & Arditti (2009) o tamanho reduzido das sementes de orquídeas fez com que elas permanecessem desconhecidas ou ignoradas por muito tempo, tendo sido descritas e ilustradas primeiramente por Conrad Gesner no século XVI, porém esses dados foram publicados somente em 1751 por Christopher Jacob Trew, no livro *Opera Botânica*. A primeira publicação que faz referência às sementes é o *Herbarium Amboinense*, escrito por Georgius Everhadus Rumphius e publicado por Joannes Burman entre 1741 e 1750, meio século após a morte do autor. As primeiras ilustrações de sementes com indicação de tamanho foram feitas por artistas espanhóis da expedição científica a Nova Granada, atual Colômbia, realizada entre 1783 e 1816; tais ilustrações só foram utilizadas em publicações no século XX. O primeiro trabalho com ilustrações coloridas, de grande importância artística e botânica, foi o livro *Beiräge zur Morphologie und Biologie der Familie der Orchideen*, de Beer, publicado em 1863, obra que traz ilustrações detalhadas de frutos, sementes e plântulas de várias espécies.

As sementes de Orchidaceae são minúsculas (geralmente variando de 0,15 a 6 mm de comprimento) e leves, sem endosperma, com uma testa ao redor do embrião, o qual é uma massa de células, sem estruturas diferenciadas (Pridgeon *et al.* 1999). A forma da semente geralmente varia de oval a elipsóide (Pridgeon *et al.* 1999).

A testa da semente madura é geralmente constituída de uma única camada de células, originada da epiderme unisseriada do integumento externo, aberta na extremidade micropilar e fechada na extremidade chalazal. As células da testa perdem seu conteúdo no último estágio de desenvolvimento da semente (Ziegler 1981), e podem ser de várias formas, mas geralmente obedecem a alguns padrões básicos: por exemplo, as células da extremidade chalazal são menores que aquelas da região micropilar. As paredes das células podem ser delgadas ou desenvolver alguns espessamentos lignificados (Jeeji & Ansari 1994).

Em Epidendroideae, subfamília à qual pertencem as Pleurothallidinae, ocorrem sementes dos mais variados tamanhos e formas, sendo as formas mais comuns a fusiforme e a oblonga; sementes filiformes também são freqüentes. As zonas de adesão entre células da testa geralmente são cobertas por uma camada membranosa. Uma das características mais notáveis da testa da semente de Epidendroideae é a ornamentação da parede celular, que pode ser formada do material da própria parede ou de depósito cuticular. Podem ocorrer estruturas espinescentes, reticulações, perfurações, proeminências ou outras formações na superfície (Chase & Pippen 1990).

Apesar da semelhança macroscópica, há grande variabilidade nas sementes de Orchidaceae. As variações ocorrem, sobretudo, quanto a: (a) tamanho, forma e dureza da semente; (b) tamanho, forma, número e arranjo das células que constituem a testa; (c) características das células da testa, suas zonas de adesão e esculturas constituídas por material da parede celular e material cuticular ou depósitos cerosos (Pridgeon *et al.* 1999). A forma da semente e das projeções da testa pode afetar a flutuabilidade, a aderência às superfícies ou a absorção de umidade (Pridgeon *et al.* 1999). As células da testa, em muitos casos, guardam espaços entre elas, os quais podem facilitar a entrada de fungos micorrizógenos, necessários para manter o desenvolvimento do embrião, uma vez iniciada a germinação (Pridgeon *et al.* 1999).

Características das paredes celulares podem ser úteis para diferenciação em níveis taxonômicos mais altos. É o caso da camada cuticular que encobre as zonas de adesão entre as células da testa, que é uma sinapomorfia das Orchidaceae monandras, embora possa ser reduzida ou perdida por membros de grupos-irmãos (Chase & Pippen 1988). Em alguns casos, características da semente indicam afinidades filogenéticas em grupos de difícil entendimento. É o caso do gênero *Tropidia*, tratado anteriormente em Spiranthoideae e atualmente em Epidendroideae, no qual a presença de uma cobertura cuticular indica afinidade com Epidendroideae, o que foi confirmado por dados moleculares (Pridgeon *et al.* 1999).

Um dos estudos mais amplos sobre o assunto é a tese de Ziegler (1981), porém seus resultados não foram publicados. Porém Dressler (1993) utilizou as informações de Ziegler, com modificações, reconheceu e descreveu 21 tipos de sementes. Jeeja & Ansari (1994), que analisaram 82 espécies de orquídeas e consideraram oito tipos morfológicos de sementes, que se diferenciam principalmente por características das células da testa e pela forma e tamanho do embrião.

Uma contribuição importante para o conhecimento da morfologia de sementes em Orchidaceae é o trabalho de Cameron & Chase (1998), com espécies de Vanilloideae. As espécies desta subfamília apresentam morfologia da semente bastante variada, como não observada até o momento em nenhum outro grupo de orquídeas, e vão desde sementes típicas (minúsculas, com testa unisseriada), encontradas na subtribo Pogoniinae, com extensões semelhantes a braços e sem espaço de ar entre o embrião e a testa (Lecanorchidinae), sementes aladas em Galeolinae, até altamente variável em Vanillinae (como a testa multisseriada), inclusive diferenciando gêneros dentro desta subtribo.

Na literatura também são encontrados trabalhos sobre morfologia de sementes da subfamília Orchidoideae, como Tohda (1983) que analisou 27 espécies dos gêneros

Dactylorchis, *Orchis*, *Ponerorchis*, *Chondradenia* e *Galeorchis*, e concluiu que estes gêneros podem ser delimitados pelo número de células da testa no maior comprimento e maior largura, comprimento da semente e das células da testa. Tohda (1985) estudou cinco subtribos de Cranichideae (Goodyerinae, Corymbidinae, Spiranthinae, Cranichidinae e Cryptostylidinae) e observou considerável diversidade morfológica nas sementes da subtribo, e encontrou características informativas para delimitar as subtribos, como comprimento da semente, número de células da testa no maior comprimento e forma da semente. Aybeke (2007) analisou sementes de oito espécies do gênero *Ophrys* e concluiu que estas espécies podem ser diferenciadas principalmente por características das reticulações presentes sobre as células da testa.

Com relação à subfamília Epidendroideae, destacam-se os trabalhos de Tohda (1986), Chase & Pippen (1988), Chase & Pippen (1990) e Tsutsumi *et al.* (2007). Tohda (1986) analisou sementes de espécies de sete gêneros das subtribos Limodorinae e Listerinae (tribo Neottieae) e encontrou variações principalmente quanto à forma da semente e ornamentação das células da testa, que permitem diferenciar gêneros dentro de cada subtribo. Chase & Pippen (1988), estudou Oncidiinae e subtribos relacionadas, e encontrou as maiores variações quanto a ornamentação das paredes anticlinais das células da testa e duas diferentes formas de extensões das células da testa, além de outras variações mais sutis. Tais variações são significativas a nível genérico. Toscano de Brito (1999) examinou sementes de 19 espécies das subtribos Ornithocephalinae e Telipogoninae (Maxillarieae) e encontrou semelhanças entre a maioria das espécies, mas também encontrou grandes variações, como a presença de extensões semelhantes a ganchos nas paredes anticlinais das células da testa em algumas espécies de *Phymatidium*. Tsutsumi *et al.* (2007) estudaram 16 espécies de *Liparis* do Japão e relacionaram o tamanho do embrião e o espaço de ar dentro da semente com o hábito da planta. Até o presente momento não foi realizado nenhum estudo sobre morfologia de sementes em Pleurothallidinae.

A maior parte dos estudos de morfologia de sementes de orquídeas realizada usa tipos já estabelecidos para descrever as sementes, porém segundo Pridgeon *et al.* (1999), essa prática não é recomendada, pois eles generalizam e podem esconder variações, e são as características que são usadas em análises filogenéticas, e não os tipos.

O estudo dos detalhes da parede celular das células da testa das sementes de Orchidaceae pode ser uma das áreas mais promissoras para encontrar características filogeneticamente informativas (Pridgeon *et al.* 1999). As ferramentas mais adequadas para esse tipo de estudo são a microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo sobre a morfologia das sementes de espécies selecionadas de Pleurothallidinae, aspecto não registrado para a subtribo, ampliando o conhecimento sobre o grupo, gerando dados potencialmente úteis na resolução de problemas taxonômicos e que possam corroborar dados moleculares, auxiliando em estudos filogenéticos.

Material e Métodos

Foram analisadas sementes de 24 espécies de 12 gêneros, ou seja, 1/3 dos gêneros da subtribo. Foram estudados os gêneros com maior representatividade no Brasil. Tais sementes foram obtidas, por polinização manual ou natural, de plantas vivas provenientes da coleção do Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado. Uma amostra de cada exemplar foi posteriormente herborizada para inclusão de material testemunha (tabela 1) no Herbário do Estado “Maria Eneyda P. Kauffman Fidalgo” (SP). Também foram coletados frutos de material herborizado, nos casos em que não havia nenhum indivíduo da espécie na coleção viva. A identificação do material foi feita a partir de literatura especializada, como floras e revisões, e comparação com material de herbário previamente identificado.

Nas análises sob microscopia óptica (MO), as sementes foram preparadas usando o método do tetrazólio (Lakon 1949) para observação e medida do embrião: as sementes foram postas para embeber em água por alguns minutos e colocadas em solução aquosa de cloreto de 2, 3, 5 trifenil-tetrazólio, por três dias, à temperatura de cerca de 30 °C. As sementes foram, então, depositadas em lâmina provisória e fotografadas ao microscópio óptico. Foram analisadas dez sementes de cada espécie. Foram observadas as formas da semente e do embrião, medidos comprimento e largura de ambos, calculados média e desvio padrão de cada característica, e outras informações relevantes.

Para as observações sob microscopia eletrônica de varredura (MEV), as sementes foram secas em estufa a cerca de 30 °C por dois a três dias. O porta-objeto metálico (“stub”) do microscópio eletrônico de varredura foi recoberto com fita adesiva de carbono, dupla face. As sementes então foram colocadas sobre o “stub”, e metalizadas com ouro puro. Posteriormente, foram fotografadas, sendo observados o número de células no maior comprimento e na maior largura, a ornamentação da superfície das paredes anticlinais e periclinais, assim como a junção entre paredes celulares de células adjacentes.

As descrições da forma das sementes e células foram feitas usando-se como padrão o trabalho de Radford *et al.* (1974).

A listagem do material estudado e respectivos números de registro na coleção viva e material testemunha, é apresentada na tabela 1.

Tabela 1: Material examinado, indicando o registro em coleções científicas e a realização de análise em microscopia óptica (MO) e em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Espécie	Número de registro na coleção viva do Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado	Material testemunha	MO	MEV
<i>Acianthera cryptophoranthoides</i> (Loefgr.) F. Barros	—	A.C. Brade 17149 (RB)		X
<i>Acianthera micrantha</i> (Barb.Rodr.) Pridgeon & M.W.Chase	—	V.T. Rodrigues & F. Vinhos 21 (SP)		X
<i>Acianthera ochreatea</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase	13583 15654	A.P.P. Barbero 51 (SP) F. Barros s.n. (SP 401824)	X	X
<i>Acianthera recurva</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase	3668D 3688D	F. Barros s.n. (SP 401875) A.P.P. Barbero 49 (SP)	X	X
<i>Acianthera saundersiana</i> (Rchb. f.) Pridgeon & M.W. Chase	E134 E133 16352 —	A.P.P. Barbero 54 (SP) A.P.P. Barbero 55 (SP) A.P.P. Barbero 56 (SP) V.T. Rodrigues & F. Vinhos s.n. (SP)	X	X
<i>Acianthera teres</i> (Lindl.) Luer	P1278	L.R.S. Guimarães & T.L. Laitano 54 (SP)	X	X
<i>Anathallis linearifolia</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase	A 1724 1902 2401	F. Barros s.n. (SP 401888) F. Barros s.n. (SP 401880) F. Barros s.n. (SP 401877)		X
<i>Anathallis obovata</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase	6518 12423 14959	F. Barros s.n. (SP 401869) F. Barros s.n. (SP) F. Barros s.n. (SP 401829)	X	X

Espécie	Número de registro na coleção viva do Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado	Material testemunha	MO	MEV
<i>Anathallis sclerophylla</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase	11795 14997 17995	<i>F. Barros s.n.</i> (SP 401861) <i>F. Barros s.n.</i> (SP 401827) <i>R.P. Romanini</i> 282 (SP)	X	X
<i>Dryadella edwallii</i> (Cogn.) Luer	18359	<i>T.L. Laitano</i> 27 (SP)	X	X
<i>Masdevalia infracta</i> Lindl.	17529	<i>A.P.P. Barbero</i> 57 (SP)	X	X
<i>Myoxanthus lonchophyllus</i> (Barb. Rodr.) Luer	10563 10569	<i>A.P.P. Barbero</i> 52 (SP) <i>A.P.P. Barbero</i> 53 (SP)	X	X
<i>Octomeria crassifolia</i> Lindl.	3766 10203D 12849	<i>F. Barros s.n.</i> (SP 401874) <i>F. Barros s.n.</i> (SP 401865) <i>F. Barros s.n.</i> (SP 401845)	X	X
<i>Octomeria gracilis</i> Lood. ex Lindl.	1032 1905 1908 4994	<i>A.P.P. Barbero</i> 62 (SP) <i>A.P.P. Barbero</i> 61 (SP) <i>A.P.P. Barbero</i> 60 (SP) <i>A.P.P. Barbero</i> 59 (SP)	X	X
<i>Octomeria grandiflora</i> Lindl.	5938 10373 12696 12844	<i>F. Barros s.n.</i> (SP 401793) <i>F. Barros s.n.</i> (SP 401864) <i>F. Barros s.n.</i> (SP 401848) <i>F. Barros s.n.</i> (SP 401846)	X	X
<i>Octomeria juncifolia</i> Barb. Rodr.	6167 14774	<i>A.P.P. Barbero</i> 48 (SP) <i>A.P.P. Barbero</i> 47 (SP)	X	X
<i>Pabstiella tripterantha</i> (Rchb. f.) F. Barros	16835	<i>A.P.P. Barbero</i> 68 (SP)	X	X
<i>Platystele</i> sp.	RL-4	<i>A.P.P. Barbero</i> 69 (SP)	X	X
<i>Pleurothallis ruscifolia</i> (Jacq.) R. Br.	13402	<i>F. Barros s.n.</i> (SP 401836)	X	X
<i>Specklinia grobyi</i> (Lindl.) F. Barros	A 856 4717 10560	<i>F. Barros s.n.</i> (SP 401887) <i>A.P.P. Barbero</i> 65 (SP) <i>A.P.P. Barbero</i> 66 (SP)	X	X
<i>Stelis deregularis</i> Barb. Rodr.	12434 14907	<i>F. Barros s.n.</i> (SP 401849) <i>F. Barros s.n.</i> (SP 401830)	X	X

Espécie	Número de registro na coleção viva do Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado	Material testemunha	MO	MEV
<i>Stelis hypnicola</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase	14995	<i>F. Barros s.n.</i> (SP 401828)	X	X
<i>Stelis</i> sp.	P1291	<i>L.R.S. Guimarães & T.L. Laitano 71</i> (SP)	X	X
<i>Zootrophion atropurpureum</i> (Lindl.) Luer	14998	<i>F. Barros s.n.</i> (SP 401826)	X	X

Resultados

Seguem, na seqüência, as descrições das sementes analisadas, por gênero e espécie:

1. *Acianthera* Scheidw.

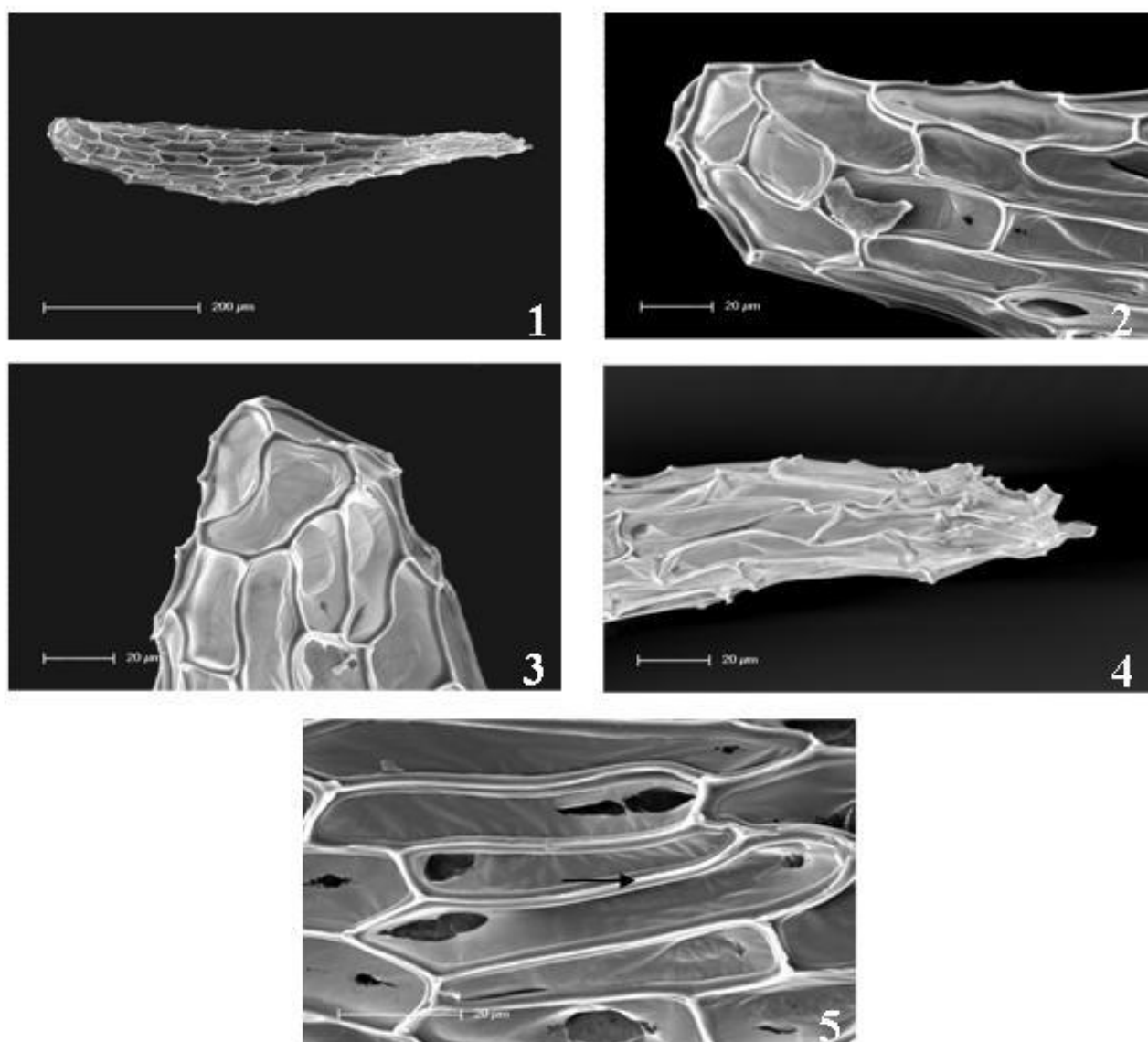
Sementes fusiformes ou clavadas. Extremidade chalazal fechada, extremidade micropilar aberta ou fechada. Células da testa lineares a oblongas, raro pentagonais ou hexagonais, 4 a 16 células de comprimento e 7 a 11 células de largura, com ou sem ornamentação sobre as células da testa. As zonas de adesão entre células adjacentes da testa não são visíveis. Embrião elipsóide, raro ovóide.

1.1. *Acianthera cryptophoranthoides* (Figuras 1 a 5)

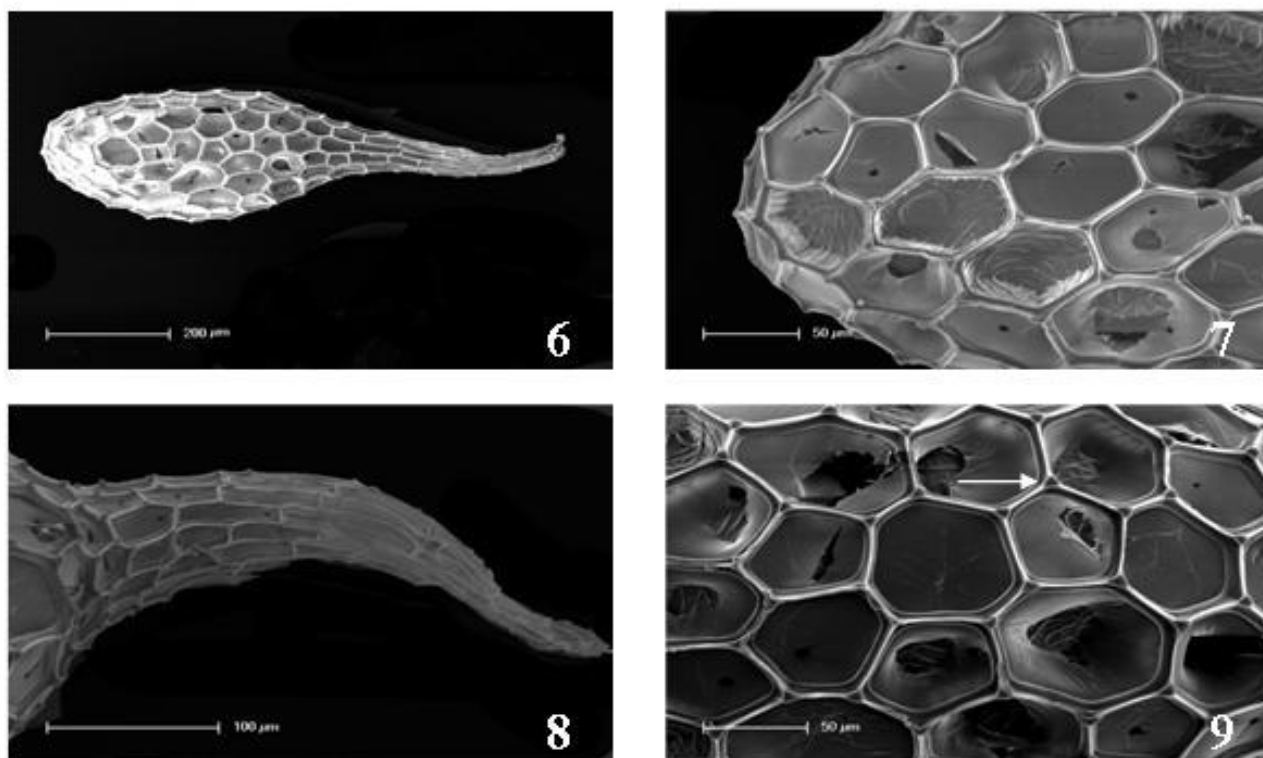
Semente fusiforme, $558 (\pm 78)$ μm de comprimento e $135 (\pm 18)$ μm na maior largura. Extremidades fechadas. Células da testa oblongas, de tamanho semelhante, cerca de 10 células de comprimento e 10 células de largura, sem ornamentações em sua superfície. As zonas de adesão entre as células da testa são protegidas por uma estrutura em relevo. O embrião não foi observado.

1.2. *Acianthera micrantha* (Figuras 6 a 9)

Semente largamente clavada, $838 (\pm 34)$ μm de comprimento e $312 (\pm 39)$ μm na maior largura. Extremidades fechadas. Células da testa pentagonais ou hexagonais na porção mais larga da semente, de tamanho semelhante entre si, células oblongas a estreitamente oblongas na porção mais estreita da semente, mais curtas próximo à zona de transição e mais longas próximo à extremidade chalazal, 14 a 16 células de comprimento e 7 a 8 células na maior largura, sem ornamentação. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo, mais espessa nas regiões de adesão entre três células, formando um triângulo em relevo. Embrião não observado.



Figuras 1-5. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Acianthera criptophoranthoides*. 1. Aspecto geral. 2. Extremidade micropilar. 3. Detalhe da extremidade micropilar. 4. Extremidade chalazal. 5. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando a estrutura em relevo que protege as zonas de adesão entre células adjacentes (seta). Escalas indicadas diretamente em cada figura.



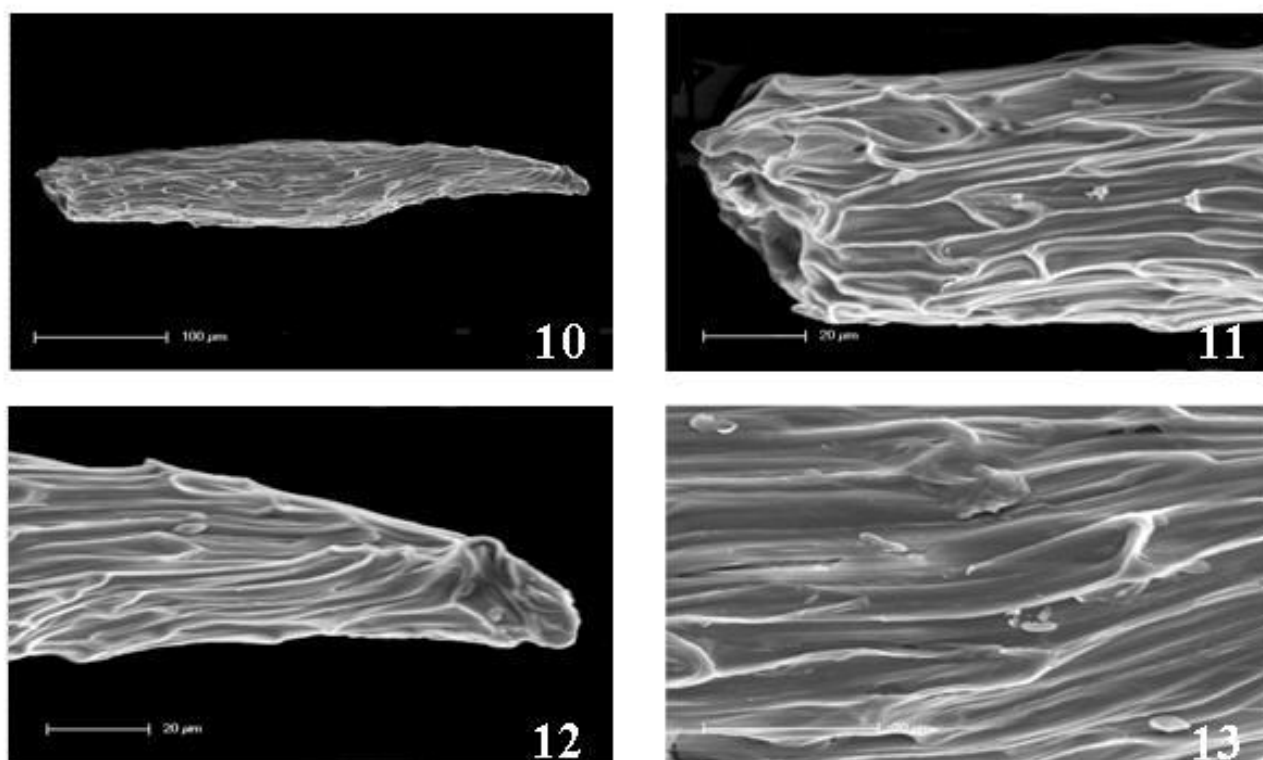
Figuras 6-9. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Acianthera micrantha*. 6. Aspecto geral. 7. Extremidade micropilar. 8. Extremidade chalazal. 9. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando o espessamento triangular (seta) sobre as zonas de adesão das paredes anticlinais. Escalas indicadas diretamente em cada figura.

1.3. *Acianthera ochreatea* (Figuras 10 a 13, 109)

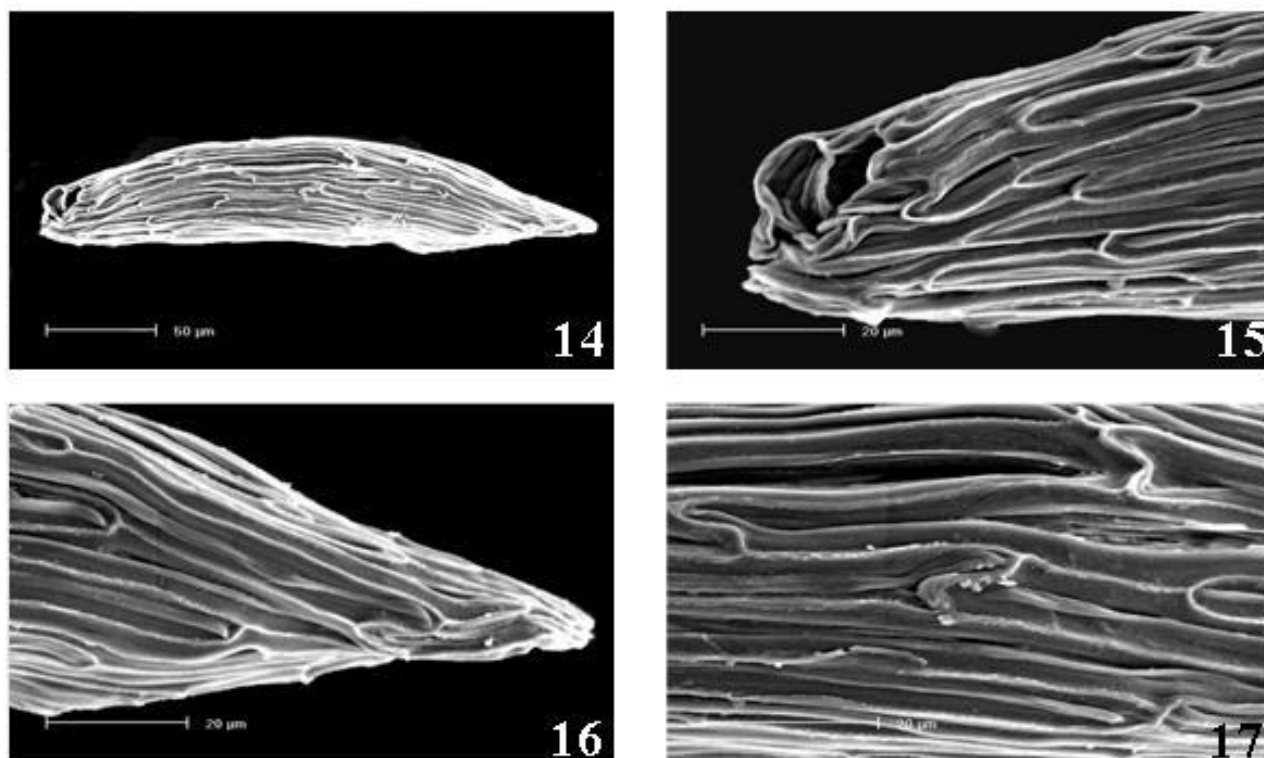
Semente levemente clavada ou fusiforme, $414 (\pm 63)$ μm de comprimento e $109 (\pm 16)$ μm na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa oblongas a lineares, cerca de 7 células de comprimento e 10 células de largura, sem ornamentações em sua superfície. As células da porção mediana são um pouco mais longas que as das extremidades, e se estendem por, no máximo, $1/4$ do comprimento da semente. As zonas de adesão não são claramente distintas. Embrião elipsóide, $166 (\pm 13)$ μm de comprimento e $90 (\pm 14)$ μm de largura; proporção embrião:semente = 0,406.

1.4. *Acianthera recurva* (Figuras 14 a 17, 110)

Semente fusiforme, $294 (\pm 23)$ μm de comprimento e $85 (\pm 3)$ μm na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa lineares, muito estreitas, cerca de 4 células de comprimento e ca. 10 células de largura, com pequenas verrugas sobre as paredes periclinais e anticlinais. As células da porção mediana são um pouco mais longas que as das extremidades, e se estendem por cerca de $1/3$ a $1/2$ do comprimento da semente. As zonas de adesão não são claramente distintas. Embrião elipsóide, $160 (\pm 18)$ μm de comprimento e $70 (\pm 4)$ μm de largura; proporção embrião:semente = 0,543.



Figuras 10-13. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Acianthera ochreatea*. 10. Aspecto geral. 11. Extremidade micropilar. 12. Extremidade chalazal. 13. Detalhe das células da região mediana da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.



Figuras 14-17. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Acianthera recurva*. 14. Aspecto geral. 15. Extremidade micropilar. 16. Extremidade chalazal. 17. Detalhe das células da região mediana da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.

1.5. *Acianthera saundersiana*

Foram identificados três tipos de sementes, que são aqui tratados como *Acianthera saundersiana* 1, *A. saundersiana* 2 e *A. saundersiana* 3. Existe uma discussão taxonômica em torno dessa espécie, e não há uma definição se *A. saundersiana* é uma espécie polimorfa ou se na verdade se trata de um complexo de espécies muito próximas.

a. *Acianthera saundersiana* 1 (Figuras 18 a 22, 111)

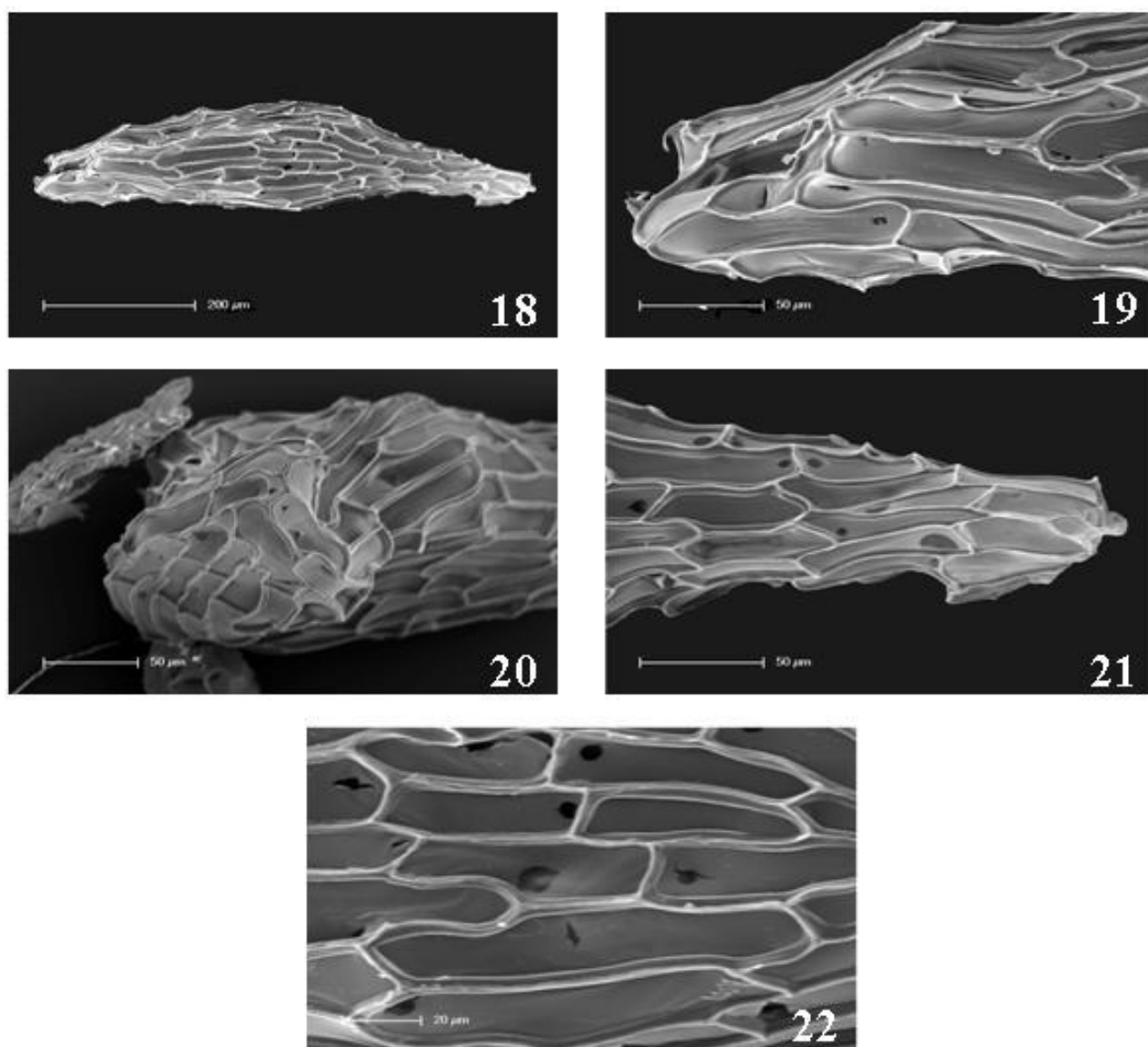
Semente largamente fusiforme, 599 ($\pm$ 72) μ m de comprimento e 197 ($\pm$ 11) μ m na maior largura. Extremidades micropilar e chalazal fechadas. Células da testa oblongas, cerca de 9 células de comprimento e 11 células de largura, sem ornamentação. As células são de tamanho semelhante por toda a testa. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo. Embrião elipsóide, 156 ($\pm$ 16) μ m de comprimento e 106 ($\pm$ 5) μ m de largura; proporção embrião:semente = 0,262.

b. *Acianthera saundersiana* 2 (Figuras 23 a 26, 112)

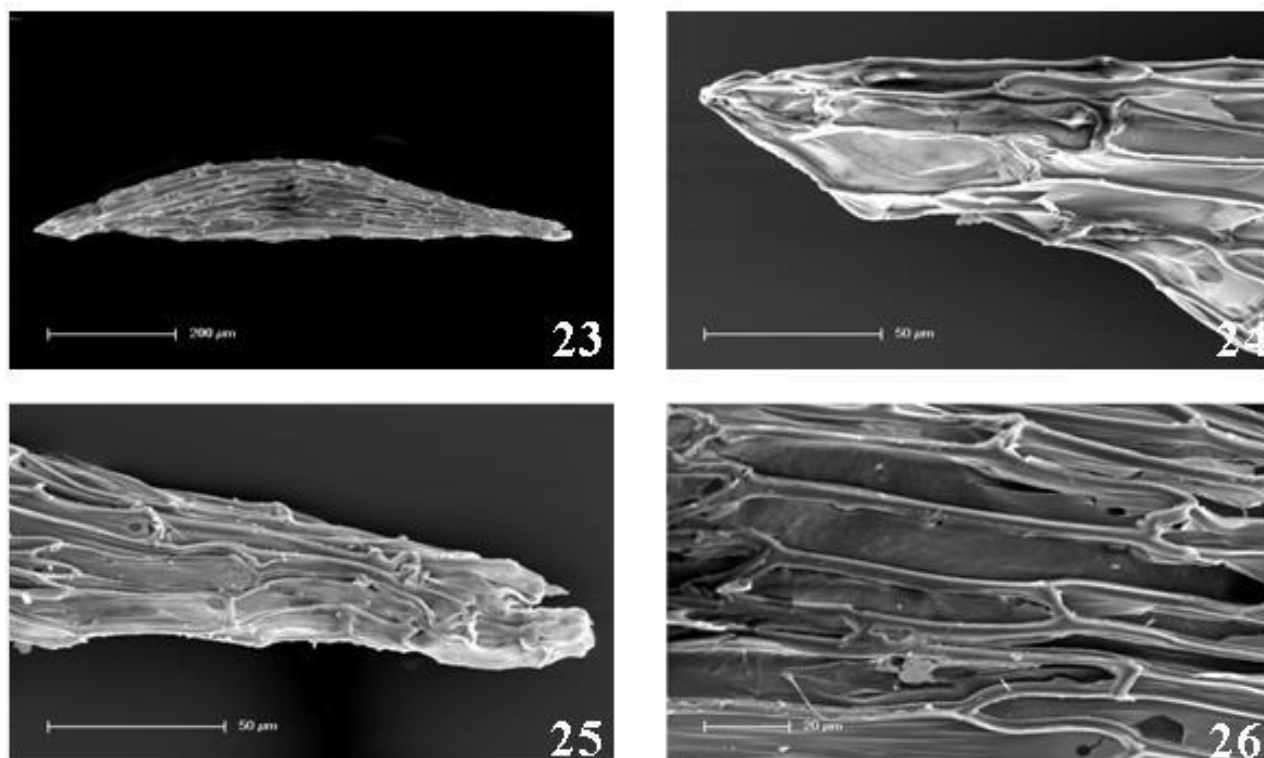
Semente largamente fusiforme, 842 ($\pm$ 31) μ m de comprimento e 179 ($\pm$ 19) μ m na maior largura. Extremidades micropilar e chalazal fechadas. Células da testa oblongas, cerca de 9 células de comprimento e 10 células de largura, sem ornamentação. As células são de tamanho semelhante por toda a testa. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo, com algumas papilas. Embrião elipsóide, 167 ($\pm$ 36) μ m de comprimento e 79 ($\pm$ 7) μ m de largura; proporção embrião:semente = 0,199.

c. *Acianthera saundersiana* 3 (Figuras 27 a 30, 113)

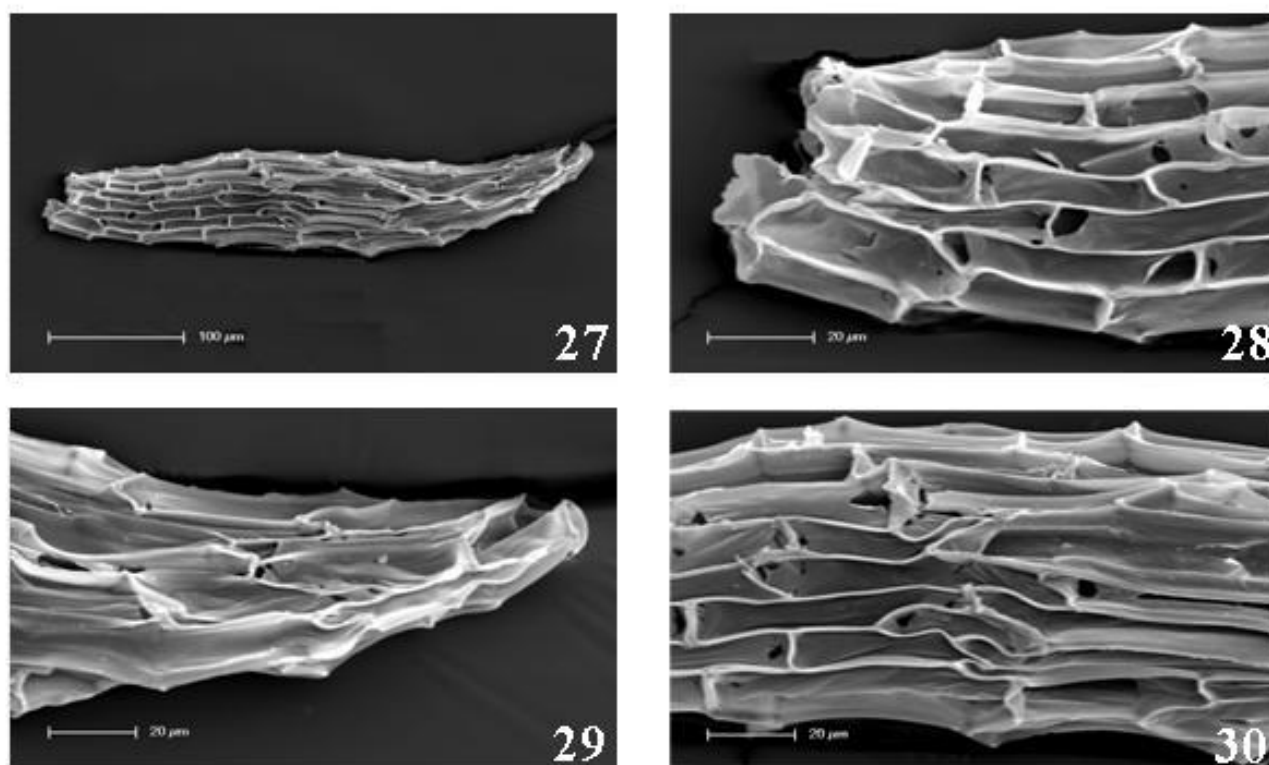
Semente fusiforme, 495 ($\pm$ 38) μ m de comprimento e 133 ($\pm$ 14) μ m na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa oblongas, cerca de 8 células de comprimento e 8 células de largura, sem ornamentação. As células da região micropilar são menores que as demais. As zonas de adesão não são claramente distintas. Embrião elipsóide, 115 ($\pm$ 11) μ m de comprimento e 70 ($\pm$ 4) μ m de largura; proporção embrião:semente = 0,233.



Figuras 18-22. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Acianthera saundersiana* L. 18. Aspecto geral. 19. Extremidade micropilar. 20. Detalhe da extremidade micropilar. 21. Extremidade chalazal. 22. Detalhe das células da região mediana da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.



Figuras 23-26. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Acianthera saundersiana* 2. 23. Aspecto geral. 24. Extremidade micropilar. 25. Extremidade chalazal. 26. Detalhe das células da região mediana da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.



Figuras 27-30. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Acianthera saundersiana* 3. 27. Aspecto geral. 28. Extremidade micopilar. 29. Extremidade chalazal. 30. Detalhe das células da região mediana da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.

1.6. *Acianthera teres* (Figuras 31 a 34, 114)

Semente clavada, 483 ($\pm$ 53) μ m de comprimento e 114 ($\pm$ 8) μ m na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa oblongas, cerca de 12 células de comprimento e 8 células de largura, sem ornamentação. As células da porção mediana são levemente mais longas que as das extremidades. As zonas de adesão não são claramente distintas. Embrião elipsóide a ovóide, 183 ($\pm$ 33) μ m de comprimento e 86 ($\pm$ 4) μ m de largura; proporção embrião:semente = 0,379.

2. *Anathallis* Barb. Rodr.

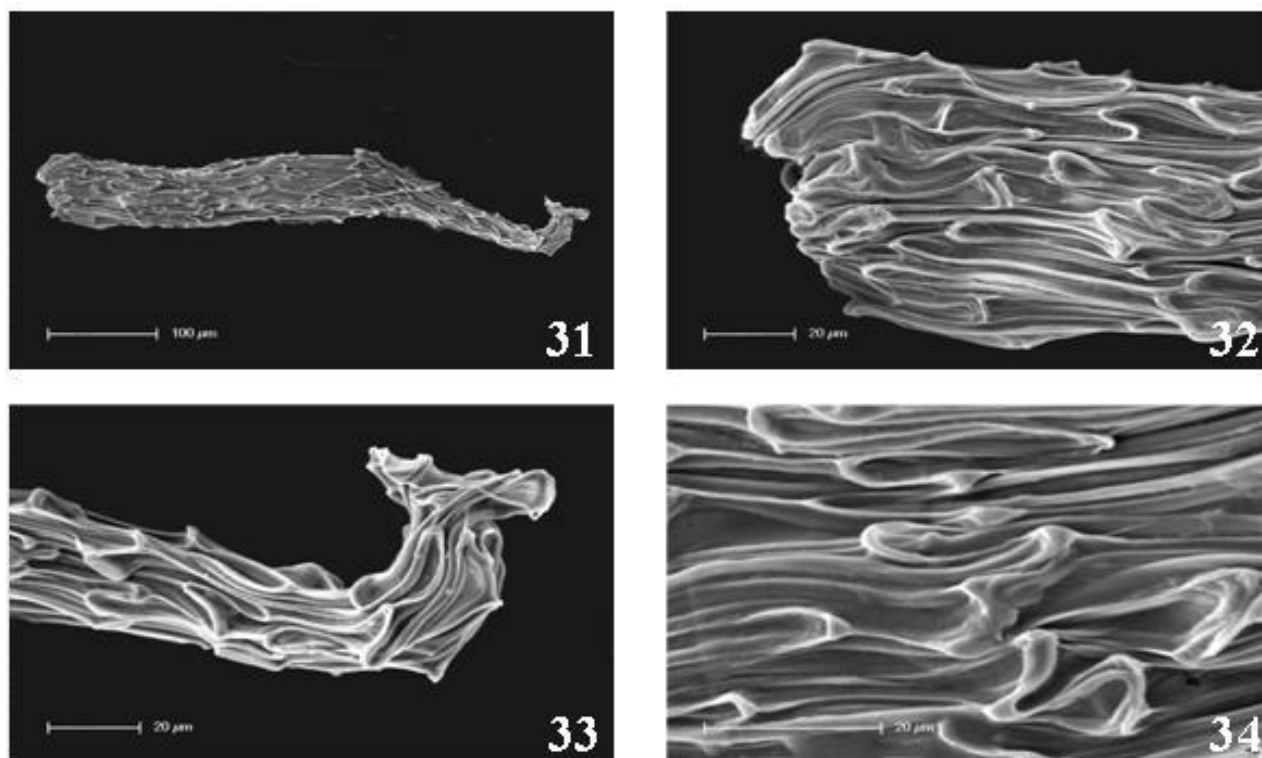
Sementes clavadas, raro fusiformes ou ovóides. Extremidade chalazal fechada, extremidade micropilar aberta. Células da testa lineares, raro oblongas, 2 ou 3 células de comprimento e 5 a 8 células de largura, com ou sem ornamentação sobre as células da testa. As zonas de adesão entre células adjacentes da testa são protegidas por uma estrutura em relevo. Embrião elipsóide.

2.1. *Anathallis linearifolia* (Figuras 35 a 38)

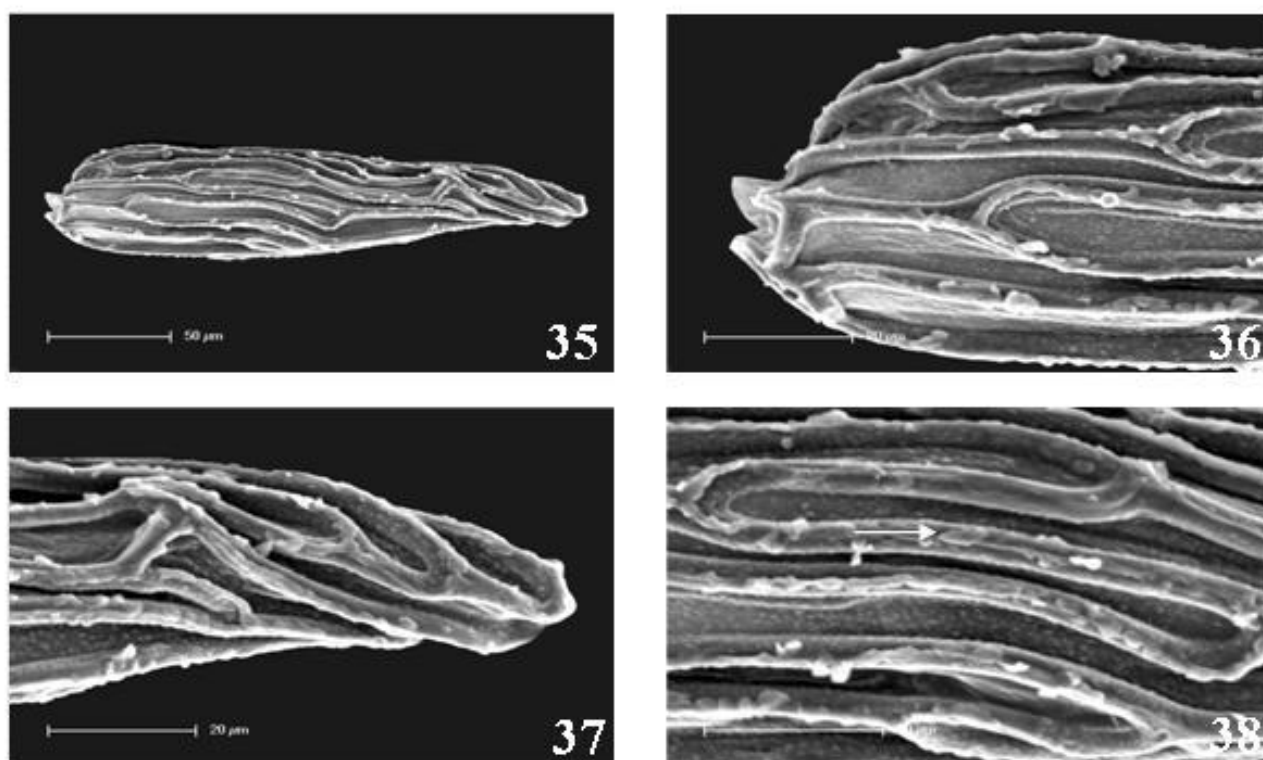
Semente clavada, 210 ($\pm$ 22) μ m de comprimento e 58 ($\pm$ 2) μ m na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa lineares, raro oblongas na extremidade micropilar, 2 a 3 células de comprimento e cerca de 7 células de largura, com verrugas sobre as paredes periclinais e anticlinais, com algumas áreas sem ornamentação. As células mais longas se estendem por cerca de 1/2 a 3/4 do comprimento da semente. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo com papilas. Embrião não observado.

2.2. *Anathallis obovata* (Figuras 39 a 41, 115)

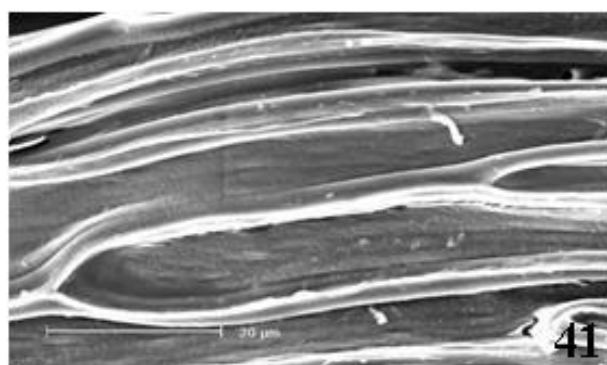
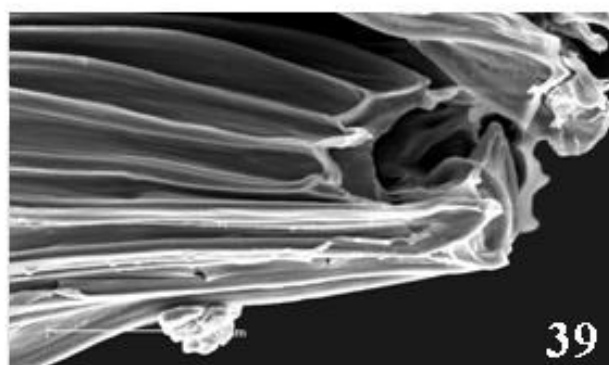
Semente clavada a largamente fusiforme, 276 ($\pm$ 48) μ m de comprimento e 85 ($\pm$ 6) μ m na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada, alongada. Células da testa lineares em sua maioria, 2 a 3 células de comprimento e 5 a 6 células de largura, sem ornamentação. As células da testa aparentemente são de tamanho semelhante. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo. Embrião elipsóide, 123 ($\pm$ 23) μ m de comprimento e 67 ($\pm$ 6) μ m de largura; proporção embrião:semente = 0,445.



Figuras 31-34. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Acianthera teres*. 31. Aspecto geral. 32. Extremidade micropilar. 33. Extremidade chalazal. 34. Detalhe das células da região mediana da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.



Figuras 35-38. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Anathallis linearifolia*. 35. Aspecto geral. 36. Extremidade micropilar. 37. Extremidade chalazal. 38. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas (seta) sobre as paredes anticlinais das células da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.



Figuras 39-41. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Anathallis obovata*. 39. Extremidade micropilar. 40. Extremidade chalazal. 41. Detalhe das células da região mediana da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.

2.3. *Anathallis sclerophylla* (Figuras 42 a 46, 116)

Semente largamente clavada ou ovóide, $201 (\pm 19) \mu\text{m}$ de comprimento e $72 (\pm 4) \mu\text{m}$ na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada, alongada. Células da testa lineares em sua maioria, cerca de três células de comprimento e oito células de largura; verrugas presentes sobre as paredes periclinais, com algumas áreas sem ornamentação. As células da porção mediana são mais longas que as das extremidades, e se estendem por cerca de $2/3$ do comprimento da semente. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo. Embrião elipsóide, $108 (\pm 6) \mu\text{m}$ de comprimento e $58 (\pm 6) \mu\text{m}$ de largura; proporção embrião:semente = 0,540.

3. *Dryadella* Luer

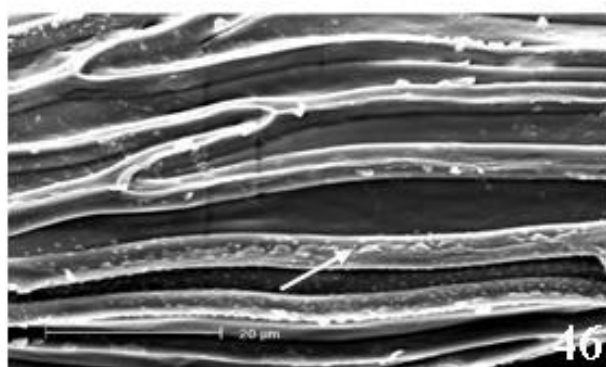
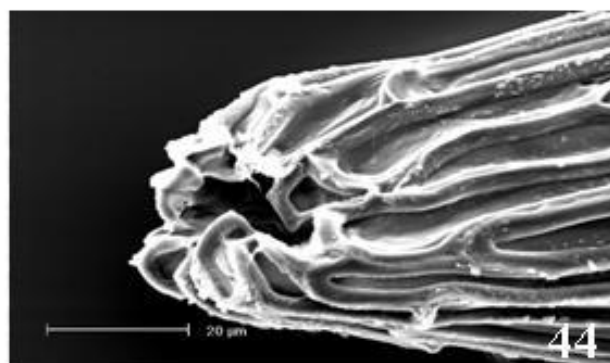
3.1. *Dryadella edwallii* (Figuras 47 a 50, 117)

Semente levemente clavada ou ovóide, $211 (\pm 11) \mu\text{m}$ de comprimento e $83 (\pm 2) \mu\text{m}$ na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa lineares a estreitamente oblongas, cerca de 3 células de comprimento e 7 células de largura, com grande quantidade de verrugas sobre as paredes periclinais, poucas áreas sem ornamentação, papilas sobre as zonas de adesão das paredes anticlinais. As células da porção mediana são mais longas que as das extremidades, e se estendem por cerca de $1/2$ do comprimento da semente. Embrião elipsóide a levemente ovóide, $117 (\pm 5) \mu\text{m}$ de comprimento e $71 (\pm 3) \mu\text{m}$ de largura; proporção embrião:semente = 0,556.

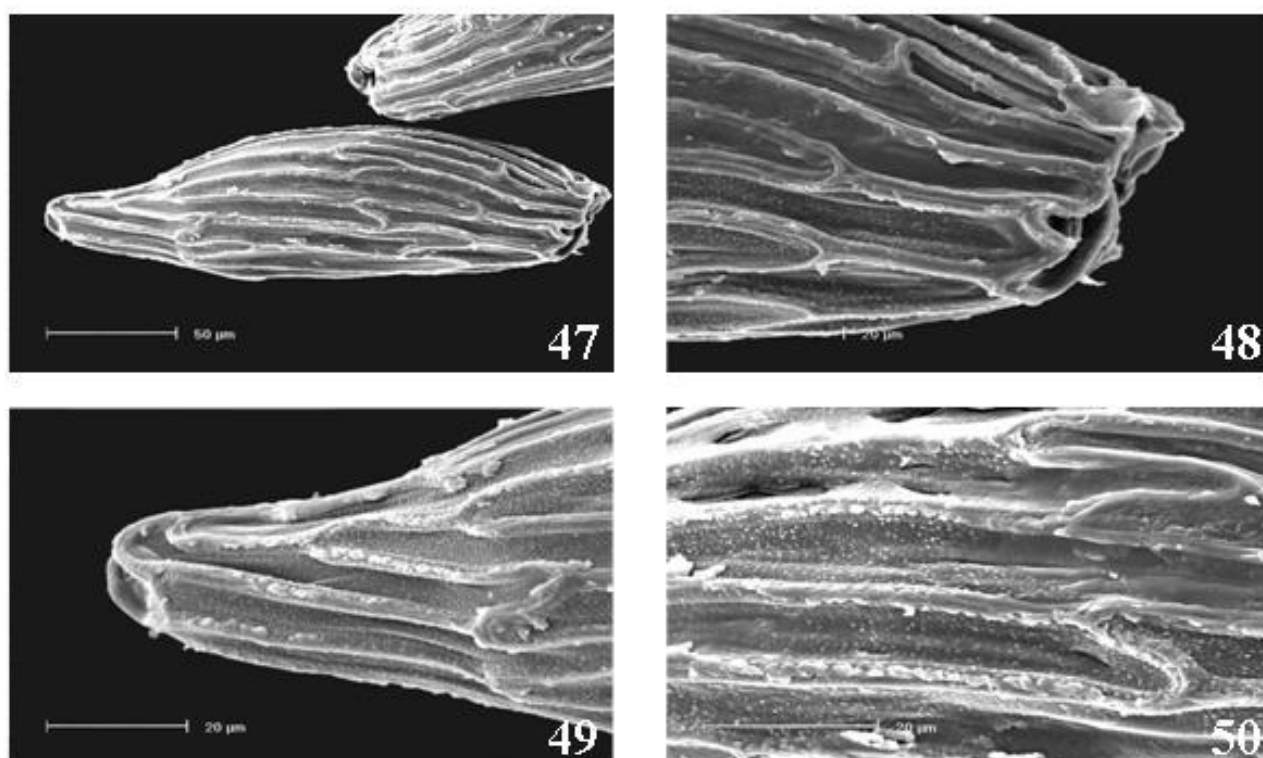
4. *Masdevallia* Ruiz & Pav.

4.1. *Masdevallia infracta* (Figuras 51 a 54, 118)

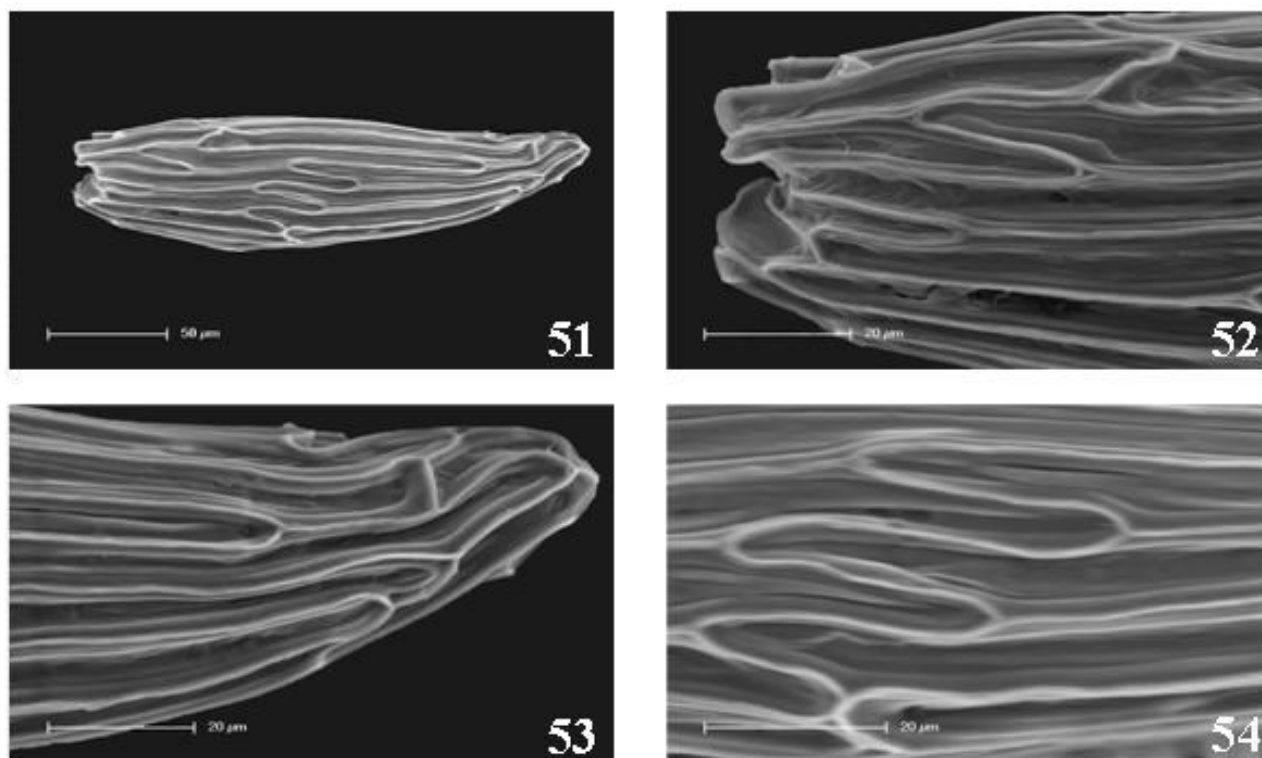
Semente ovóide, $187 (\pm 18) \mu\text{m}$ de comprimento e $80 (\pm 7) \mu\text{m}$ na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa lineares a estreitamente oblongas, 2 a 3 células de comprimento e 7 a 8 células de largura, sem ornamentação. As células da porção mediana são mais longas que as das extremidades, e se estendem por $1/2$ a $2/3$ do comprimento da semente. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo. Embrião ovóide, $117 (\pm 10) \mu\text{m}$ de comprimento e $72 (\pm 5) \mu\text{m}$ de largura; proporção embrião:semente = 0,628.



Figuras 42-46. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Anathallis sclerophylla*. 42 e 43. Aspecto geral. 44. Extremidade micropilar. 45. Extremidade chalazal. 46. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas (seta) sobre as paredes anticlinais das células da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.



Figuras 47-50. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Dryadella edwallii*. 47. Aspecto geral. 48. Extremidade micropilar. 49. Extremidade chalazal. 50. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.



Figuras 51-54. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Masdevallia infracta*. 51. Aspecto geral. 52. Extremidade micropilar. 53. Extremidade chalazal. 54. Detalhe das células da região mediana da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.

5. *Myoxanthus* Poepp. & Endl.

5.1. *Myoxanthus lonchophyllus* (Figuras 55 a 58, 119)

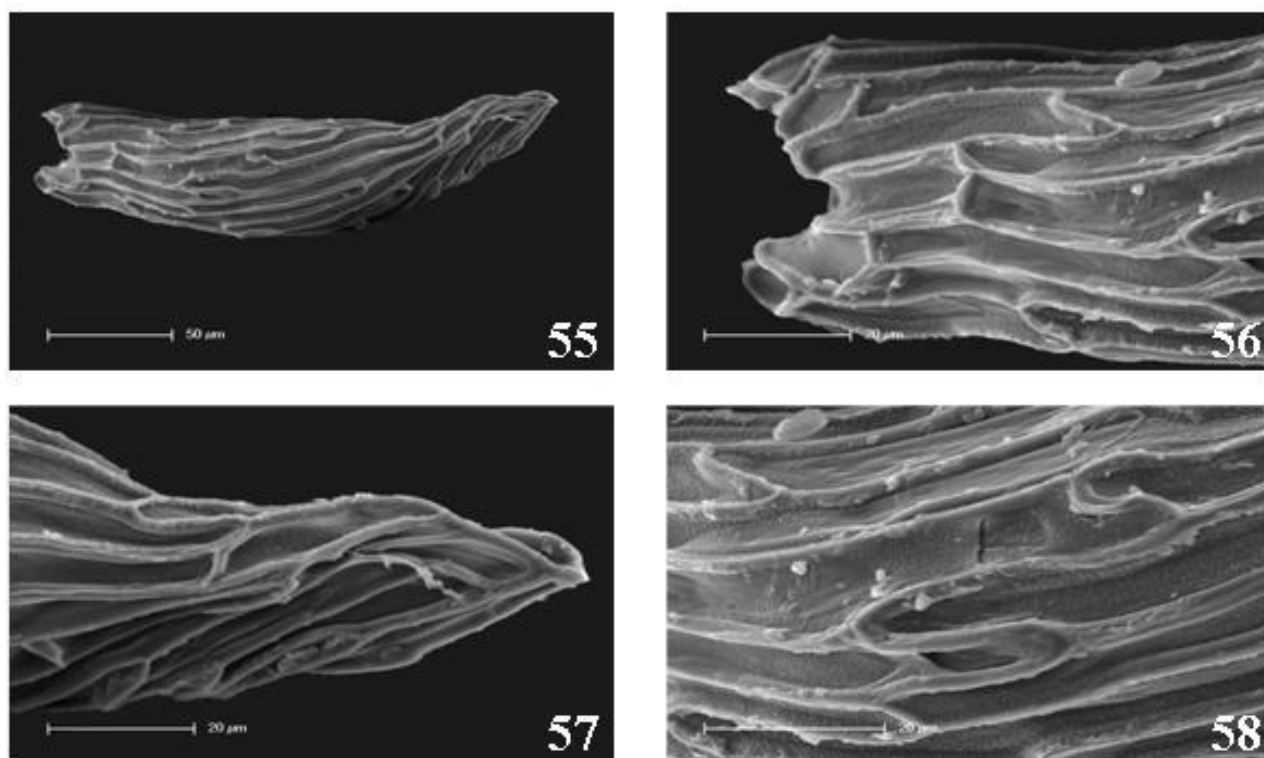
Semente estreitamente elipsóide, $225 (\pm 13)$ μm de comprimento e $75 (\pm 11)$ μm na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa lineares a oblongas, cerca de 4 células de comprimento e 7 células de largura, com pequenas verrugas sobre as paredes periclinais, com poucas áreas sem ornamentação. As células da porção mediana são mais longas que as das extremidades e se estendem por cerca de 1/2 do comprimento da semente. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo, com algumas papilas. Embrião elipsóide a levemente ovóide, $100 (\pm 13)$ μm de comprimento e $68 (\pm 10)$ μm de largura; proporção embrião:semente = 0,445.

6. *Octomeria* R. Br.

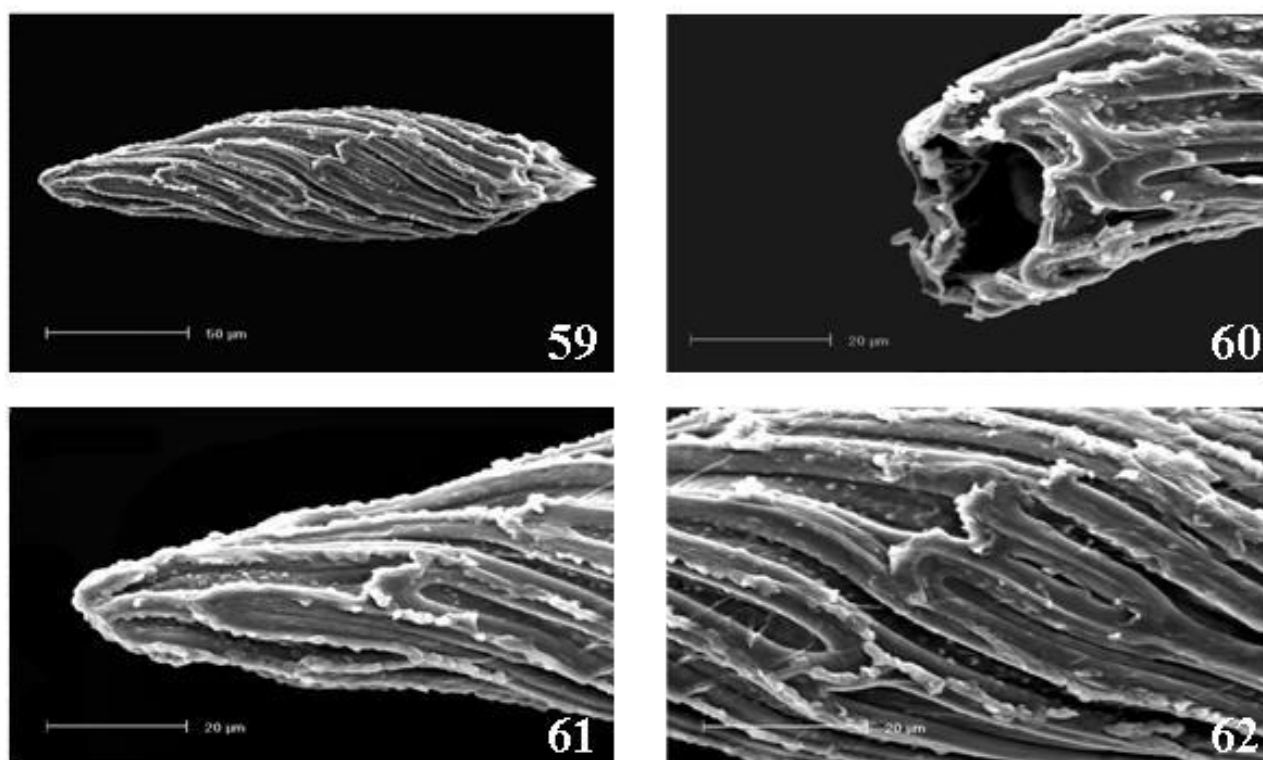
Sementes clavadas, fusiformes ou elipsóides. Extremidade chalazal fechada, extremidade micropilar aberta. Células da testa lineares a oblongas, em algumas espécies oblíquas, resultando em inclinação das paredes anticlinais em relação ao eixo longitudinal da semente, 3 ou 4 células de comprimento e 6 a 9 células de largura, com ou sem ornamentação sobre as células da testa. As células da porção mediana da testa são mais longas que as das extremidades. As zonas de adesão entre células adjacentes da testa geralmente são protegidas por uma estrutura em relevo. Embrião elipsóide.

6.1. *Octomeria crassifolia* (Figuras 59 a 62, 120)

Semente clavada, $190 (\pm 15)$ μm de comprimento e $81 (\pm 5)$ μm na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa lineares a ligeiramente oblongas, oblíquas, resultando em inclinação das paredes anticlinais em relação ao eixo longitudinal da semente, 3 ou 4 células de comprimento e cerca de 6 células de largura, com verrugas sobre as paredes periclinais. As células da porção mediana são mais longas que as das extremidades e se estendem por cerca de 1/2 do comprimento da semente. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo com papilas. Embrião elipsóide, $101 (\pm 7)$ μm de comprimento e $67 (\pm 5)$ μm de largura; proporção embrião:semente = 0,533.



Figuras 55-58. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Myoxanthus lonchophyllus*. 55. Aspecto geral. 56. Extremidade micropilar. 57. Extremidade chalazal. 58. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.



Figuras 59-62. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Octomeria crassifolia*. 59. Aspecto geral. 60. Extremidade micropilar. 61. Extremidade chalazal. 62. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.

6.2. *Octomeria gracilis* (Figuras 63 a 67, 121)

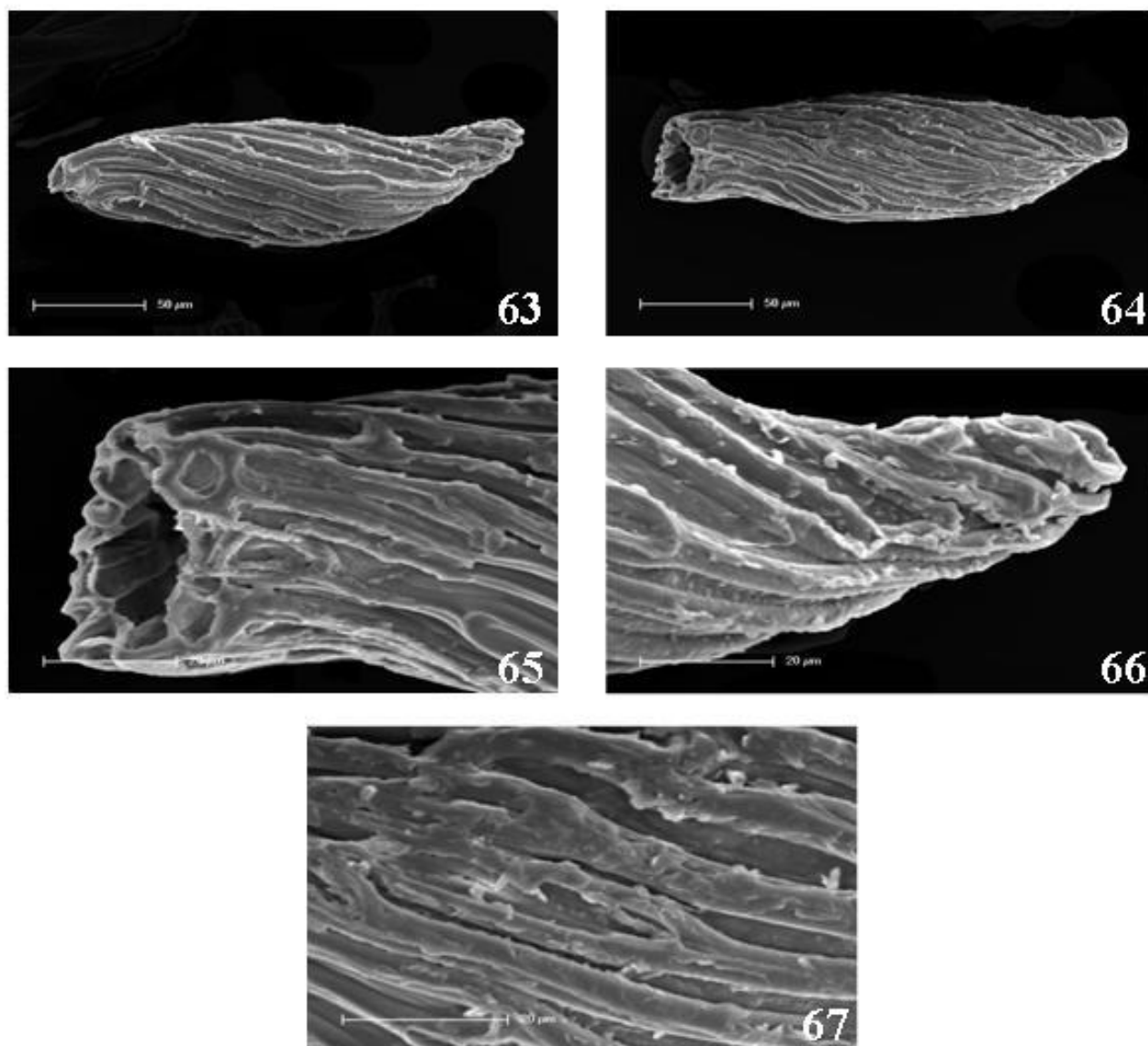
Semente elipsóide, $224 (\pm 11) \mu\text{m}$ de comprimento e $82 (\pm 8) \mu\text{m}$ na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa lineares a largamente oblongas, , oblíquas, resultado em inclinação das paredes anticlinais em relação ao eixo longitudinal da semente, cerca de 3 células de comprimento e 8 células de largura, com verrugas sobre as paredes periclinais, com algumas áreas sem ornamentação. As células da porção mediana são mais longas que as das extremidades, e se estendem por cerca de $2/3$ do comprimento da semente. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo com papilas. Embrião elipsóide, $114 (\pm 6) \mu\text{m}$ de comprimento e $73 (\pm 6) \mu\text{m}$ de largura; proporção embrião:semente = 0,510.

6.3. *Octomeria grandiflora* (Figuras 68 a 71, 122)

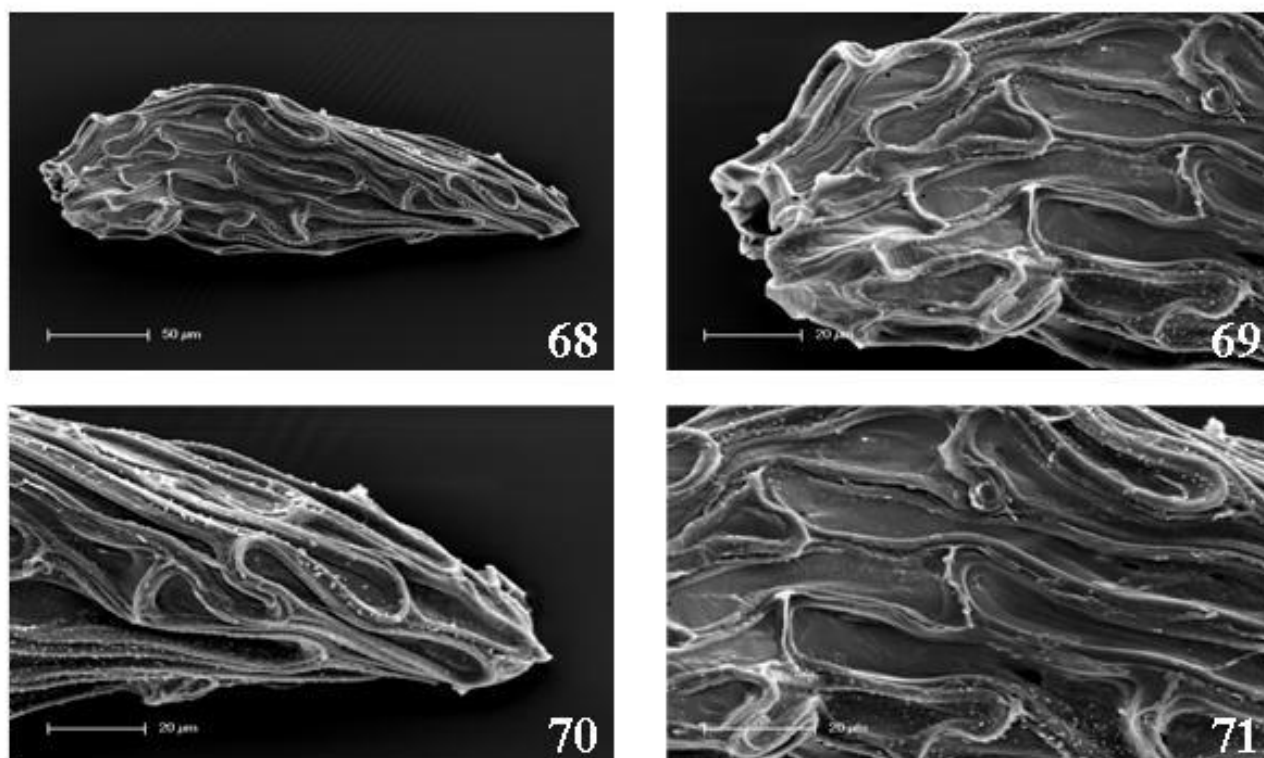
Semente clavada, $252 (\pm 16) \mu\text{m}$ de comprimento e $95 (\pm 9) \mu\text{m}$ na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa lineares a oblongas, sinuosas, 3 a 4 células de comprimento e cerca de 7 células de largura; verrugas presentes sobre as paredes periclinais e anticlinais, com algumas áreas sem ornamentação. As células da porção mediana são mais longas que as das extremidades, e se estendem por $1/3$ a $1/2$ do comprimento da semente. As zonas de adesão são visíveis, formando uma depressão entre paredes adjacentes. Embrião elipsóide, $97 (\pm 6) \mu\text{m}$ de comprimento e $69 (\pm 2) \mu\text{m}$ de largura; proporção embrião:semente = 0,386.

6.4. *Octomeria juncifolia* (Figuras 72 a 75, 123)

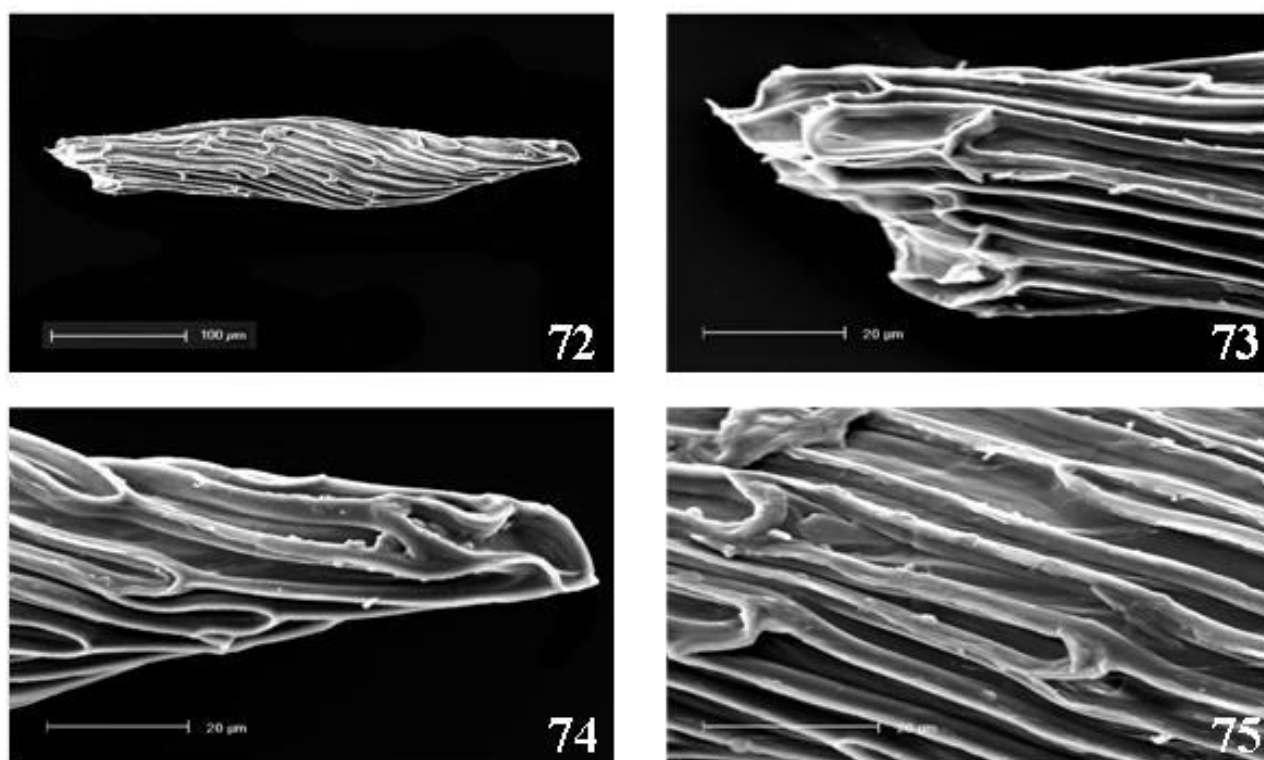
Semente fusiforme, $246 (\pm 21) \mu\text{m}$ de comprimento e $81 (\pm 2) \mu\text{m}$ na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa lineares a oblongas, cerca de 4 células de comprimento e 9 células de largura, sem ornamentação nas paredes periclinais. As células da extremidade micropilar são bem mais curtas que as demais. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo. Embrião elipsóide, $124 (\pm 1) \mu\text{m}$ de comprimento e $61 (\pm 13) \mu\text{m}$ de largura; proporção embrião:semente = 0,505.



Figuras 63-67. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Octomeria gracilis*. 63 e 64. Aspecto geral. 65. Extremidade micropilar. 66. Extremidade chalazal. 67. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.



Figuras 68-71. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Octomeria grandiflora*. 68. Aspecto geral. 69. Extremidade micopilar. 70. Extremidade chalazal. 71. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.



Figuras 72-75. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Octomeria juncifolia*. 72. Aspecto geral. 73. Extremidade micopilar. 74. Extremidade chalazal. 75. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.

7. *Pabstiella* Brieger & Senghas

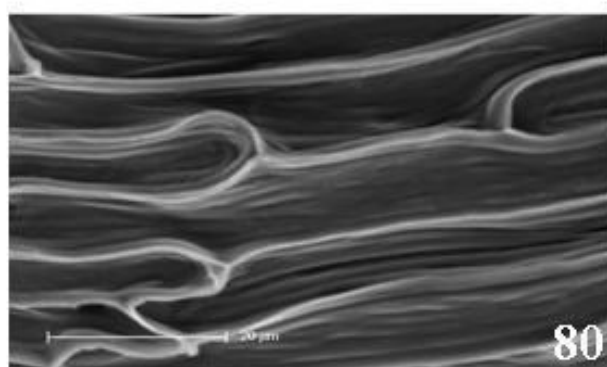
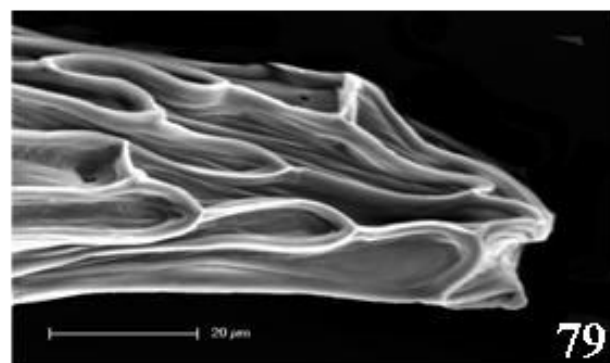
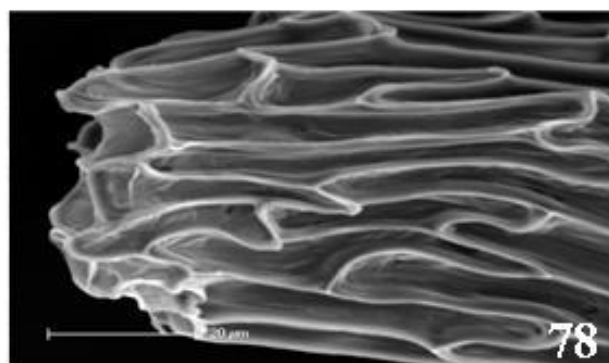
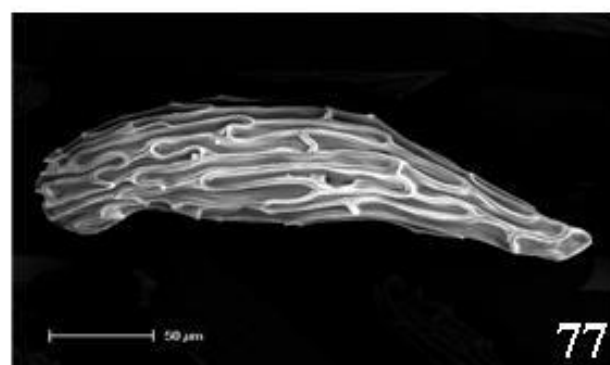
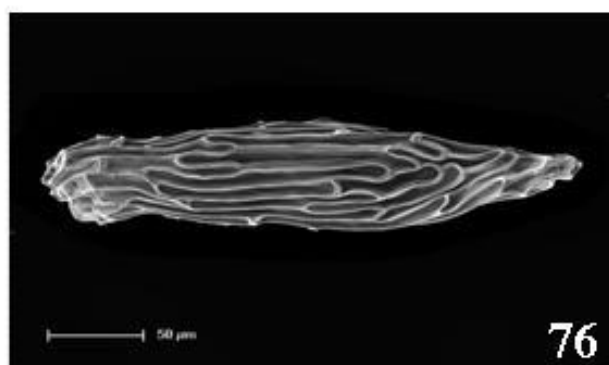
7.1. *Pabstiella tripterantha* (Figuras 76 a 80, 124)

Semente elipsóide a clavada, $257 (\pm 16) \mu\text{m}$ de comprimento e $76 (\pm 2) \mu\text{m}$ na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa lineares a oblongas, 4 a 5 células de comprimento e cerca de 8 células de largura, sem ornamentação sobre as paredes. As células da porção mediana são mais longas que as das extremidades, e se estendem por cerca de $1/2$ do comprimento da semente. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo. Embrião elipsóide, $111 (\pm 4) \mu\text{m}$ de comprimento e $61 (\pm 6) \mu\text{m}$ de largura; proporção embrião:semente = 0,435.

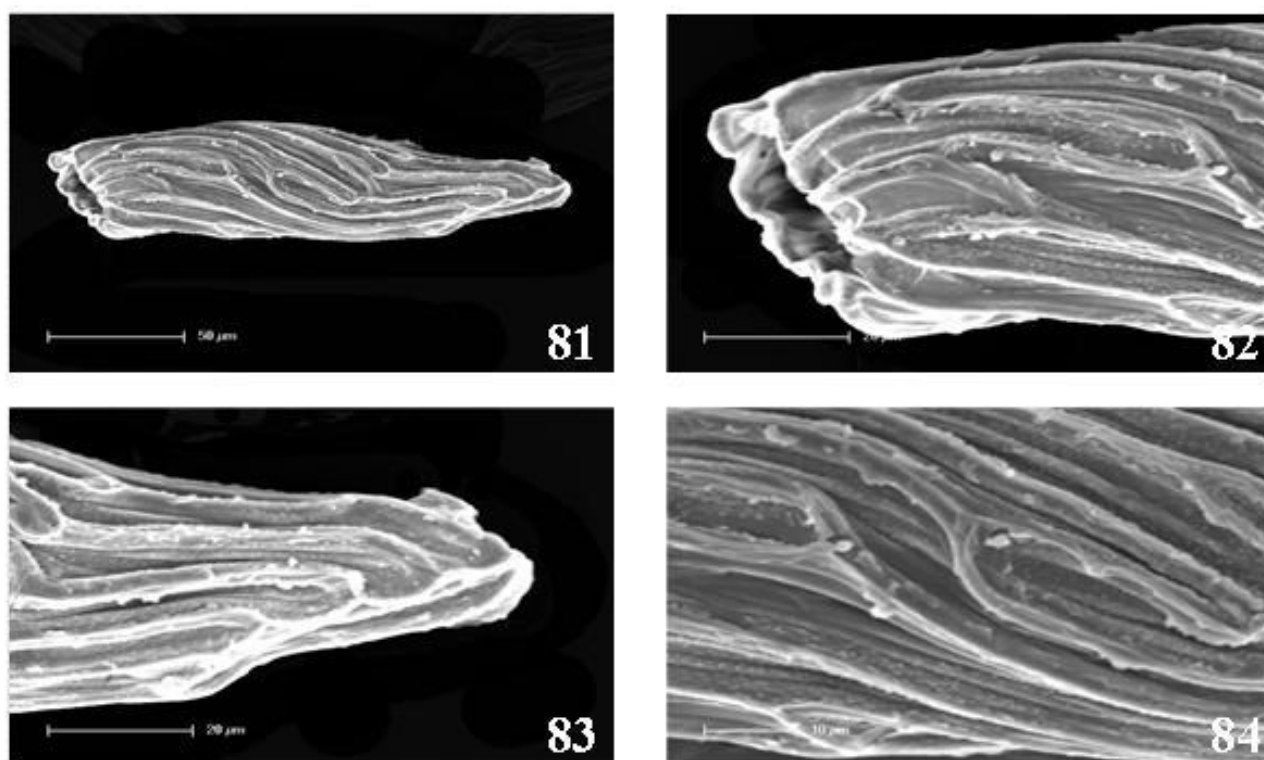
8. *Platystele* Schltr.

8.1. *Platystele* sp. (Figuras 81 a 84, 125)

Semente clavada a ovada, $160 (\pm 16) \mu\text{m}$ de comprimento e $64 (\pm 6) \mu\text{m}$ na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa lineares a estreitamente oblongas, 2 a 3 células de comprimento e cerca de 7 células de largura; verrugas presentes sobre as paredes periclinais, com algumas áreas sem ornamentação. Existem células curtas nas extremidades, porém a maioria das células se estende por cerca de $2/3$ do comprimento da semente, algumas delas partindo de suas extremidades. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo com papilas. Embrião elipsóide, $90 (\pm 1) \mu\text{m}$ de comprimento e $51 (\pm 3) \mu\text{m}$ de largura; proporção embrião:semente = 0,561.



Figuras 76-80. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Pabstiella tripterantha*. 76 e 77. Aspecto geral. 78. Extremidade micropilar. 79. Extremidade chalazal. 80. Detalhe das células da região mediana da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.



Figuras 81-84. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Platystele* sp. 81. Aspecto geral. 82. Extremidade micropilar. 83. Extremidade chalazal. 84. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.

9. *Pleurothallis* R. Br.

9.1. *Pleurothallis ruscifolia* (Figuras 85 a 88, 126)

Semente fusiforme a clavada, 251 ($\pm$ 19) μ m de comprimento e 87 ($\pm$ 11) μ m na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa oblongas na extremidade micropilar e estreitamente oblongas no restante da testa, 3 a 4 células de comprimento e cerca de 5 células de largura, sem ornamentação. As células da porção mediana são mais longas, e se estendem por cerca de 1/2 do comprimento da semente. As zonas de adesão são protegidas por uma estreita estrutura em relevo. Embrião elipsóide, 109 ($\pm$ 3) μ m de comprimento e 71 ($\pm$ 7) μ m de largura; proporção embrião:semente = 0,436.

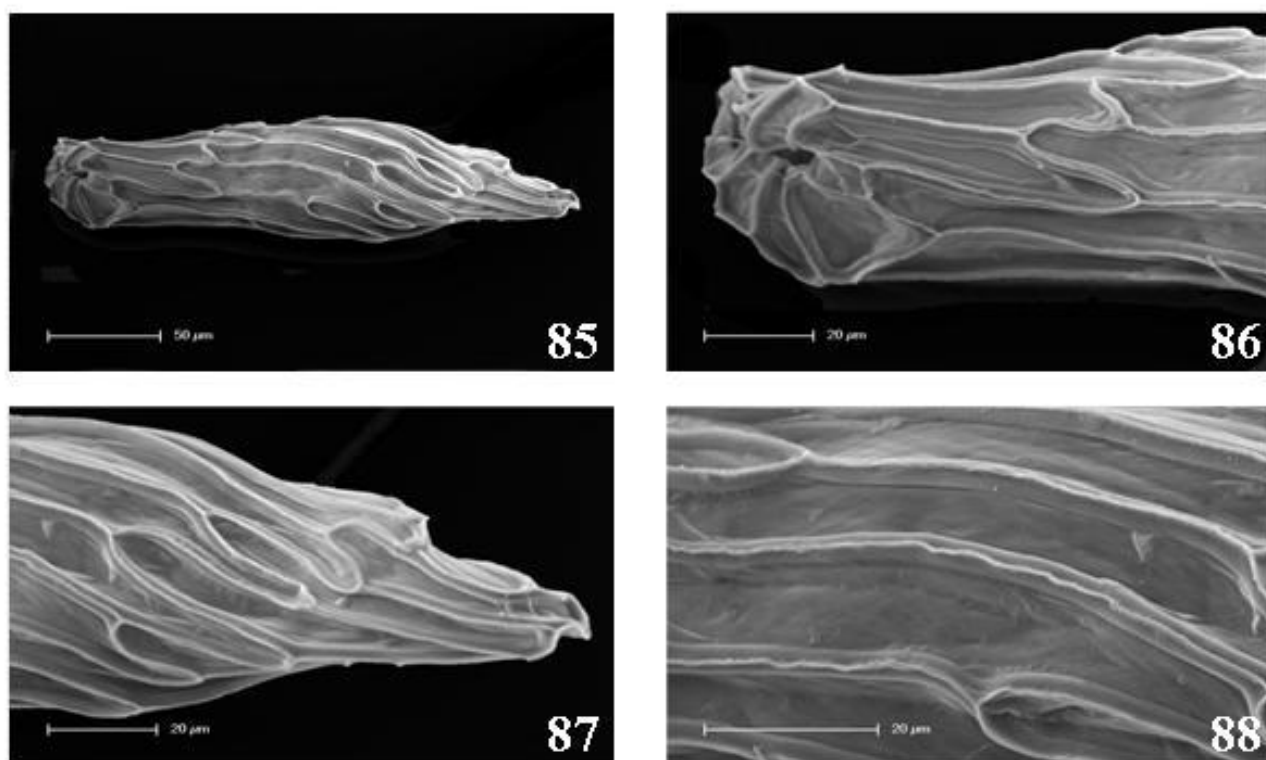
10. *Specklinia* Lindl.

10.1. *Specklinia grobyi* (Figuras 89 a 92, 127)

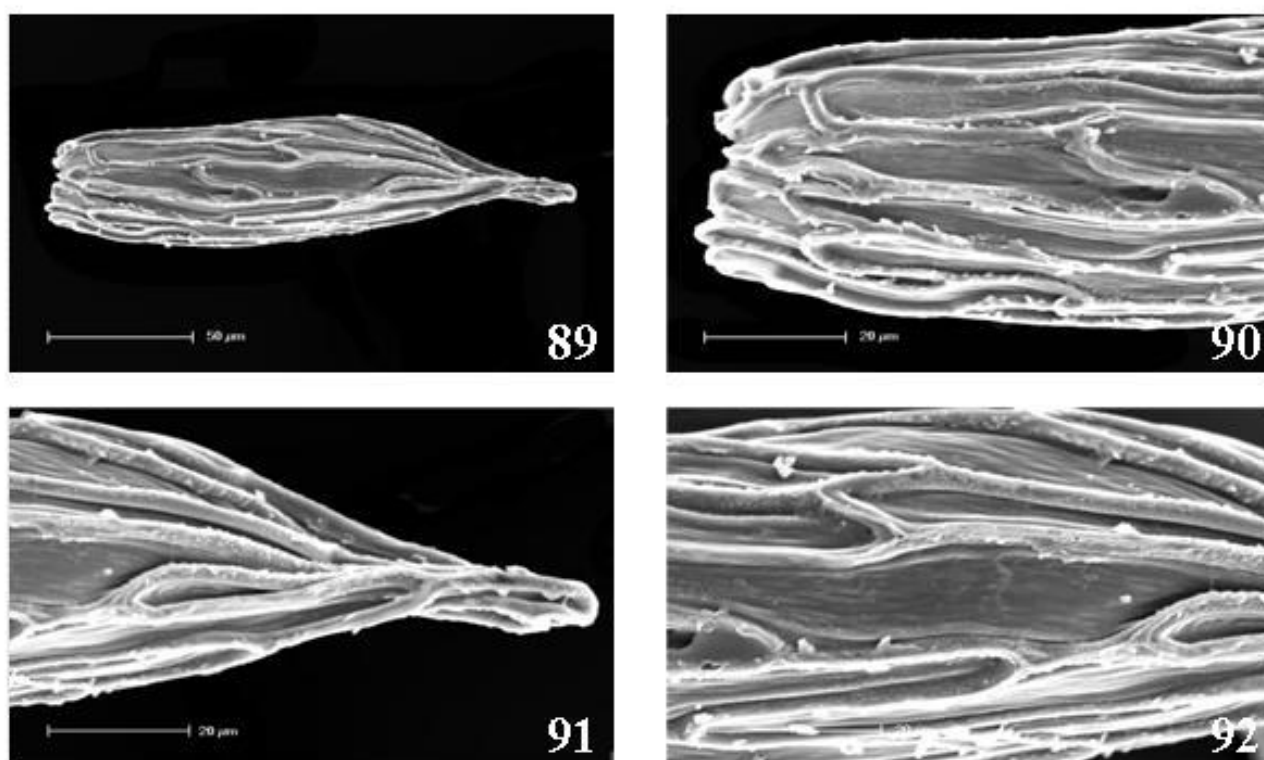
Semente elipsóide, 218 ($\pm$ 60) μ m de comprimento e 82 ($\pm$ 18) μ m na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa largamente oblongas na extremidade micropilar a lineares na porção mediana da semente, cerca de 3 células de comprimento e cerca de 7 células de largura, com verrugas nas paredes anticlinais e em algumas regiões das parede periclinais. As células da porção mediana são mais longas e se estendem por cerca de 1/2 do comprimento da semente. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo, com papilas. Embrião elipsóide a largamente elipsóide, 104 ($\pm$ 12) μ m de comprimento e 68 ($\pm$ 15) μ m de largura; proporção embrião:semente = 0,494.

11. *Stelis* Sw.

Sementes fusiformes, elipsóides ou clavadas. Extremidade chalazal fechada, extremidade micropilar aberta. Células da testa lineares a oblongas, 2 a 4 células de comprimento e 6 a 8 células de largura, com ou sem ornamentação sobre as células da testa. As células da porção mediana da testa são mais longas que as das extremidades. As zonas de adesão entre células adjacentes da testa geralmente são protegidas por uma estrutura em relevo. Embrião elipsóide a ovóide.



Figuras 85-88. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Pleurothallis ruscifolia*. 85. Aspecto geral. 86. Extremidade micopilar. 87. Extremidade chalazal. 88. Detalhe das células da região mediana da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.



Figuras 89-92. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Specklinia grobyi*. 89. Aspecto geral. 90. Extremidade micropilar. 91. Extremidade chalazal. 92. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.

11.1. *Stelis deregularis* (Figuras 93 a 96, 128)

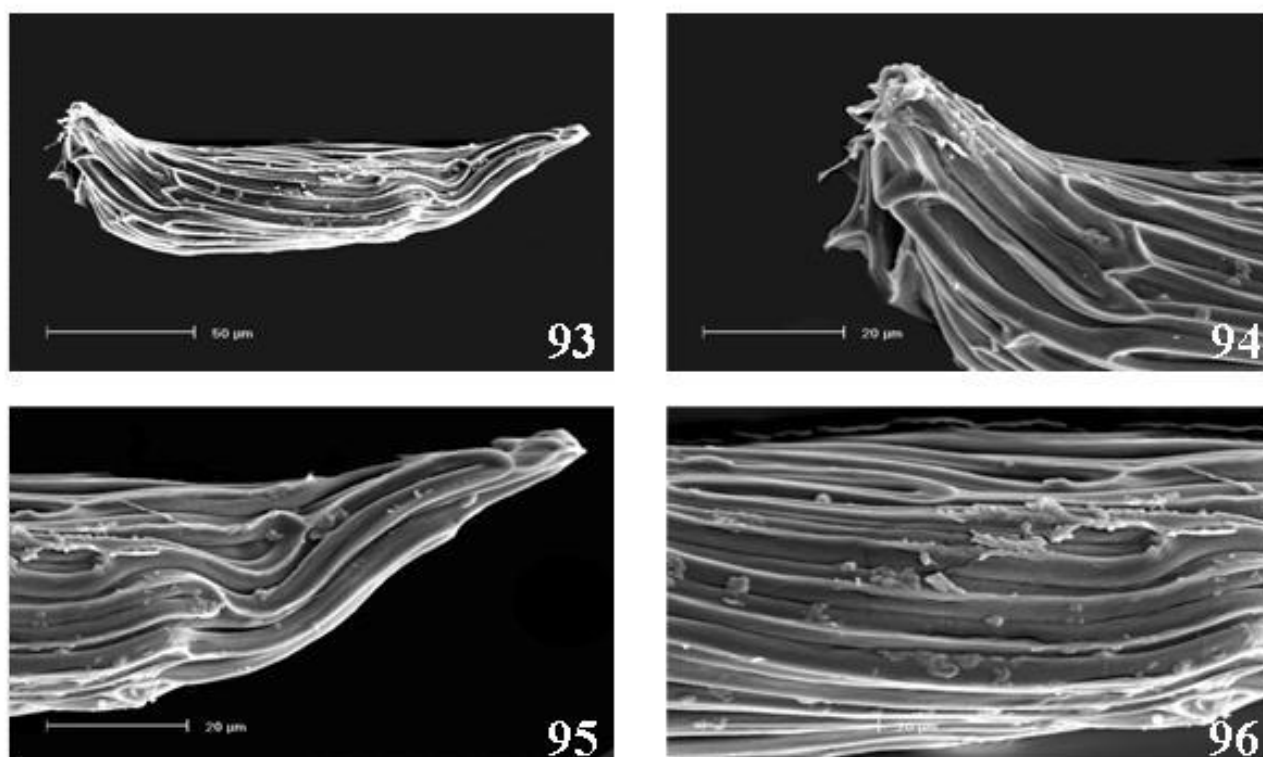
Semente fusiforme, $186 (\pm 15) \mu\text{m}$ de comprimento e $74 (\pm 6) \mu\text{m}$ na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa lineares, 2 a 3 células de comprimento e cerca de 8 células de largura, sem ornamentação. As células da porção mediana e chalazal são mais longas que as da extremidade micropilar e se estendem por cerca de $2/3$ do comprimento da semente. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo. Embrião elipsóide a ovóide, $93 (\pm 10) \mu\text{m}$ de comprimento e $62 (\pm 9) \mu\text{m}$ de largura; proporção embrião:semente = 0,502.

11.2. *Stelis hypnicola* (Figuras 97 a 100, 129)

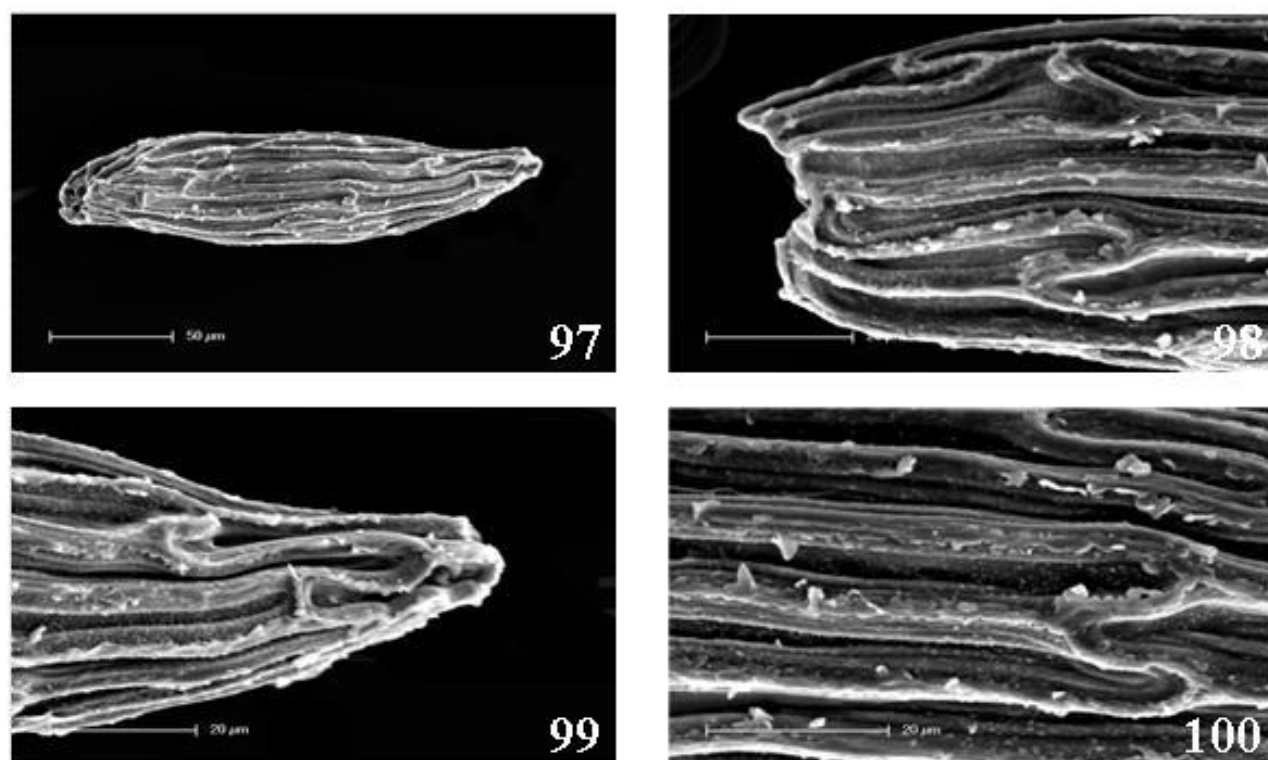
Semente elipsóide a levemente clavada, $238 (\pm 17) \mu\text{m}$ de comprimento e $75 (\pm 3) \mu\text{m}$ na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa lineares a estreitamente oblongas, 2 a 4 células de comprimento e 6 a 7 células de largura; verrugas presentes sobre as paredes periclinais, com poucas áreas sem ornamentação. As células da porção mediana são mais longas que as das extremidades e se estendem por cerca de $2/3$ do comprimento da semente. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo com muitas papilas. Embrião elipsóide a ovóide, $127 (\pm 5) \mu\text{m}$ de comprimento e $64 (\pm 4) \mu\text{m}$ de largura; proporção embrião:semente = 0,534.

11.3. *Stelis* sp. (Figuras 101 a 104, 130)

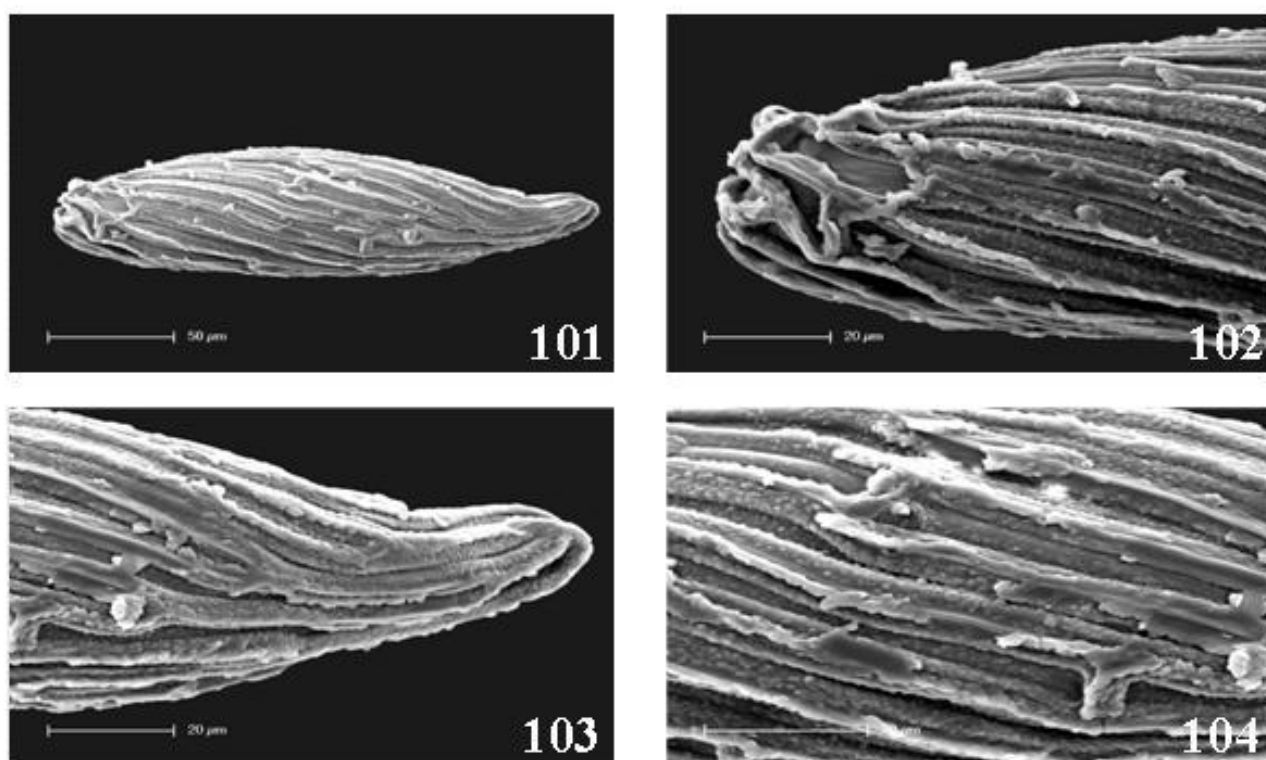
Semente fusiforme, $176 (\pm 8) \mu\text{m}$ de comprimento e $70 (\pm 5) \mu\text{m}$ na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa lineares a estreitamente oblongas na extremidade micropilar, 2 a 3 células de comprimento e cerca de 8 células de largura, com grande quantidade de verrugas. As células mais longas se estendem por $1/2$ a $2/3$ do comprimento da semente. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo com muitas papilas. Embrião elipsóide a ovóide, $110 (\pm 4) \mu\text{m}$ de comprimento e $62 (\pm 5) \mu\text{m}$ de largura; proporção embrião:semente = 0,626.



Figuras 93-96. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Stelis deregularis*. 93. Aspecto geral. 94. Extremidade micropilar. 95. Extremidade chalazal. 96. Detalhe das células da região mediana da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.



Figuras 97-100. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Stelis hypnicola*. 97. Aspecto geral. 98. Extremidade micopilar. 99. Extremidade chalazal. 100. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.

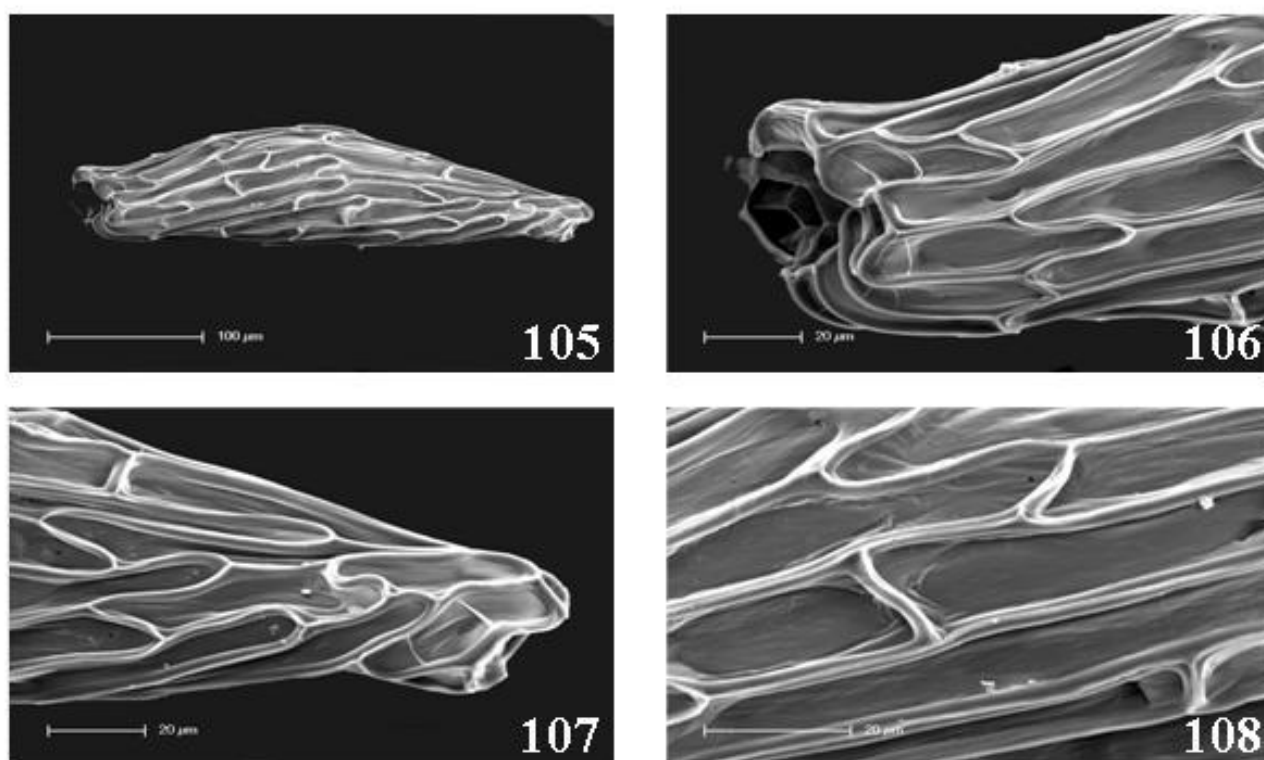


Figuras 101-104. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Stelis* sp. 101. Aspecto geral. 102. Extremidade micropilar. 103. Extremidade chalazal. 104. Detalhe das células da região mediana da testa, evidenciando as papilas sobre as paredes anticlinais das células da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.

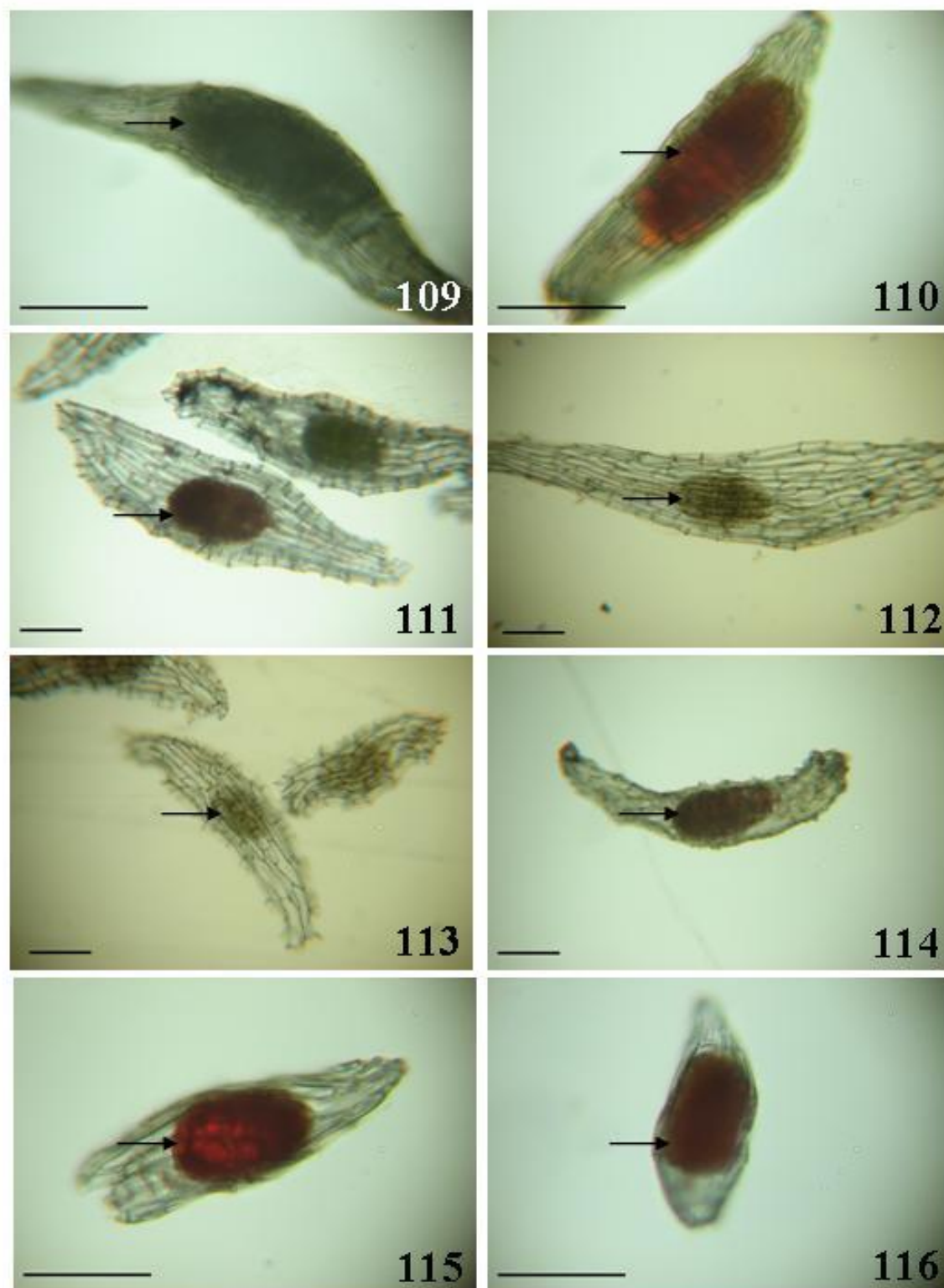
12. *Zootrophion* Luer

12.1. *Zootrophion atropurpureum* (Figuras 105 a 108, 131)

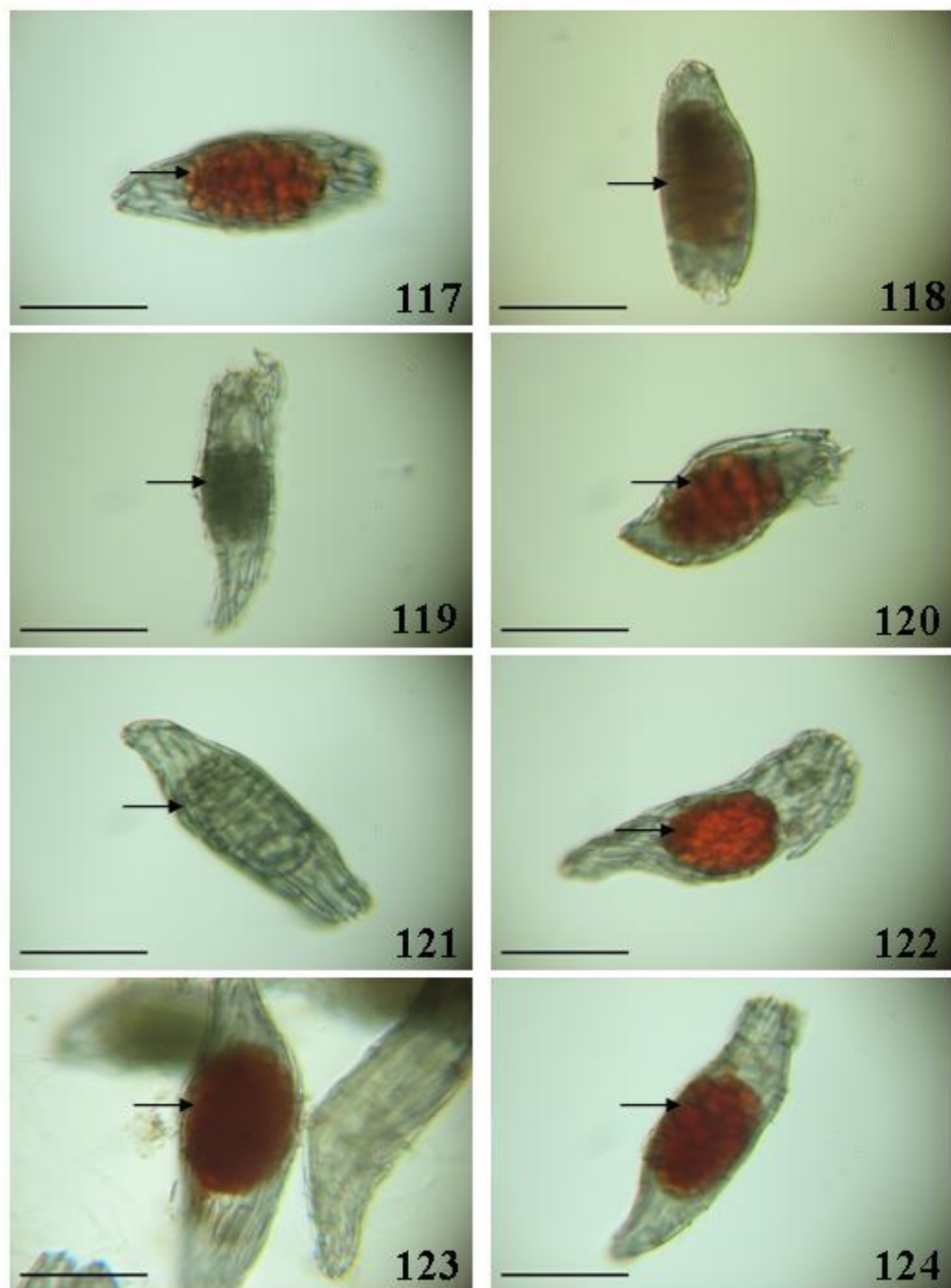
Semente fusiforme, $339 (\pm 10) \mu\text{m}$ de comprimento e $106 (\pm 10) \mu\text{m}$ na maior largura. Extremidade micropilar aberta, extremidade chalazal fechada. Células da testa oblongas a estreitamente oblongas, 3 a 4 células de comprimento e cerca de 8 células de largura, sem ornamentação. As células têm tamanhos diferentes, porém não agrupadas em porções específicas da testa. As zonas de adesão são protegidas por uma estrutura em relevo. Embrião elipsóide, raro ovóide, $148 (\pm 10) \mu\text{m}$ de comprimento e $89 (\pm 7) \mu\text{m}$ de largura; proporção embrião:semente = 0,436.



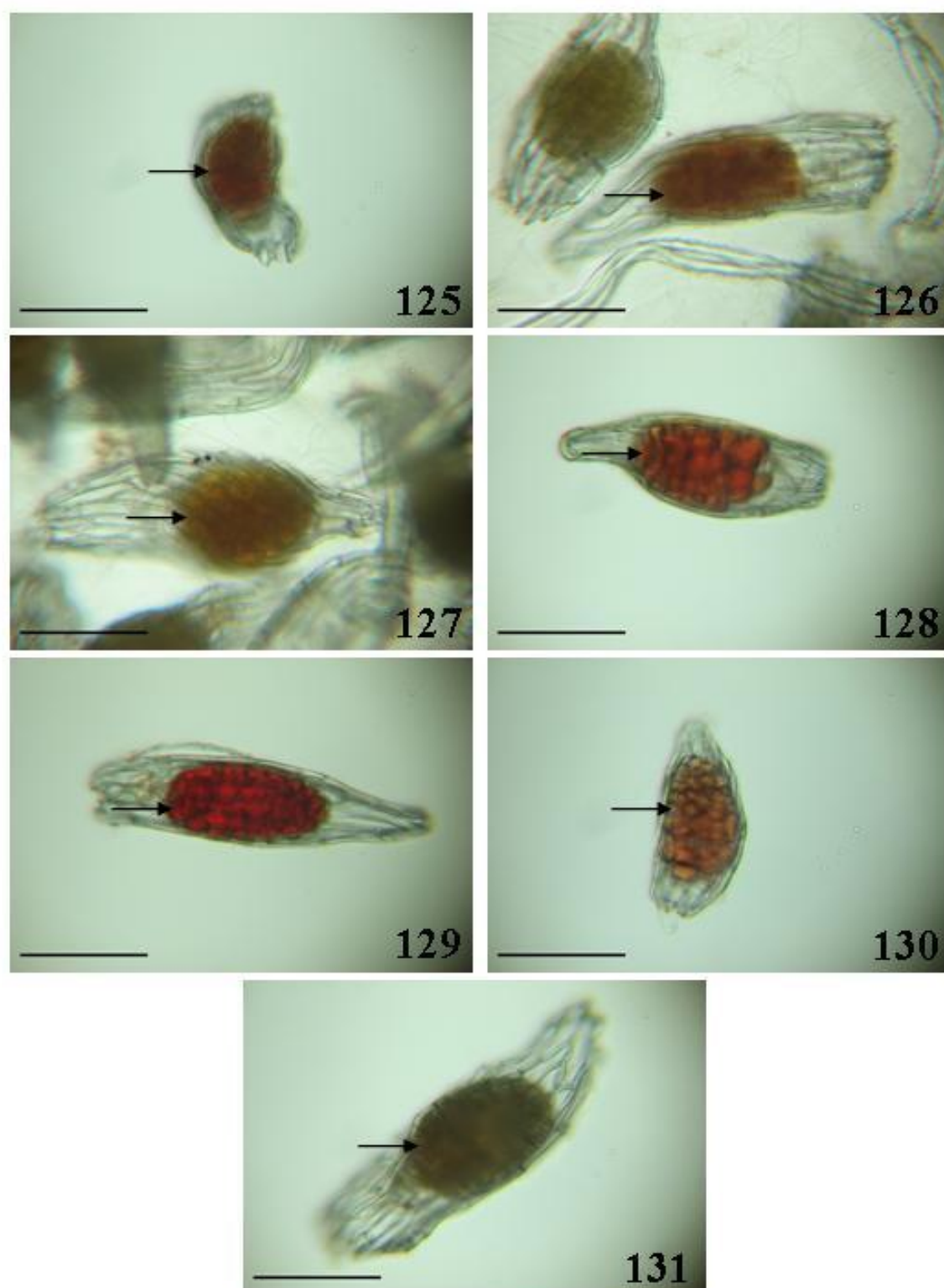
Figuras 105-108. Eletromicrografias (MEV) de sementes de *Zootrophion atropurpureum*. 105. Aspecto geral. 106. Extremidade micropilar. 107. Extremidade chalazal. 108. Detalhe das células da região mediana da testa. Escalas indicadas diretamente em cada figura.



Figuras 109–116. Fotomicrografias (MO) de sementes de espécies de Pleurothallidinae, evidenciando os embriões (setas). 109. *Acianthera ochreatea*. 110. *Acianthera recurva*. 111. *Acianthera saundersiana* 1. 112. *Acianthera saundersiana* 2. 113. *Acianthera saundersiana* 3. 114. *Acianthera teres*. 115. *Anathallis obovata*. 116. *Anathallis sclerophylla*. Escala: 100 μm .



Figuras 117– 124. Fotomicrografias (MO) de sementes de espécies de Pleurothallidinae, evidenciando os embriões (setas). 117. *Dryadella edwalli*. 118. *Masdevallia infracta*. 119. *Myoxanthus lonchophyllus*. 120. *Octomeria crassifolia*. 121. *Octomeria gracilis*. 122. *Octomeria grandiflora*. 123. *Octomeria juncifolia*. 124. *Pabstiella tripterantha*. Escala: 100 μm .



Figuras 125–131. Fotomicrografias (MO) de sementes de espécies de Pleurothallidinae, evidenciando os embriões (setas). 125. *Platystele* sp. 126. *Pleurothallis ruscifolia*. 127. *Specklinia grobyi*. 128. *Stelis deregularis*. 129. *Stelis hypnicola* 130. *Stelis* sp. 131. *Zootrophion atropurpureum*. Escala: 100 μ m.

Discussão

O tamanho das sementes observadas variou de 160 a 842 μm , ou seja, foram encontradas sementes maiores do que a literatura cita para a subtribo (até 300 μm , segundo Pridgeon *et al.* 2005), especialmente no gênero *Acianthera*. As menores sementes foram encontradas em *Platystele* sp. (160 μm), e as maiores em *Acianthera micrantha* (827 μm) e *Acianthera saundersiana* 2 (842 μm). Os menores embriões foram observados em *Platystele* sp. (90 μm) e *Stelis deregularis* (93 μm), e os maiores pertencem a *Acianthera teres* (183 μm).

Em Epidendroideae, as formas mais comuns de semente são fusiforme a oblonga (Chase & Pippen 1990), porém nas Pleurothallidinae estudadas destaca-se a forma clavada, seguida de fusiforme. A literatura ainda indica que as zonas de adesão entre as células da testa na subfamília tendem a ser protegidas por uma camada membranosa, o que se confirmou na maioria das espécies observadas. Também é destacada na literatura a presença de ornamentação nas paredes celulares da testa (Chase & Pippen 1990), que foi encontrada na forma de verrugas em metade das espécies analisadas, sendo que o restante não possui ornamentação alguma.

A presença de ornamentação não é uma característica capaz de delimitar gêneros em Pleurothallidinae, uma vez que foram encontradas espécies com e sem ornamentação dentro de um mesmo gênero. Em outros grupos dentro da mesma subfamília, características da testa podem ser usadas para diferenciar subtribos próximas, como observado por Chase & Pippen (1988), que indicaram que variações na ornamentação das paredes anticlinais das células da testa e extensões dessas células podem ser usadas para diferenciar Oncidiinae, Bifrenariinae e Zygopetalinae.

Ainda observando outros grupos em Epidendroideae, pode-se diferenciar gêneros dentro de uma subtribo pelas características da semente. Tohda (1986) encontrou diferenças entre gêneros de Limodorinae, e também dentro de Listerinae (ambas as subtribos pertencem à tribo Neottieae). Essas diferenças estão associadas principalmente à forma da semente e à ornamentação das células da testa.

Um estudo realizado com 16 espécies de *Liparis*, também pertencente à subfamília Epidendroideae (Tsutsumi *et al.* 2007), mostrou que o tamanho do embrião e o espaço de ar dentro da semente têm relação com o hábito da planta: epífitas têm embriões maiores que as espécies terrícolas e, conseqüentemente, menor espaço de ar dentro da semente, o que pode afetar o transporte dessas sementes pelo vento e sugere uma dispersão menos eficiente entre as epífitas, em comparação com as terrestres. Esse tipo de associação entre o hábito e

características das sementes também não é possível em Pleurothallidinae, pois não foram encontradas características exclusivas para cada hábito.

Os resultados observados não corroboram os dados filogenéticos existentes para a subtribo. Pridgeon & Chase (2001) analisaram seqüências de DNA nuclear e plastidial em 182 táxons. Segundo esse trabalho, *Pleurothallis* e *Stelis* formam um grupo-irmão de *Platystele*, *Specklinia* e *Dryadella*. Estes formam um grupo monofilético com *Masdevallia*. *Octomeria* é um grupo irmão de todas as outras Pleurothallidinae. As características observadas nas sementes não permitem a constituição dos mesmos grupos monofiléticos formados a partir dos dados moleculares, já que uma característica se repete em vários gêneros, e em várias situações ocorre muita variação dentro de um gênero (tabela 2).

Tabela 2: Relação dos gêneros estudados, indicando a ocorrência das principais características observadas nas sementes.

Gêneros	Características observadas							
	Ornamentação (verrugas)		Variação no tamanho das células da testa		Abertura micropilar		Células da testa oblíquas	
	ausente	presente	ausente	presente	ausente	presente	ausente	presente
<i>Acianthera</i>	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Anathallis</i>	X	X	X	X		X	X	
<i>Dryadella</i>		X		X		X	X	
<i>Masdevallia</i>	X			X		X	X	
<i>Myoxanthus</i>		X		X		X	X	
<i>Octomeria</i>	X	X		X		X	X	X
<i>Pabstiella</i>	X			X		X	X	
<i>Platystele</i>		X		X		X	X	
<i>Pleurothallis</i>	X			X		X	X	
<i>Specklinia</i>		X		X		X	X	
<i>Stelis</i>	X	X		X		X	X	
<i>Zootrophion</i>	X			X		X	X	

Analisando os gêneros em que foram estudadas mais de uma espécie, pode-se perceber a variabilidade morfológica que eles possuem. *Acianthera* mostrou-se o gênero com maior variação, com forma da semente bastante distinta em *A. micrantha*, presença de pequenas

verrugas sobre as paredes anticlinais e periclinais das células da testa em *A. recurva*, abertura micropilar ausente em *A. cryptophoranthoides*, *A. micrantha* e *A. saundersiana* 1 e 2, e células da testa de tamanho semelhante entre si em algumas espécies e de tamanho diferente em outras. No gênero *Anathallis*, observou-se verrugas sobre as células da testa em duas das três espécies analisadas, as células da testa não variam de tamanho ao longo da semente somente em *A. obovata*. Em *Octomeria*, somente *O. juncifolia* não possui verrugas sobre as células da testa, e a disposição oblíqua das células da testa em relação ao maior eixo da semente, característica exclusiva desse gênero, só ocorre em duas das quatro espécies estudadas. Nos gêneros em que foi analisada somente uma espécie, as características observadas repetem-se em outros gêneros, ou seja, não os diferenciam.

Quanto ao caso específico de *Acianthera saundersiana*, os dados obtidos reforçam a necessidade de uma revisão do complexo, pois foram encontradas diferenças significativas nas sementes de indivíduos diferentes, reforçando a ideia já existente de que não se trata de uma única espécie. Existem muitas variações nos caracteres vegetativos e florais dentro do que é hoje enquadrado no conceito de *Acianthera saundersiana*, situação que levou à descrição de várias espécies, como *Pleurothallis butantanensis* e *Pleurothallis vinosa* (Schlechter & Hoehne 1926), hoje consideradas sinônimos de *Acianthera saundersiana*. No entanto, o nível de variação encontrada nas sementes dessa espécie indica que, possivelmente, trate-se mais de um complexo de espécies do que de uma única espécie polimorfa.

Conclui-se que as características das sementes são relativamente conservadas dentro da subtribo Pleurothallidinae, e que repetem características já descritas para a subfamília Epidendroideae. Os resultados obtidos não corroboram os dados moleculares. As variações observadas não são informativas a nível genérico, porém podem ser úteis na delimitação de espécies.

Literatura citada

- Aybeke, M.** 2007. Pollen and seed morphology of some *Ophrys* L. (Orchidaceae) taxa. *Journal of Plant Biology* 50(4): 387-395.
- Cameron, K.M. & Chase, M.W.** 1998. Seed morphology of vanilloid orchids (Vanilloideae: Orchidaceae). *Lindleyana* 13(3): 148-169.

- Chase, M.W. & Pippen, J.S.** 1988. Seed morphology in the Oncidiinae and related subtribes (Orchidaceae). *Systematic Botany* 13: 313-323.
- Chase, M.W. & Pippen, J.S.** 1990. Seed morphology and phylogeny in subtribe Catasetinae (Orchidaceae). *Lindleyana* 5: 126-134.
- Dressler, R.L.** 1993. *Phylogeny and classification of the Orchid family*. Cambridge University Press, New York.
- Jeeja, G. & Ansari, R.** 1994. Taxonomic significance of seed surface morphology in Orchidaceae. *Rheedea* 4(1): 48-59.
- Lakon, G.** 1949. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. *Plant Physiology* 24: 389-394.
- Molvray, M. & Chase, M.W.** 1999. Seed morphology. In: A.M. Pridgeon, P.J. Cribb, M.W. Chase & F.N. Rasmussen (eds.). *Genera Orchidacearum*, v. 1. Oxford University Press, New York, pp. 59-66.
- Pridgeon, A.M. & Chase, M.W.** 2001. A phylogenetic reclassification of Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Lindleyana* 16(4): 235-271.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 1999. *Genera Orchidacearum*, v. 1. Oxford University Press, New York.
- Radford, E.A., Dickison, W.C., Massey, J.R. & Bell, C.** 1974. *Vascular plant systematics*. Harper & Row, New York.
- Schlechter, R. & Hoehne, F.C.** 1926. Contribuições ao conhecimento das Orchidáceas do Brasil. *Archivos de Botanica do Estado de São Paulo* 2 (3): 165-349.
- Tohda, H.** 1983. Seed morphology in Orchidaceae I: *Dactylorchis*, *Ponerorchis*, *Chondradenia*, and *Galeorchis*. *Science Reports of the Tohoku Imperial University*, series 4, Biology 38: 253-268.
- Tohda, H.** 1985. Seed morphology in Orchidaceae II: Tribe Cranichideae. *Science Reports of the Tohoku Imperial University*, series 4, Biology 39: 21-43.
- Tohda, H.** 1986. Seed morphology in Orchidaceae III: Tribe Neottieae. *Science Reports of the Tohoku Imperial University*, series 4, Biology 39: 103-119.
- Toscano de Brito, A.L.V.** 1999. Seed Morphology of subtribes Ornithocephalinae and Telipogoninae (Maxillarieae: Orchidaceae). *Lindleyana* 14(1): 27-37.
- Tsutsumi, C., Yukawa, T., Lee, N.S., Lee, C.S. & Kato, M.** 2007. Phylogeny and comparative seed morphology of epiphytic and terrestrial species of *Liparis* (Orchidaceae) in Japan. *Journal of Plant Research* 120(3): 405-412.

- Yam, T.W. & Arditti, J.** 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports* 3: 1-56.
- Ziegler, B.** 1981. Mikromorphologie der Orchideensämen unter Berücksichtigung taxonomischer Aspekte. Tese de doutorado, Ruprecht Karls Universität, Heidelberg.

**CAPÍTULO 2: INFLUÊNCIA DO DÉFICIT HÍDRICO NA
GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO
INICIAL EM TRÊS ESPÉCIES DE PLEUROTHALLIDINAE
(ORCHIDACEAE)**

Resumo- (Influência do déficit hídrico na germinação de sementes e desenvolvimento inicial em três espécies de Pleurothallidinae (Orchidaceae)). A subtribo Pleurothallidinae possui cerca de 4.100 espécies em 36 gêneros, e ocorre somente nas Américas. *Acianthera teres* é rupícola e está exposta à luz e a altas temperaturas. *Octomeria gracilis* e *O. crassifolia* são epífitas em florestas, porém, a primeira ocorre em áreas úmidas e a segunda em locais mais secos. A disponibilidade de água influencia o metabolismo nas diversas fases do crescimento vegetal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do déficit hídrico, induzido pela adição de polietileno glicol 6000 (PEG) ao meio de cultura, na germinação e desenvolvimento inicial em *A. teres*, *O. crassifolia* e *O. gracilis*. As sementes foram semeadas em meio MS/2, sob quatro tratamentos: controle, com 50 g.L⁻¹, 100 g.L⁻¹ e 200 g.L⁻¹ de PEG, induzindo potenciais hídricos de -0,53, -0,70, -0,86 e -1,60 MPa, respectivamente. Foram realizadas análises aos 45, 120 e 180 dias de cultivo. Em *A. teres*, observou-se que menor potencial hídrico do meio resulta em menor taxa de germinação e maior retardo do desenvolvimento inicial das plantas. Em *O. crassifolia*, quanto menor o potencial hídrico do meio, maior a taxa de germinação, contudo, o desenvolvimento foi semelhante entre os tratamentos aos 180 dias. *O. gracilis*, possui certa tolerância à redução do potencial hídrico até 120 dias, e desenvolvimento mais rápido em potenciais hídricos de -0,53 e -0,70 MPa.

Palavras-chave: Estresse hídrico, orquídeas, PEG, potencial hídrico.

Abstract- (Influence of water stress on seed germination and early development in three species of Pleurothallidinae (Orchidaceae)). The subtribe Pleurothallidinae has about 4,100 species in 36 genera, and occurs only in the Americas. *Acianthera teres* is rupicolous, exposed to light and high temperatures. *Octomeria gracilis* and *O. crassifolia* are epiphytes in the forests, but the first grows in moist and the second in drier areas. The availability of water influences the metabolism at different stages of plant growth. The objective of this study was to evaluate the influence of water deficit induced by the addition of polyethylene glycol 6000 (PEG) to the culture medium, in the germination and initial development of *A. teres*, *O. crassifolia* and *O. gracilis*. Seeds were sown on MS / 2 medium under four treatments: control, with 50g.L⁻¹, 100g.L⁻¹ and 200g.L⁻¹ of PEG, inducing water potentials of -0.53, -0.70, -0.86 and -1.60 MPa, respectively. Observations were carried out at 45, 120 and 180 days. In *A. teres* the lower the water potential of the medium, the lower the germination rate, and the greater the delay in development. In *O. crassifolia*, the lower the water potential of the medium, the higher the rate of germination. However, the development almost equaled

between treatments in 180 days. *O. gracilis* has some tolerance to reduced water potential up to 120 days, and it grows faster with water potentials of -0.53 and -0.70 MPa.

Keywords: Water stress, orchids, PEG, water potential.

Introdução

Na natureza, a intensidade e a distribuição das chuvas definem o regime hídrico, influenciando desde o crescimento e a produtividade das plantas até a distribuição das populações e a diversidade vegetal dos ecossistemas. De fato, entre os principais fatores abióticos envolvidos na sobrevivência de espécies epífitas, a umidade é, a curto prazo, o principal fator limitante. Assim, a tolerância ao déficit hídrico nas diversas fases do crescimento das espécies vegetais, incluindo a germinação, pode ser um fator decisivo no seu estabelecimento e sobrevivência e depende em grande parte de características morfológicas, anatômicas e fisiológicas da semente e da planta.

A disponibilidade de água no ambiente influencia as atividades metabólicas dos vegetais. Mesmo em orquídeas epífitas, que geralmente possuem adaptações a ambientes xerofíticos, períodos de seca provocam alterações fisiológicas, como a redução da capacidade fotossintética (Stancato *et al.* 2001). Da mesma forma que a disponibilidade de água influencia o metabolismo de plantas adultas, também influencia a germinação e o desenvolvimento inicial do embrião, retardando-os ou mesmo impedindo que ocorram, como observado por Zhu *et al.* (2006) em sementes de *Pinus sylvestris* L. var. *mongolica* Litv., e por Takaki (1990) em *Oryza sativa* L.

A primeira fase da germinação de sementes é a embebição, uma vez que a presença de água dentro da semente reativa o metabolismo e desencadeia uma sequência de processos fisiológicos, estando envolvida direta e indiretamente em todas as demais etapas da germinação (Marcos Filho 2005). A baixa disponibilidade de água para a embebição atrasa ou impede a germinação, havendo um nível mínimo de hidratação que a semente deve atingir para que os processos ocorram, e que varia de acordo com as características da testa (Verslues *et al.* 2006).

O método mais adequado para quantificar a água disponível para a semente ou planta é determinar o potencial hídrico ou potencial da água (Ψ_w) do meio. O potencial hídrico indica a energia livre da água para a realização de trabalho, e é determinado por quatro componentes: potencial osmótico (Ψ_s), potencial de pressão (Ψ_p), potencial gravitacional (Ψ_g) e potencial matricial (Ψ_m), além de sofrer influência da temperatura (Kramer & Boyer 1995, Kozłowski & Pallardy 1996). O potencial hídrico pode ser manipulado, alterando-se seus componentes, dos quais o potencial osmótico é o mais facilmente modificado, variando com a quantidade de soluto presente no meio.

Michel & Kaufmann (1973) estudaram a influência do polietileno glicol 6000 (PEG) no potencial hídrico da solução, e observaram que o aumento da concentração de PEG na

solução reduz o potencial hídrico. O déficit hídrico pode ser induzido, então, pela redução do potencial hídrico do substrato.

Vários trabalhos sobre a influência do déficit hídrico induzido pela redução do potencial hídrico do meio na germinação de sementes estão disponíveis na literatura. Porém, a maioria desses trabalhos foi realizada com espécies de angiospermas de interesse agrônomo, como *Stylosanthes guianensis* (Delachave *et al.* 1986), arroz (Takaki 1990), soja (Braccini *et al.* 1996), pepino (Torres *et al.* 1999), milho (Martinelli-Seneme *et al.* 2000, Tonin *et al.* 2000), milho-pipoca (Moterle *et al.* 2006, 2008) e sorgo forrageiro (Oliveira & Gomes-Filho 2009) ou nativas lenhosas, como *Pinus* (Zhu *et al.* 2006). Também foram encontrados na literatura alguns trabalhos com plantas herbáceas nativas, como algumas Bromeliaceae (Mantovani & Iglesias 2008, 2010).

Apesar da distribuição cosmopolita, com espécies altamente adaptadas a ambientes xerofíticos, nenhum trabalho sobre a influência do potencial hídrico do meio na germinação de sementes de Orchidaceae foi encontrado, a qual apresenta plantas com diferentes exigências ecológicas. Os poucos trabalhos encontrados na literatura envolvendo orquídeas e déficit hídrico foram realizados com plantas adultas, expostas a períodos de seca, com o objetivo de observar alterações fisiológicas (Zotz & Tyree 1996, Stancato *et al.* 2001).

As espécies selecionadas para o presente estudo, *Acianthera teres* (Lindl.) Luer, *Octomeria crassifolia* Lindl. e *Octomeria gracilis* Lodd. ex Lindl., pertencem à subtribo Pleurothallidinae (família Orchidaceae, subfamília Epidendroideae, tribo Epidendreae). São características comuns às três espécies: crescimento simpodial, cauloma não espessado em pseudobulbo, uma folha carnosa ou coriácea por cauloma, flores com sépalas semelhantes entre si, ovário articulado com o pedicelo, cápsula cilíndrica a fusiforme, semente clavada a elipsóide com abertura na extremidade micropilar e embrião elipsóide.

As espécies estudadas, apesar de próximas filogeneticamente e com muitas semelhanças morfológicas entre si, crescem em ambientes distintos e possuem necessidades hídricas diferenciadas, de forma que devem responder de maneira diferenciada a situações de déficit hídrico.

O objetivo deste trabalho foi observar a influência do déficit hídrico, simulado por adição de polietileno glicol (PEG) no meio de cultura, na germinação e no desenvolvimento inicial de sementes de três espécies de Pleurothallidinae, que ocorrem em ambientes com diferentes graus de disponibilidades de água.

Material e Métodos

As sementes para análise foram obtidas, por polinização manual ou natural, de plantas vivas provenientes da coleção do Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado, das quais posteriormente foi herborizada uma amostra para constituir o material testemunho (tabela 1), que foi depositado no Herbário do Estado “Maria Eneyda P. Kauffman Fidalgo” (SP). Os frutos em início de deiscência foram coletados e as sementes foram acondicionadas em envelopes de papel manteiga no interior de recipientes plásticos hermeticamente fechados e armazenados a cerca de -5 °C até o momento da sementeira. A identificação do material foi feita a partir da consulta de literatura especializada, como floras e revisões, e comparação com material de herbário previamente identificado.

Tabela 1: Material examinado.

Espécie	Número de registro na coleção viva do Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado	Material depositado em herbário
<i>Acianthera teres</i> (Lindl.) Luer	P1278	<i>L.R.S. Guimarães & T.L. Laitano 54</i> (SP)
<i>Octomeria crassifolia</i> Lindl.	3766 10203D 12849	<i>F. Barros s.n.</i> (SP 401874) <i>F. Barros s.n.</i> (SP 401865) <i>F. Barros s.n.</i> (SP 401845)
<i>Octomeria gracilis</i> Lood. ex Lindl.	1032 1905 1908 4994	<i>A.P.P. Barbero 62</i> (SP) <i>A.P.P. Barbero 61</i> (SP) <i>A.P.P. Barbero 60</i> (SP) <i>A.P.P. Barbero 59</i> (SP)

Foram selecionadas espécies ocorrentes em ambientes com disponibilidade hídrica bastante variada: *Acianthera teres* é uma espécie rupícola, de folhas sub-cilíndricas, inflorescência em racemo e flores alaranjadas, ocorrente em campos rupestres da Cadeia do Espinhaço (Minas Gerais e Bahia). Nesse ambiente os principais fatores causadores de estresse são a alta radiação solar, já que a escassez de plantas arbóreas permite que as rochas atinjam altas temperaturas e, por consequência, provocando seca ambiente pela alta evaporação. *Octomeria crassifolia* é epífita, de folhas planas e coriáceas e flores amarelas, sendo encontrada na Mata Atlântica, no alto dos ramos das árvores, exposta à luz e ao vento,

de modo que seu microhabitat é seco em relação a outros na mesma área de mata. *Octomeria gracilis* é uma espécie delicada, de folhas semi-cilíndricas e pequenas flores amarelas. É encontrada na Mata Atlântica, como epífita em ramos baixos e protegidos da luz direta na mata densa, portanto em um microhabitat mais úmido e sombreado quando comparado ao das outras duas espécies aqui estudadas.

As sementes foram cultivadas *in vitro*, em meio MS (Murashige & Skoog 1962), com metade da concentração de macro e micronutrientes (meio MS/2), com o pH regulado para $5,8 \pm 0,05$, um dos meios mais usados para cultivo de sementes de Orchidaceae, cuja formulação é indicada na tabela 2.. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 120 °C e 1,3 atm durante 15 minutos.

Tabela 2: Composição do meio de cultura MS/2.

COMPONENTE		QUANTIDADE (g/L)
Macronutrientes	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,220
	KH ₂ PO ₄	0,085
	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,185
	KNO ₃	0,950
	(NH ₄)NO ₃	0,825
Solução de Fe-EDTA	FeSO ₄ 7H ₂ O	0,0139
	Na ₂ EDTA	0,0186
Micronutrientes	H ₃ BO ₃	0,0031
	MnSO ₄ 4H ₂ O	0,01115
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,0043
	KI	0,000415
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,000125
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,0000125
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,0000125
Açúcar	Sacarose	30
Agente gelificante	Phytigel	3,0

A viabilidade das sementes foi verificada através do método de coloração com tetrazólio (Lakon 1949), que consiste em imergir amostras de sementes, previamente embebidas em água durante 30 minutos, em uma solução aquosa (0,5%) de cloreto de 2, 3, 5 trifenil-tetrazólio. Este corante é incolor e em contato com as células vivas do embrião, estas adquirem a coloração vermelha, indicando as sementes viáveis; as células mortas não reagem

com o corante mantendo a coloração branca dos embriões de sementes não viáveis. Dessa forma, foi possível determinar a porcentagem de sementes viáveis de cada espécie estudada, levando-se sem conta a relação de sementes viáveis e o total de sementes analisadas.

Para a avaliação da germinabilidade as sementes, submetidas a quatro diferentes potenciais hídricos, que foram obtidos pela adição de polietileno glicol (PEG 6000) durante o preparo do meio de cultura, conforme estabelecido por Michel & Kaufmann (1973), nas concentrações de 0 g.L⁻¹ (controle, tratamento 1), 50 g.L⁻¹ (tratamento 2), 100 g.L⁻¹ (tratamento 3) e 200 g.L⁻¹ (tratamento 4) de meio de cultura, que induziram potenciais hídricos médios de -0,53, -0,70, -0,86 e -1,60 MPa, respectivamente. Os potenciais hídricos dos meios de cultura foram obtidos utilizando-se um psicrômetro de ponto de orvalho (modelo WP4 Dew Point Meter, Decagon Devices, Pullman - EUA).

Previamente à semeadura, as sementes foram embebidas em água destilada esterilizada, tratadas com uma solução de água sanitária comercial (Candida®) a 15% por 10 minutos, para desinfestação, e lavadas três vezes em água destilada esterilizada. A vidraria utilizada foi esterilizada em autoclave a 120 °C e 1,3 atm durante 30 minutos.

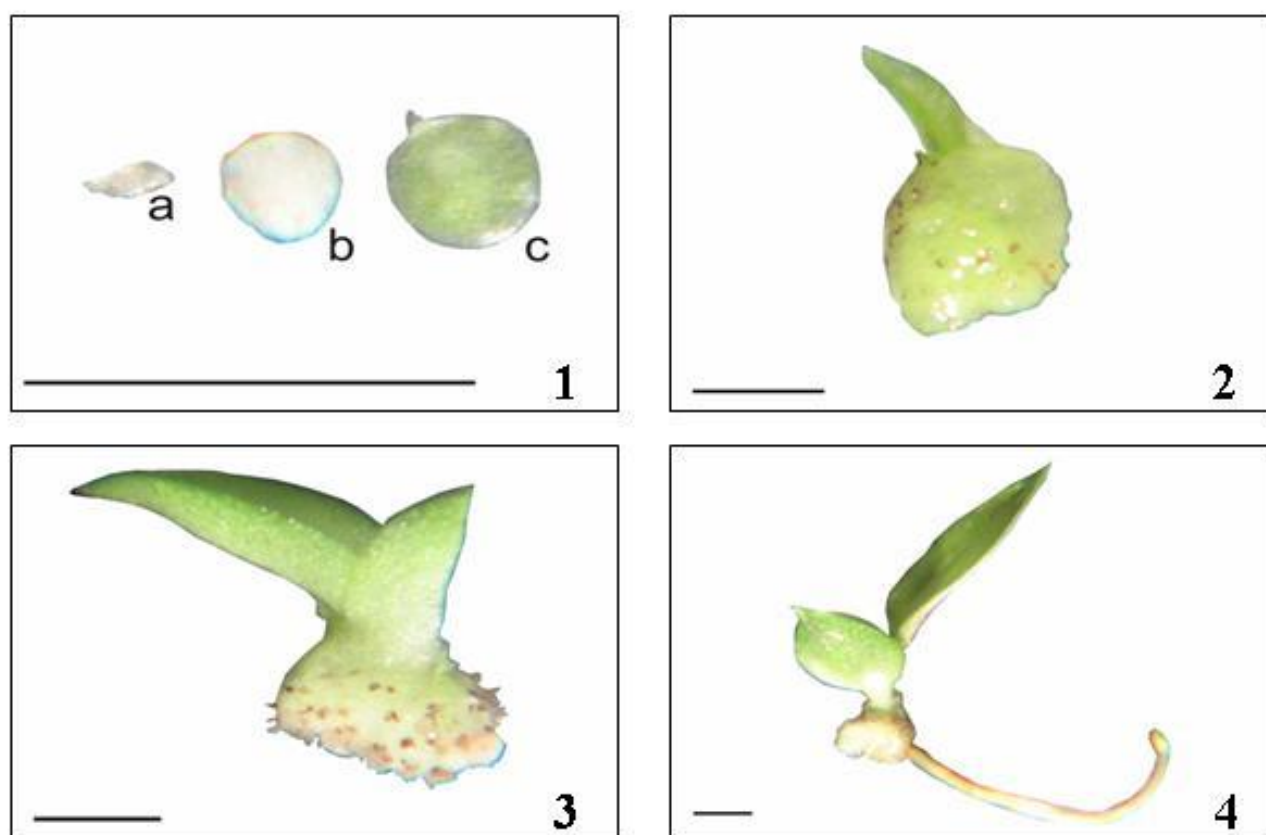
Para cada tratamento foram feitas três repetições. As culturas foram mantidas a 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de aproximadamente 20 µmol.m⁻².s⁻¹, obtida com lâmpadas fluorescentes.

Com a finalidade de observar o desenvolvimento das sementes, desde o início da germinação, a formação de protocormos, diferenciação de tecidos, até o surgimento da primeira estrutura semelhante a folha, a emissão de folhas e raízes, houve acompanhamento periódico do desenvolvimento, sendo realizadas análises aos 45, 120 e 180 dias após a inoculação das sementes. Em cada uma das análises, os frascos de cultura foram abertos em câmara de fluxo laminar, e foram retiradas duas amostras de cada frasco. Cada amostra foi colocada sobre lâmina de vidro quadriculada, em uma área de 2 cm², e analisada em estereomicroscópio, segundo Suzuki *et al.* (2009).

Foi observada, na primeira análise a taxa de germinabilidade (porcentagem de embriões vivos), considerando-se como germinadas, as sementes com embriões clorofilados, e nas análises aos 120 e 180 dias foram observadas as porcentagens de sementes/protocormos em cada uma das cinco fases de desenvolvimento inicial consideradas nesse trabalho (modificado de Milaneze 1997 e Stewart & Kane 2006), descritas na tabela 3.

Tabela 3: Fases de desenvolvimento das sementes inoculadas.

FASES	CARACTERÍSTICAS
0	Semente cujo embrião não se desenvolveu (figura 1a)
1	Protocormo desenvolvido, mas morto (figura 1b)
2	Protocormo vivo (figura 1c)
3	Plântula com uma estrutura semelhante a folha (figura 2)
4	Plântula com duas ou mais folhas (figura 3)
5	Plântula com folhas e raízes (figura 4)



Figuras 1-4: Fases de desenvolvimento observadas em *Acianthera teres*, *Octomeria crassifolia* e *Octomeria gracilis*. 1a. Fase 0 (semente não germinada). 1b. Fase 1 (protocormo morto). 1c. Fase 2 (protocormo vivo, sem estruturas diferenciadas). 2. Fase 3 (plântula com a primeira estrutura semelhante a folha). 3. Fase 4 (plântula com duas ou mais folhas). 4. Fase 5 (plântula com folha e raiz). Escalas: 1 mm.

Resultados e Discussão

Nas três espécies estudadas, a análise de germinabilidade realizada aos 45 dias de cultivo revelou embriões vivos, clorofilados, porém sem diferenciação de estruturas semelhantes a folhas e tampouco presença de raízes. Foram observadas somente estruturas intumescidas, arredondadas ou cônicas. As sementes que não germinaram apresentavam embriões não clorofilados, de coloração branca. Foram verificados ainda a ocorrência de sementes que germinaram, iniciaram o desenvolvimento em protocormos e morreram em seguida, apresentando coloração branca, tons de castanho e marrom (figura 1b).

Aos quatro meses de cultivo, nas três espécies, foram encontrados protocormos com uma ou mais estruturas semelhantes a folhas, porém sem emissão das raízes, presença de tricomas na porção basal de vários indivíduos (figura 3). Essas estruturas absorvem água e nutrientes, além de ser importante para a fixação do protocormo no substrato (Kraus *et al.* 2006).

Aos seis meses de cultivo, alguns indivíduos de *Acianthera teres* apresentaram raízes no tratamento 1, e em *Octomeria gracilis* foram observadas raízes em indivíduos nos tratamentos 1 e 2, o que não ocorreu nos tratamentos 3 e 4. *Octomeria crassifolia* mostrou desenvolvimento mais lento, não apresentando raízes em nenhum dos tratamentos até os 6 meses de cultivo.

As três espécies apresentaram comportamentos germinativos distintos entre si, mostrando-se adaptadas aos ambientes em que ocorrem. A morfologia das sementes não influencia o comportamento germinativo, já que as sementes das três espécies são semelhantes entre si (Barbero & Barros, dados não publicados).

O tratamento 4 inibiu a germinação nas três espécies estudadas, possivelmente o potencial hídrico do meio é muito negativo (-1,60 MPa) e impede a ativação do metabolismo do embrião. Mesmo as poucas sementes que embeberam e iniciaram seu desenvolvimento, não conseguiram atingir as etapas seguintes da germinação: houve alta taxa de mortalidade e os indivíduos que sobreviveram, mantiveram-se na fase 2 de desenvolvimento, sem a diferenciação de estruturas. Delachiave *et al.* (1986) e Torres *et al.* (1999) observaram que a redução do potencial hídrico do meio reduz a embebição. O aumento da concentração de solutos provoca a diminuição do gradiente hídrico no sistema substrato-semente, bloqueando o movimento da água e, conseqüentemente, reduzindo a velocidade de germinação (Torres *et al.* 1999). Segundo Dell'Aquila & Spada (1992), se o potencial hídrico do substrato de germinação de sementes de trigo for inferior a -1,5 MPa, a síntese protéica no embrião é

reduzida, pois é um processo sensível à disponibilidade hídrica e consequentemente não há o desenvolvimento dos tecidos..

Em *Acianthera teres*, observou-se que a redução no potencial hídrico do meio diminuiu a taxa de germinação (figura 5). Esse resultado é semelhante ao encontrado na literatura para as bromélias terrestres de restinga *Aechmea nudicaulis*, *Neoregelia cruenta* e *Vriesia neoglutinosa* (Mantovani & Iglesias 2008, 2010), e também para *Oryza sativa* (Takaki 2008) e *Clusia hilariana* (Cavalcante *et al.* 2010). No sorgo forrageiro, observou-se que a germinação ocorre, porém é retardada pela diminuição do potencial hídrico do meio (Oliveira & Gomes-Filho 2009). Em espécies que não possuem adaptação ao déficit hídrico, esse tipo de comportamento é esperado, uma vez que baixos potenciais hídricos indicam pouca água disponível para a realização de trabalho na planta, impedindo que a sequência de eventos da germinação ocorra ou tornando o metabolismo mais lento que em condições ótimas.

Aos quatro meses de cultivo de *Acianthera teres*, observou-se que a taxa de sementes que não germinaram aumentou com a diminuição do potencial hídrico do meio e que, à medida que o potencial diminuiu, o desenvolvimento dos protocormos vivos foi mais lento, o que é evidenciado pela porcentagem de indivíduos nas fases 2, 3 e 4 (figura 6). O retardo no desenvolvimento, à medida que se reduz o potencial hídrico do meio, também é evidente na análise realizada aos seis meses de cultivo (figura 7). Observou-se desenvolvimento mais homogêneo no tratamento 1, com todas as plântulas vivas com duas ou mais folhas, e algumas apresentando raízes. No tratamento 2 havia indivíduos vivos com uma ou mais estruturas semelhantes a folhas, no entanto, sem presença de raízes, e no tratamento 3, a heterogeneidade e o retardo no desenvolvimento foi ainda maior, com indivíduos vivos sem estruturas diferenciadas, com uma, duas ou mais estruturas semelhantes a folha. No tratamento 4, a germinabilidade atingiu apenas 20% e os protocormos sobreviventes não desenvolveram estruturas diferenciadas (folhas, raízes). Esses resultados indicam que *A. teres*, apesar de ser rupícola, não é adaptada ao déficit hídrico.

Octomeria crassifolia e *O. gracilis*, embora epífitas e semelhantes morfológicamente, apresentaram comportamento diferente entre si em relação à variação de potencial hídrico do meio de cultura. Aos 45 dias de cultivo percebe-se que a porcentagem de germinação aumentou em *O. crassifolia* à medida que o potencial hídrico do meio diminuiu até -0,86 MPa, que foi o potencial hídrico que induziu a maior porcentagem de germinação de sementes (figura 8).

A porcentagem de germinação de *Octomeria gracilis* (figura 11) foi semelhante nos três primeiros tratamentos, indicando que a espécie apresenta relativa tolerância à diminuição do potencial hídrico do meio até -0,86 MPa, apesar de a porcentagem de germinação ser

menor em relação à *O. crassifolia*. Tolerância semelhante foi observada por Moterle *et al.* (2006, 2008) no cultivar BRS-Angela e em dois híbridos de milho-pipoca (SC 002 x BRS-Angela e Zélia x BRS-Angela), e atribuíram tal tolerância ao fato de que o cultivar BRS-Angela apresenta grande número de genótipos e, conseqüentemente, grande plasticidade genética frente a variações ambientais.

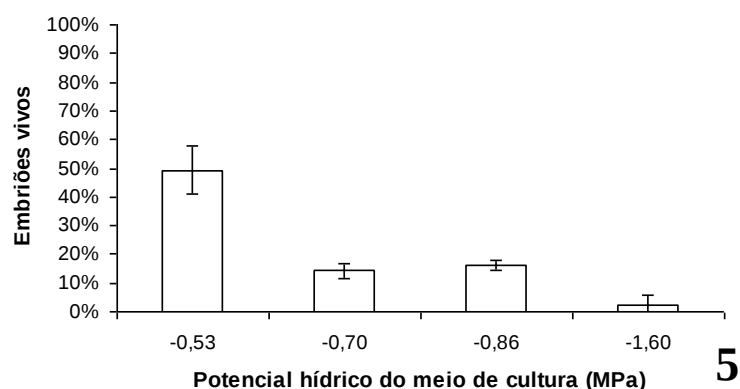
Aos quatro meses de cultivo de *Octomeria crassifolia*, observaram-se altas taxas de mortalidade nos tratamentos 1 e 2, e o tratamento 3 (-0,86 MPa) mostrou-se o mais adequado para o desenvolvimento dos protocormos, com a maior porcentagem de indivíduos vivos, e também com uma ou mais estruturas semelhantes a folha (figura 9). Porém, aos seis meses, observou-se maior taxa de mortalidade nesse tratamento, atingindo os mesmos níveis de -0,53 e 0,70 MPa (figura 10), o que indica que o potencial hídrico de -0,86 MPa é adequado para a germinação e o desenvolvimento inicial até o quatro mês, mas dificulta o estabelecimento da plântula. Não foram encontrados na literatura trabalhos envolvendo a influência do potencial hídrico do meio de cultura na germinação de sementes com resultados semelhantes aos observados para *O. crassifolia*.

Em *Octomeria gracilis*, aos quatro meses de cultivo, observou-se que no tratamento 3 houve menor taxa de mortalidade de protocormos, porém com um retardo no desenvolvimento em relação aos tratamentos 1 e 2 (figura 12). O tratamento 1 apresentou desenvolvimento mais rápido e homogêneo, com a maior porcentagem de protocormos vivos com duas ou mais folhas dentre todos os tratamentos. Já aos seis meses de cultivo, a taxa de mortalidade aumentou muito no tratamento 3, e os tratamentos 1 e 2 apresentaram os melhores resultados, com altas taxas de indivíduos com duas ou mais folhas, e com alguns indivíduos apresentando raízes (figura 13). Os resultados indicam que o potencial hídrico -0,86 MPa é o mais adequado para o desenvolvimento até o quarto mês de cultivo, porém provoca maior taxa de mortalidade a partir do quarto mês, prejudicando o estabelecimento da plântula. Dessa forma, a longo prazo, os potenciais hídricos nos quais há melhor desenvolvimento são -0,53 e -0,70 MPa.

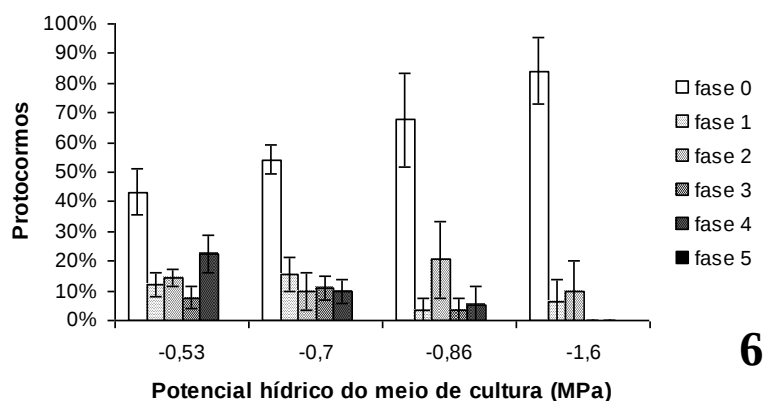
Com base no exposto, percebe-se que os comportamentos germinativos das duas espécies de *Octomeria* são diferentes, sendo os resultados compatíveis com os ambientes em que elas ocorrem. *O. crassifolia* ocorre em microhabitat mais aberto e seco, e germina melhor em potenciais mais baixos; já *O. gracilis*, ocorre em ambiente mais fechado e úmido, mas sujeito a períodos de seca, como todas as epífitas, de forma que a tolerância ao estresse hídrico é fundamental para sua sobrevivência. Porém o desenvolvimento e estabelecimento das plântulas até o sexto mês de cultivo são semelhantes entre as duas espécies, sendo prejudicados pelos potenciais hídricos mais baixos.

Já *Acianthera teres*, apesar de ser rupícola, não é mais adaptada ao déficit hídrico do que as outras espécies. Isso pode ser explicado pelo fato de que, em campos rupestres, onde a espécie ocorre, as principais causas de estresse são o excesso de radiação solar e as altas temperaturas que as rochas alcançam ao longo do dia. O déficit hídrico pode ser amenizado pela neblina que ocorre com frequência na área, o que deve compensar a alta taxa de evaporação nos horários de maior radiação solar. Outra hipótese é de que a deiscência dos frutos e a dispersão das sementes ocorra na estação chuvosa, evitando assim situações de estresse hídrico durante o período de germinação. Porém não foram realizados estudos sobre dispersão dessas sementes até o momento, que possam esclarecer essa questão.

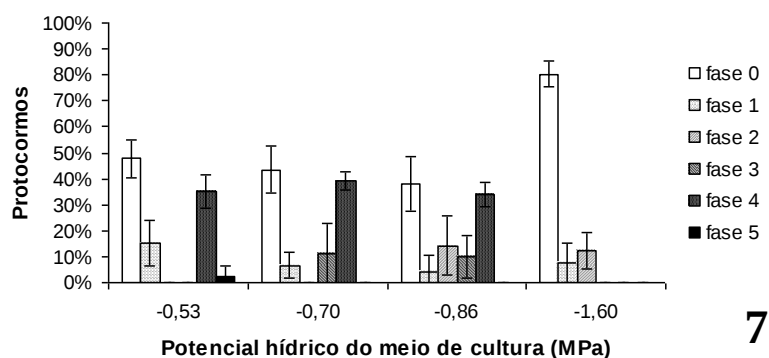
***Acianthera teres* - 45 dias de cultivo**



***Acianthera teres* - 4 meses de cultivo**

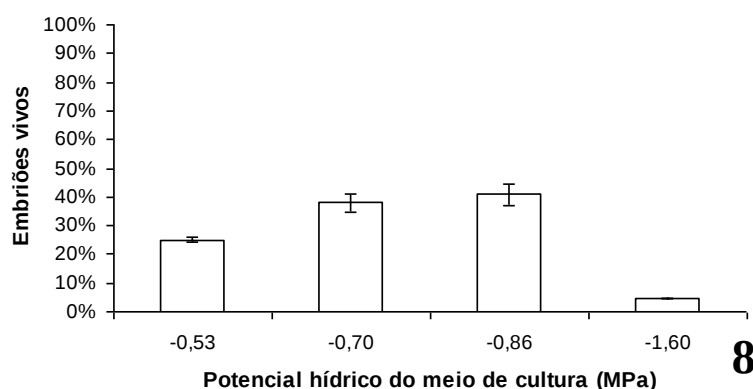


***Acianthera teres* - 6 meses de cultivo**



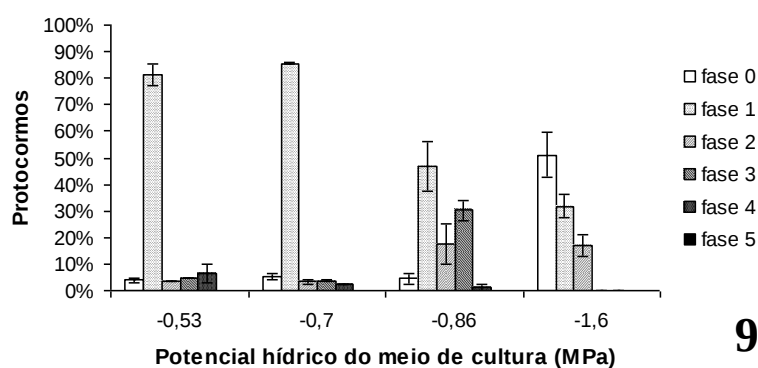
Figuras 5-7. Gráficos representando a germinação e desenvolvimento inicial de *Acianthera teres* em meios de cultura com potenciais hídricos diferentes. 5. Aos 45 dias de cultivo, representando a porcentagem de indivíduos vivos em cada tratamento. 6. Aos quatro meses de cultivo, indicando a porcentagem de indivíduos em cada uma das fases de desenvolvimento para os quatro tratamentos. 7. Aos seis meses de cultivo, indicando a porcentagem de indivíduos em cada uma das fases de desenvolvimento para os quatro tratamentos.

***Octomeria crassifolia* - 45 dias de cultivo**



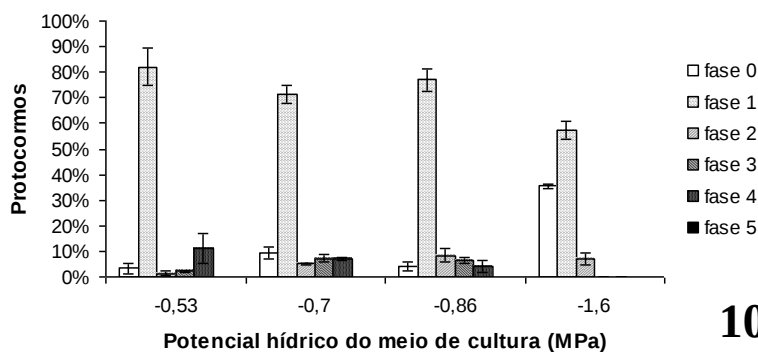
8

***Octomeria crassifolia* - 4 meses de cultivo**



9

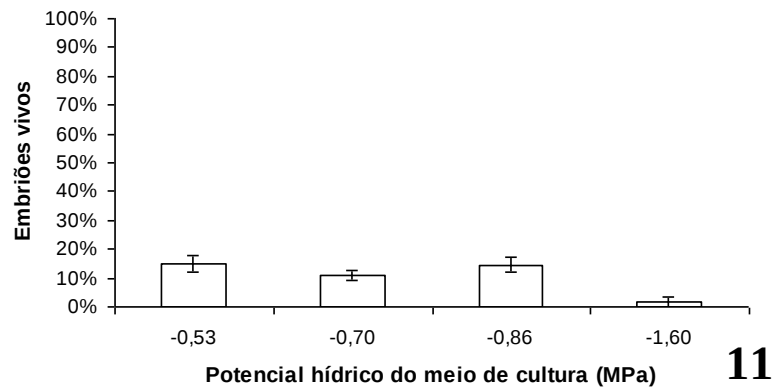
***Octomeria crassifolia* - 6 meses de cultivo**



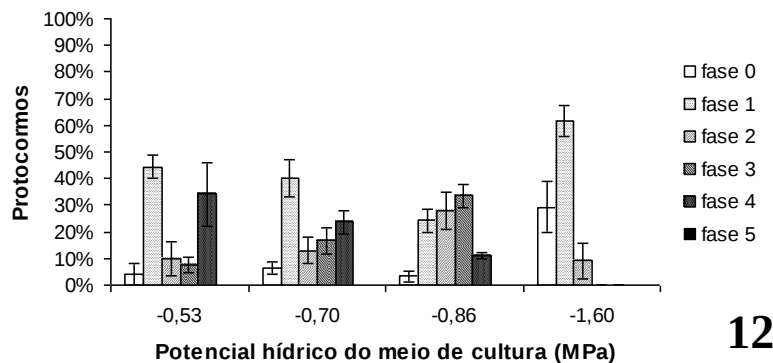
10

Figuras 8-10. Gráficos representando a germinação e o desenvolvimento inicial de *Octomeria crassifolia* em meios de cultura com potenciais hídricos diferentes. 8. Aos 45 dias de cultivo, representando a porcentagem de indivíduos vivos em cada tratamento. 9. Aos quatro meses de cultivo, indicando a porcentagem de indivíduos em cada uma das fases de desenvolvimento para os quatro tratamentos. 10. Aos seis meses de cultivo, indicando a porcentagem de indivíduos em cada uma das fases de desenvolvimento para os quatro tratamentos.

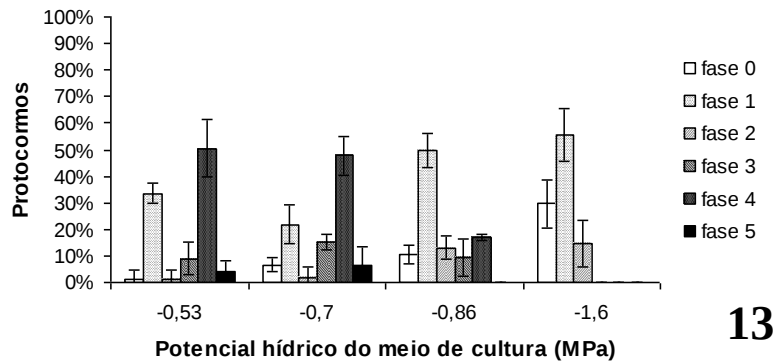
***Octomeria gracilis* - 45 dias de cultivo**



***Octomeria gracilis* - 4 meses de cultivo**



***Octomeria gracilis* - 6 meses de cultivo**



Figuras 11-13. Gráficos representando a germinação e desenvolvimento inicial de *Octomeria gracilis* em meios de cultura com potenciais hídricos diferentes. 11. Aos 45 dias de cultivo, representando a porcentagem de indivíduos vivos em cada tratamento. 12. Aos quatro meses de cultivo, indicando a porcentagem de indivíduos em cada uma das fases de desenvolvimento para os quatro tratamentos. 13. Aos seis meses de cultivo, indicando a porcentagem de indivíduos em cada uma das fases de desenvolvimento para os quatro tratamentos.

Literatura citada

- Braccini, A.L., Ruiz, H.A., Braccini, M.C.L. & Reis, M.S.** 1996. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de cloreto de sódio, manitol e polietileno glicol. *Revista Brasileira de Sementes* 18(1): 10-16.
- Cavalcante, A., Braz, M.I.G. & Mattos, E.A.** 2010. Germination biology and seedling growth of *Clusia hilariana* Schltdl., a dominant CAM-tree of drought-prone sandy coastal plains. *Ecological Research* 25: 781-787.
- Delachave, M.E.A., Rodrigues, J.D., Moraes, J.A.P.V., Pedras, J.F., Rodrigues, S.D. & Boaro, C.S.F.** 1986. Germinação de sementes de *Stylosanthes guianensis*. IV – Potencial água e embebição. *Revista Brasileira de Sementes* 8(3): 55-61.
- Dell'Aquila, A. & Spada, P.** 1992. Regulation of protein synthesis in germinating wheat embryos under polyethylene glycol and salt stress. *Seed Science Research* 2(2): 75-80.
- Kozlowski, T.T. & Pallardy, S.G.** 1996. *Physiology of wood plants*. Academic Press, San Diego.
- Kramer, P.J. & Boyer, J.S.** 1995. *Water relations of plants and soils*. Academic Press, San Diego.
- Kraus, J.E., Kerbauy, G.B. & Monteiro, W.R.** 2006. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb.f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. *Hoehnea* 33: 177-184.
- Lakon, G.** 1949. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. *Plant Physiology* 24: 389-394.
- Mantovani, A. & Iglesias, R.R.** 2008. Factors limiting seed germination of terrestrial bromeliads in the sandy coastal plains (restinga) of Maricá, Rio de Janeiro, Brazil. *Rodriguésia* 59(1): 135-150.
- Mantovani, A. & Iglesias, R.R.** 2010. The effect of water stress on seed germination of three terrestrial bromeliads from *restinga*. *Revista Brasileira de Botânica* 33(1): 201-205.
- Marcos Filho, J.** 2005. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. FEALQ, Piracicaba.
- Martinelli-Seneme, A., Martins, C.C. & Nakagawa, J.** 2000. Germinação de milho cv. AL-34 em função do tamanho da semente e do potencial hídrico do substrato. *Revista Brasileira de Sementes* 22(2): 126-130.
- Michel, B.E. & Kaufmann, M.R.** 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51: 914-916.
- Milaneze, A.M.** 1997. Estudos em orquídeas nativas do Brasil: morfologia de sementes e

- cultivo assimbiótico. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Moterle, L.M., Lopes, P.C., Braccini, A.L. & Scapim, C.A.** 2006. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de cultivares de milho-pipoca submetidas ao estresse hídrico e salino. *Revista Brasileira de Sementes* 28(3): 169-176.
- Moterle, L.M., Scapim, C.A., Braccini, A.L., Rodovalho, M.A. & Barreto, R.R.** 2008. Influência do estresse hídrico sobre o desempenho fisiológico de sementes de híbridos simples de milho-pipoca. *Ciência e Agrotecnologia* 32(6): 1810-1817.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Oliveira, A.B. & Gomes-Filho, E.** 2009. Germinação e vigor de sementes de sorgo forrageiro sob estresse hídrico e salino. *Revista Brasileira de Sementes* 31(3): 48-56.
- Stancato, G.C., Mazzafera, P. & Buckeridge, M.S.** 2001. Effect of a drought period on the mobilization of non-structural carbohydrates, photosynthetic efficiency and water status in an epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry* 39(1): 1009-1016.
- Stewart, S.L. & Kane, M.E.** 2006. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae) a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 147-158.
- Suzuki, R.M., Moreira, V.C., Nakabashi, M. & Ferreira, W.M.** 2009. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. *Hoehnea* 36(4): 657-666.
- Takaki, M.** 2008. Effect of water stress on seed germination and seedling growth in *Oryza sativa* L. *Biologia Plantarum* 32(3): 238-240.
- Tonin, G.A., Carvalho, N.M., Kronka, S.N. & Ferraudo, A.S.** 2000. Influência do cultivar e do vigor no desempenho germinativo de sementes de milho em condições de estresse hídrico. *Revista Brasileira de Sementes* 22(1): 276-279.
- Torres, S.B., Vieira, E.L. & Marcos-Filho, J.** 1999. Efeitos do estresse hídrico na germinação e no desenvolvimento de plântulas de pepino. *Revista Brasileira de Sementes* 21(2): 59-63.
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. & Zhu, J.K.** 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stress that affect plant water status. *The Plant Journal* 45(4): 523-539.
- Zhu, J., Kang, H., Tan, H. & Xu, M.** 2006. Effects of drought stresses induced by polyethylene glycol on germination of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* seeds from

natural and plantation forests on sandy land. Journal of Forest Research 11(5): 319-328.

Zotz, G. & Tyree, M.T. 1996. Water stress in the epiphytic orchid, *Dimerandra emarginata* (G. Meyer) Hoehne. Oecologia: 151-159.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No estudo de morfologia da semente, foram avaliadas espécies de 12 gêneros, ou seja, 1/3 dos gêneros da subtribo. Foram estudados os gêneros com maior representatividade no Brasil. Essa análise proporcionou o conhecimento de informações novas sobre Pleurothallidinae, como por exemplo, que a variação do tamanho das sementes é muito maior que o conhecido até então. Evidenciou também que a subtribo possui sementes com características da subfamília Epidendroideae, como a presença de ornamentações nas paredes das células da testa e as zonas de adesão protegidas por uma camada membranosa, reforçando o uso dessas características da semente na delimitação de táxons superiores. No entanto, não foram encontradas características capazes de auxiliar o estudo filogenético dentro da subtribo Pleurothallidinae e corroborar dados moleculares, uma vez que várias características se conservam dentro da subtribo. As variações morfológicas observadas nas sementes das espécies estudadas não são úteis para a diferenciação de gêneros, porém podem ajudar a identificar espécies dentro de um mesmo gênero.

Quanto ao segundo enfoque desse trabalho, as três espécies estudadas mostraram comportamento germinativo e desenvolvimento inicial distintos entre si. *Acianthera teres*, apesar de ser rupícola, não é adaptada ao déficit hídrico, pois pode ser que o déficit hídrico, provocado pelo excesso de radiação e pelas altas temperaturas do substrato em alguns momentos do dia, seja amenizado pela neblina que ocorre com frequência na área. Outra hipótese é que a deiscência dos frutos e disseminação das sementes ocorram somente no período de maior pluviosidade e consequentemente de maior disponibilidade hídrica. *Octomeria crassifolia*, epífita em microhábitat mais aberto e seco na floresta, germina melhor em meios de cultura com potenciais hídricos mais baixos. *Octomeria gracilis*, epífita em ambientes mais fechados e úmidos na floresta, apresenta certa tolerância à seca, mantendo a taxa de germinação mesmo em meios de cultura com potenciais hídricos baixos.

Não foi observada nenhuma relação entre o comportamento germinativo e a morfologia das sementes, uma vez que não há nenhuma diferença morfológica significativa entre as sementes que justifique as diferentes respostas ao estresse hídrico apresentadas pelas três espécies estudadas.