

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JÉSSICA FERREIRA DE LIMA

PLASTICIDADE ESTRUTURAL DAS RAÍZES DA HEMIEPÍFITA *Vanilla bahiana* HOEHNE (ORCHIDACEAE) EM FUNÇÃO DE SUAS MUDANÇAS FUNCIONAIS

DRA. ANA SILVIA FRANCO PINHEIRO MOREIRA
ORIENTADORA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Uberlândia - MG
Novembro - 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PLASTICIDADE ESTRUTURAL DAS RAÍZES DA HEMIEPÍFITA *Vanilla bahiana* HOEHNE (ORCHIDACEAE) EM FUNÇÃO DE SUAS MUDANÇAS FUNCIONAIS

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
submetido à Universidade Federal de
Uberlândia como requisito necessário para
obtenção do Título de Licenciatura em Ciências
Biológicas.

Uberlândia, 26 de novembro de 2019.

Profa. Dra. Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira.

INBIO/UFU

Profa. Dra. Diana Salles Sampaio

INBIO/UFU

Prof. Dr. Vinicius Coelho Kuster

UFG/Jataí

Uberlândia - MG

Novembro – 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por tudo que vivenciei durante minha caminhada, pelas oportunidades, pelas pessoas que conheci e por sempre ter guiado os meus passos no caminho.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal –LAFIVE e à Universidade Federal de Uberlândia por fazer esse trabalho possível.

Sou muito grata pela minha orientadora Prof^ª. Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira, uma grande professora, pela oportunidade, pela paciência, carinho, dedicação e ensinamentos. Assim como pelos momentos de descontração, incentivos e conselhos.

Aos meus companheiros de laboratório Aldineia, Wesley, Phabliny, Uiara e Pedro, que me abraçaram desde o primeiro dia, sempre me ajudando durante as coletas, análises e dúvidas, que não foram poucas. Muito obrigada pelos momentos de descontração, incentivo, risadas e ensinamentos.

Agradeço à minha mãe Luciene, um exemplo de grande mulher, batalhadora, forte, alegre; ao meu padrasto João Batista e ao meu irmão Nikson, por sempre acreditarem em mim, me apoiando e incentivando em minhas decisões.

Aos meus amigos que sempre me ajudaram e permaneceram do meu lado em todos os momentos, sendo estes bons ou ruins, de alegria ou tristeza. Me animando e dando força para continuar, principalmente à Lidiane e o Henrique, que me acompanharam desde o início. Sou grata pelos momentos que passamos juntos conversando e rindo enquanto esperamos o ônibus para irmos para casa. Pelas palavras ditas com sabedoria, carinho e fé, sempre me ajudando a ver o lado bom das coisas e a ter esperança que tudo daria certo no final.

Sou grata pelas novas amizades que foram sendo construídas com o tempo e que ficarão marcadas para sempre em minha vida. Em especial à Rosi, não tenho palavras para expressar a minha gratidão, pelos momentos de alegria, risos (muitas vezes sem sentido), pelos conselhos e palavras de consolo e animo. Com certeza sua amizade tornou as coisas mais fáceis.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT	7
Introdução	9
Materiais e métodos	11
<i>Área de estudo e espécie vegetal</i>	11
<i>Análises estruturais</i>	12
<i>Análises histoquímicas</i>	13
<i>Análises dos dados</i>	14
Resultados.....	15
<i>Análises da morfologia e anatomia radicular</i>	15
<i>Índice de plasticidade fenotípica</i>	18
Discussão	24
Conclusão	28
Referências	28

RESUMO

O ambiente epifítico oferece várias vantagens para plantas, destacando-se a maior disponibilidade de luz no dossel. Entretanto, esta vantagem vem acompanhada por limitações na disponibilidade de água e nutrientes. As Orchidaceae são bem-sucedidas nesse contexto, evidenciando estratégias dos órgãos vegetativos para suprir a deficiência de água. Por exemplo, estas plantas desenvolvem um sistema radicular complexo, com uma epiderme especializada (o velame) capaz de aumentar a absorção de água. O velame ocorre mais comumente como uma epiderme múltipla composta de células mortas. Entretanto, a hemiepífita *Vanilla bahiana* apresenta epiderme simples e também considerada por alguns autores como velame. Neste sentido, procuramos confirmar se as células da epiderme nesta espécie se enquadram ou não nesta definição. Além disso, o presente trabalho comparou as raízes adventícias desta espécie, crescidas no hábito aéreo (raízes livre e aderidas ao forófito) e terrestre (fixadas no solo), com a finalidade de investigar se os diferentes fenótipos, como a área transversal da raiz, córtex, cilindro vascular, lacunas nas camadas internas do córtex, espessura da epiderme, exoderme, espessamentos periclinais internos e cordões de protoxilema, são produto do ambiente. O material foi coletado em uma mata de galeria e fixado em FAA. Cortes transversais foram obtidos à mão livre ou em material infiltrado, sendo as lâminas utilizadas para caracterizar os diferentes tecidos. A epiderme não pôde ser considerada como velame, pois diferentemente do proposto na literatura, apresenta células vivas na maturidade. Os parâmetros que apresentaram diferenças significativas foram a área transversal da raiz, os espessamentos periclinais da epiderme, a área transversal do córtex e do cilindro vascular, o investimento em lacunas de ar (aerênquima) e cordões de protoxilema. As características com maior plasticidade foram os espessamentos periclinais internos da epiderme, ao comparar as raízes aderidas com as fixadas ao solo, e a área total ocupada pelas lacunas nas camadas internas do córtex entre as raízes livres

e as aderidas. A plasticidade observada reflete ao hábito em que as raízes livres ou aderidas (aéreas) e fixadas no solo (terrestres) crescem.

Palavras-chave: hábito, orquídeas, plasticidade fenotípica, velame

ABSTRACT

The epiphytic environment offers several advantages for plants, highlighting the greater availability of light in the canopy. However, this advantage is accompanied by limitations on water and nutrient availability. Orchidaceae are successful in this context, highlighting strategies of the vegetative organs to overcome water deficiency. For example, these plants develop a complex root system with a specialized epidermis (velamen) capable of increasing water absorption. The velamen occurs most commonly as a multiple epidermis composed of dead cells. However, the hemiepiphyte *Vanilla bahiana* has a simple epidermis also considered by some authors as velamen. In this sense, we seek to confirm whether or not the epidermis cells in this species fit this definition. In addition, the present work compared the adventitious roots of this species, grown in the air habit (free roots and attached to the phorophyte) and terrestrial (fixed in the soil), in order to investigate if the different phenotypes, such as the root cross-sectional area, cortex, vascular cylinder, gaps in the inner layers of the cortex, epidermis thickness, exodermis, internal periclinal thickening, and protoxylem cords, are environmental products. The material was collected in a gallery forest and fixed in FAA. Transverse sections were obtained by freehand or in infiltrated material, and the slides were used to characterize the different tissues. The epidermis could not be considered as velamen because, unlike the one proposed in the literature, it has living cells at maturity. The parameters that had significant differences were the root cross-sectional area, the parietal thickenings of the epidermis, the cross-sectional area of the cortex and the vascular cylinder, the investment in air gaps (aerenchyma) and protoxylem strands. The characteristics with greater plasticity were the internal periclinal thickening of the epidermis when comparing the adhered roots with those fixed to the soil, and the total area occupied by the gaps in the inner cortex layers between the

free and adhered roots The observed plasticity reflects the habit in which the free roots or the roots in contact with the phorophyte (aerial) and terrestrial (fixed in the soil) grow.

Key-words: habit, orchids, phenotypic plasticity, velamen

Introdução

Existem várias vantagens para se iniciar o ciclo de vida como epífita, destacando-se a maior disponibilidade de luz no dossel. Entretanto, esta vantagem vem acompanhada por limitações na disponibilidade de água e nutrientes (Benzing 1990; Coxson & Nadkarni 1995; Holbrook & Putz 1996a, b, c; Swagel *et al.* 1997). De fato, plantas epífitas estão sujeitas a escassez de recursos que pode ser compensada por estratégias morfológicas e fisiológicas de seus órgãos vegetativos (Silva & Milaneze-Gutierre 2004). Exemplo destas estratégias constituem sistemas radiculares complexos, cujas raízes aéreas com função de fixação e absorção de água e minerais exibem características anatômicas adaptativas para a retenção destes recursos, além de realizarem fotossíntese (Benzing 1990; Black 1973; Moreira *et al.* 2013).

Nas orquídeas, cerca de 70% de todas as espécies são epífitas (Zotz 2013b). Seu sistema radicular é formado por raízes adventícias, nas quais o sistema de revestimento é constituído por uma epiderme simples ou múltipla composta de células mortas, denominada velame (Dycus & Knudson 1957). O córtex, que está internamente ao velame, apresenta células parenquimáticas que podem apresentar diferentes tipos de espessamento parietais, caracterizando-se em phi, reticulado ou uniforme (Stern & Whitten 1999; Stern & Judd 2001; Moreira *et al.* 2013; Joca *et al.* 2017). A exoderme e a endoderme (camadas mais externa e interna do córtex, respectivamente) delimitam o parênquima cortical. Suas células podem ser altamente lignificadas e mortas na maturidade, e se apresentarem intercaladas a células de passagem (que permanecem vivas na maturidade) (Pridgeon 1987; Trepanier *et al.* 2008; Joca *et al.* 2017). O cilindro vascular apresenta xilema poliarco e medula desenvolvida (Oliveira & Sajo 1999).

Dentre as orquídeas, o gênero *Vanilla* Mill é constituído por 110 espécies predominantemente hemiepífitas e distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da América

do Norte, América do Sul, África e Ásia (Cameron 2011). Conforme o censo de Zotz (2013b), as hemiepífitas constituem um componente relevante da vegetação tropical, com mais de 800 espécies. Podem ser divididas de acordo com qual etapa do ciclo de vida mantém conexões radiculares com o solo, podendo ser hemiepífitas primárias ou secundárias. As hemiepífitas primárias germinam como epífitas e em seguida estabelecem conexões com o solo, enquanto as secundárias, germinam no solo e estabelecem contato com o tronco da hospedeira (forófito), e posteriormente sobem com raízes aderentes, tornando-se epífitas, que se reconectam com o solo por meio de raízes aéreas (Kress 1986; Putz & Holbrook 1986). Estes dois tipos de raízes são encontrados no gênero *Vanilla* e assumem diferentes papéis: as raízes mais curtas e não ramificadas, geralmente com crescimento limitado, prendem os ramos ao forófito, enquanto as raízes mais longas e ramificadas têm crescimento ilimitado e buscam o solo (substrato) (Stern & Judd 1999). Estes dois tipos radiculares apresentam ainda diferenças estruturais que reafirmariam fisiologicamente suas propriedades, como maior calibre do metaxilema observado nas raízes terrestres, com função de absorção (Stern & Judd 1999). Entretanto, alguns estudos têm mostrado que o ambiente aéreo molda estruturalmente a raiz, com características morfológicas típicas que as diferenciam de raízes terrestres (Moreira & Isaias 2008). Neste sentido, questionamos neste estudo se as diferenças estruturais observadas por Stern & Judd (1999), sendo estas o velame unisseriado e exoderme com espessamentos internos de parede, presença de lacunas nas camadas internas do córtex, tamanho do cilindro vascular (menor nas terrestres) e metaxilema (mais largo em terrestres), não constituem um efeito do ambiente, de forma que os dois tipos de raízes são fenótipos produtos do hábito que cada uma delas possui.

Além disso, a despeito do ambiente epifítico e da proximidade taxonômica com vários gêneros apresentando velame, o gênero *Vanilla* apresenta epiderme simples (Stern & Judd 1999). A classificação desta epiderme simples como um velame propriamente dito nas *Vanilla* tem sido questionada por muitos autores (Alconero 1968; Capesius & Barthlott 1975; Barthlott

1976), porém Stern & Judd (1999) optam por esta classificação baseando-se nos espessamentos de parede em diversas espécies do gênero (como *V. poitaei* Rchb.f. e *V. madagascariensis* Rolfe) analisadas em seus estudos. O velame seria caracterizado, então, pela presença de células mortas na maturidade, comumente contendo espessamentos de parede. Tal fato já foi anteriormente levantado por outros autores e, neste estudo, pretendemos confirmar se as células da epiderme em *V. bahiana* podem então ser realmente definidas como velame.

Materiais e métodos

Área de estudo e espécie vegetal

O estudo foi realizado em uma área de Preservação Permanente (APP) da propriedade particular Fazenda Quilombo, em uma mata de galeria localizada no município de Araguari, Minas Gerais, a 763 m de altitude, sob as coordenadas 18°43'58.5"S 48°02'58.9"W. O clima local é tropical com inverno seco (abril a setembro) e estação chuvosa ocorrendo entre os meses de outubro e março. Apesar da população estar localizada em uma mata de galeria com alta umidade ao longo de todo o ano. A temperatura e precipitação médias anuais são de 21,4 °C e 126,7 mm, segundo a classificação de Köppen (Alvares *et al.* 2013). As matas de galerias são caracterizadas por uma formação florestal inundável, na qual, as espécies perenifólias acompanham cursos d'água de pequeno porte formando em ambas as margens corredores fechados com vegetação não florestal (Ribeiro & Walter 2008). Na área de estudo, ocorre uma densa população de *Vanilla bahiana* Hoehne crescendo sob diferentes forófitos em ambiente de sub-bosque.

Vanilla bahiana é uma hemiepífita secundária endêmica do Brasil, ramificada e pode alcançar 15 m ou mais de comprimento (Queiroz *et al.* 2012), mas mantendo-se com até 4 m de altura na área de estudo (Fig. 1A). Apresenta hastes verdes lisas com 0,7 a 1,3 cm de espessura (Soto-Arenas & Dressler 2010) e em cada entrenó da mesma planta há raízes

adventícias aderidas ao forófito, livres ou que posteriormente fixaram no solo (Ferreira *et al.* 2017; Alconcer 1968).

Análises estruturais

Foram coletados três segmentos de raízes de cada tipo em cinco exemplares de *V. bahiana*, removidos a 3 cm de comprimento, sendo selecionadas raízes que crescem aderidas ao forófito (Fig. 1B), fixadas no solo (Fig. 1C) ou livre (Fig. 1D). Os fragmentos foram fixados em FAA₅₀ (formalina, ácido acético, álcool etílico 50% na proporção de 1:1:18 v/v) e, após 48 horas, armazenados em etanol 70% (Johansen 1940). Para a preparação de lâminas histológicas, seções transversais e longitudinais foram realizadas à mão livre, com auxílio de lâmina de barbear. As seções foram clarificadas em hipoclorito de sódio 50% (Kraus & Arduin 1997) e coradas com azul de astra e safranina (soluções aquosas a 1%, na proporção 9:1 v/v) após lavagem em água destilada (Bukatsch 1972, modificado). As lâminas foram montadas com gelatina glicerinada de Kaiser (Kaiser 1880) e fotomicrografadas em microscópio Leica® DM500 acoplado à câmera digital ICC50 HD (Leica, DM500, Alemanha).

Três seções de cada raiz foram utilizadas para histometria. Foram contados os cordões de protoxilema e de lacunas na região interna do córtex. Com auxílio do software Image J (versão 1.51, National Institute of Health, EUA), foram mensuradas a área transversal da raiz (mm²), a área transversal ocupada pelo córtex radicular e pelo cilindro vascular (μm²), para a área transversal total ocupada pelas lacunas internas do córtex (μm²), o calibre do metaxilema (μm²), a espessura da epiderme (μm), da exoderme (μm) e dos espessamentos periclinais internos da epiderme (μm), foi retirada a média de três medidas de um mesmo corte. Nas raízes aderidas a um substrato, as medidas foram realizadas sempre na parte livre da raiz evitando deformações decorrentes do contato com o forófito.

Para observação de seções mais finas e análises histoquímicas, algumas amostras foram desidratadas em série etanólica e infiltradas em metacrilato de acordo com as recomendações do fabricante (Historesin® Leica, Alemanha). Posteriormente, foram seccionadas nos planos transversal e longitudinal em micrótomo rotativo (YD315, ANCAP, Brasil) com cerca de 10 µm de espessura, utilizando-se navalhas de aço inox de alto perfil. As seções foram coradas com azul de toluidina 0,05% em Tampão Fosfato 0,1M, com pH 6,8 (O'Brian *et al.* 1964) e fotomicrografadas em microscópio acoplado a câmera digital (Leica, DM1000, Alemanha).

Análises histoquímicas

Para as análises histoquímicas, cortes à mão livre do material fixado em etanol 70% e foram tratados com: Sudan III para detecção de lipídios totais (Johansen 1940) e solução de lugol (iodo + iodeto de potássio) para amido (Johansen 1940). Para confirmar se as células da epiderme estão vivas, foi verificada a presença de proteínas a partir de seções obtidas em micrótomo rotativo. As seções foram tratadas com solução de azul de bromofenol 1% por 10 a 15 minutos (Durrum 1950), lavadas em ácido acético 0,5% e posteriormente água destilada. As lâminas temporárias foram montadas em água e imediatamente levadas ao microscópio.

Para a histolocalização de ligninas nas paredes celulares, as seções à mão livre foram montadas em água destilada e em seguida analisadas em microscópio óptico com sistema de fluorescência Leica® DM500 acoplado a câmera HD5000, com emissão de filtro DAPI (espectro de excitação: 385-400 nm) (Chomicki *et al.* 2014). A presença de lignina foi confirmada utilizando solução alcóolica de Floroglucina 1%, adicionando em seguida solução de ácido clorídrico 25% por um período de 5 minutos (Johansen 1940).

Análises dos dados

Os dados referentes às análises histométricas foram comparados utilizando-se o software JMP (SAS Institute, EUA). A diferença entre os três tipos de raízes foi testada realizando-se uma ANOVA (JMP, SAS Institute, EUA) (variáveis: área transversal do cilindro vascular, espessura da epiderme e exoderme, o espessamento periclinal interno da epiderme, números e a área total ocupada pelas lacunas na região interna do córtex em corte transversal e o calibre do metaxilema que atenderam aos padrões de normalidade, de acordo com teste de Shapiro-Wilk). Para os dados que não atenderam a suposições paramétricas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (área transversal da raiz, do córtex radicular e números de cordões de protoxilema). Diferenças entre os fatores ou parâmetros foram significativas considerando-se 5% de probabilidade.

Os dados obtidos a partir da histometria foram avaliados quanto à sua plasticidade a partir da distância morfológica relativa considerando-se o Índice de Plasticidade a partir das Distâncias Relativas (RDPI) proposto por Valladares et al. (2006). O RDPI foi calculado a partir de uma matriz X_{ij} , onde i (linhas) são os indivíduos analisados e j (colunas) referem-se às condições do ambiente (raízes aderidas, aéreas ou terrestres). O RDPI foi calculado pela fórmula $RDPI = \sum (d_{ij} \rightarrow i'j' / (x_{ij} + x_{j'i'})) / n$, onde $j \rightarrow j'$ é o número de condições, $i \rightarrow i'$ o número de indivíduos, n é o número total de distâncias, e x é a característica a ser analisada. Os valores de RDPI variam de 0 (sem plasticidade) a 1 (maior plasticidade). Considerando que os dados não atenderam aos princípios de normalidade, as diferenças nas plasticidades foram obtidas pelo teste de Kruskal-Wallis.

Resultados

Análises da morfologia e anatomia radicular

As raízes sobre os três tipos de substratos apresentaram dimensões variadas, sendo a área transversal das raízes aderidas ao forófito, ou que crescem livres, de aproximadamente $1,1 \text{ mm}^2$, enquanto as fixadas no solo eram maiores com área de $1,5 \pm 0,4 \text{ mm}^2$ (tabela 1). Em todas as três condições, as raízes apresentaram epiderme simples, vivas e com células justapostas (Fig. 2A e B, 3A-G), porém quando estão livres apresentaram paredes com impregnações lipídicas (Fig. 3B). Nas três condições a epiderme mostrou-se levemente lignificada em sua face periclinal externa e com impregnação se estendendo gradativamente pelas paredes anticlinais (Fig. 3C, E e G). Apesar da espessura semelhante das células epidérmicas, os espessamentos periclinais internos foram aproximadamente 40% maiores nas raízes livres, e 75% maiores nas raízes em aderidas ao forófito (região livre), quando comparados aos espessamentos das raízes fixadas no solo. Nas raízes aderidas ao forófito foi observado leve abaulamento em relação ao substrato e a presença de pelos radiculares nesta região (Fig. 3D), sem espessamentos parietais. Por outro lado, as raízes fixadas no solo apresentam pelos radiculares distribuídos por toda a superfície (Fig. 3F).

A área do córtex nas raízes fixadas no solo ($\sim 1,2 \text{ mm}^2$) foi maior do que nas raízes aderidas ou livres (tabela 1). No cortex, as células são de tamanhos diferentes, arredondadas, com paredes finas, arranjo compacto e poucos espaços intercelulares triangulares e pequenos (Fig. 3A, D e F), com poucas ráfides. As raízes livres apresentaram maior número de lacunas na região interna do córtex que as raízes aderidas ao forófito e às fixadas no solo. Entretanto, não foram observadas diferenças na área total ocupada pelas lacunas. Foram observadas micorrizas distribuídas por todo o córtex nas raízes terrestres (Fig. 2C), enquanto nas raízes aderidas ao forófito, elas estavam presentes somente na região em contato com o substrato.

A exoderme, apresentou-se constituída por uma camada de células alongadas anticlinalmente em seção transversal, com espessura de aproximadamente 62,0 μm para todas as espécies. As células básicas da exoderme nas raízes em contato com o forófito e fixadas no solo apresentaram impregnação lipídica (Fig. 4A e B) e por lignina nas paredes periclinais externas em todas as raízes. As células de passagem não apresentam impregnações na parede celular (Fig. 4C), porém foi observado conteúdo celular conspícuo. As raízes aderidas ao forófito apresentam um número maior de células de passagem na região de contato com o substrato (Fig. 4C). As células da endoderme apresentaram-se pouco diferenciadas contendo estrias de Caspary com presença de lignina (Fig. 4D). Nas raízes aderidas e fixadas no solo, as células da endoderme também apresentaram impregnações lipídicas (Fig. 4E-G). Todas as raízes apresentaram células da endoderme com espessamento secundário com evidente impregnação por lignina entre os polos de xilema (Fig. 4H e I).

No cilindro vascular os cordões de xilema e floema se encontram intercalados. O xilema é poliarco, cujo o número de polos nas raízes analisadas são variados (tabela 1); as aderidas ao forófito, ou crescendo de forma livre, apresentaram uma quantidade maior (cerca de 12 polos de protoxilema) (Fig. 3A e D), enquanto as raízes fixadas no solo tiveram um número menor (cerca de 9 polos). A medula da porção central da raiz é constituída por células pequenas muito pouco esclerificadas (Fig. 3A).

Tabela 1: Características estruturais das raízes adventícias da hemiepífita *Vanilla bahiana* (Orchidaceae) crescendo aderidas ao forófito, livres e fixadas no solo. Os valores que apresentam letras diferentes na mesma linha são diferentes no nível 0,05 do teste de Tukey.

	Livres	Aderidas ao forófito	Fixadas no solo	p
Área transversal da raiz (mm ²)	1,09 ± 0,23b	1,09 ± 0,38b	1,47 ± 0,37a	<0,01
Espessura da epiderme (µm)	36,76 ± 6,79a	29,75 ± 4,60a	28,79 ± 11,70a	>0,05
Espessamento periclinal interno da epiderme (µm)	6,13 ± 1,68a	7,82 ± 2,65a	4,40 ± 1,76b	<0,01
Espessura da exoderme (µm)	53,24 ± 10,22a	61,88 ± 8,50a	57,89 ± 18,20a	>0,05
Área transversal córtex + cilindro (mm ²)	1,00 ± 0,22b	1,02 ± 0,36b	1,35 ± 0,35a	<0,01
Área transversal do córtex (mm ²)	0,87 ± 0,20b	0,88 ± 0,33b	1,24 ± 0,31a	<0,01
Área transversal do cilindro (µm ²)	0,14 ± 0,03a	0,14 ± 0,04a	0,11 ± 0,05a	<0,05
Nº de lacunas na região interna do córtex	11,47 ± 3,14a	9,20 ± 1,70b	8,87 ± 1,68b	<0,05
Área total ocupada pelas lacunas na região interna do córtex em corte transversal (µm ²)	66497,48 ± 44698,56 a	49584,96 ± 29640,39a	49870,98 ± 26388,79a	>0,05
Calibre do metaxilema (µm ²)	1239,88 ± 435,17a	1459,96 ± 290,39a	1169,91 ± 599,06a	>0,05
Nº de cordões de protoxilema	12,87 ± 1,36a	11,33 ± 0,90b	9,40 ± 1,24c	=0,0001

Índice de plasticidade fenotípica

Os valores do RPDI referentes a comparação das raízes adventícias crescidas sob as três condições ambientais (contato com o forófito, livres e fixadas ao solo), mostraram diferenças em todos os parâmetros analisados (Tabela 2). A plasticidade foi maior ao comparar as raízes aderidas ao forófito e livres às fixadas no solo. Por outro lado, foi observada pouca plasticidade entre as raízes livres e as aderidas ao forófito. Os parâmetros que mais variaram foram a área total ocupada pelas lacunas internas do córtex (valores entre 0,30 e 0,36) e a espessura da parede periclinal interna da epiderme (valores entre 0,23 e 0,30). Em contrapartida, a característica que se mostrou mais conservativa foi o número de cordões de protoxilema.

Tabela 2: A plasticidade dos dados histométricos em raízes adventícias da hemiepífita *Vanilla bahiana* (Orchidaceae) crescendo em aderidas ao forófito, livres e fixadas no solo. A plasticidade foi obtida pelo Índice de Plasticidade à Distância Relativa (RDPI, Valladares *et al.* 2006). Os valores que apresentam letras diferentes na mesma linha são diferentes no nível 0,05 do teste de Tukey.

	Livres - Aderidas ao forófito	Livres - Fixadas no solo	Aderidas ao forófito - Fixadas no solo	p
Área transversal da raiz (mm ²)	0,14c	0,18b	0,21a	<.0001
Espessura da epiderme (µm)	0,11b	0,20a	0,19a	<.0001
Espessamento periclinal interno da epiderme (µm)	0,23b	0,22b	0,33a	<.0001
Espessura da exoderme (µm)	0,11b	0,17a	0,15a	<.0001
Área transversal córtex + cilindro (mm ²)	0,14b	0,18a	0,20a	<.0001
Área transversal do córtex (mm ²)	0,15b	0,20a	0,23a	<.0001
Área transversal do cilindro (µm ²)	0,13b	0,23a	0,24a	<.0001
Nº de lacunas na região interna do córtex	0,18a	0,19a	0,10b	<.0001
Área total ocupada pelas lacunas na região interna do córtex em corte transversal (µm ²)	0,36a	0,34ab	0,30b	< 0,05
Calibre do metaxilema (µm ²)	0,18b	0,23a	0,23a	<0,001
Nº de cordões de protoxilema	0,07c	0,16a	0,10b	<.0001



Figura 1: *Vanilla bahiana* encontrada em mata de galeria na região de Araguari. A) Visão geral da mostrando o crescimento da hemiepífita sobre o forófito. B) Detalhe das raízes aderidas ao forófito (seta). C) Detalhe de raízes fixadas no solo (setas). D) Detalhe de raízes livres em estágio inicial (setas).

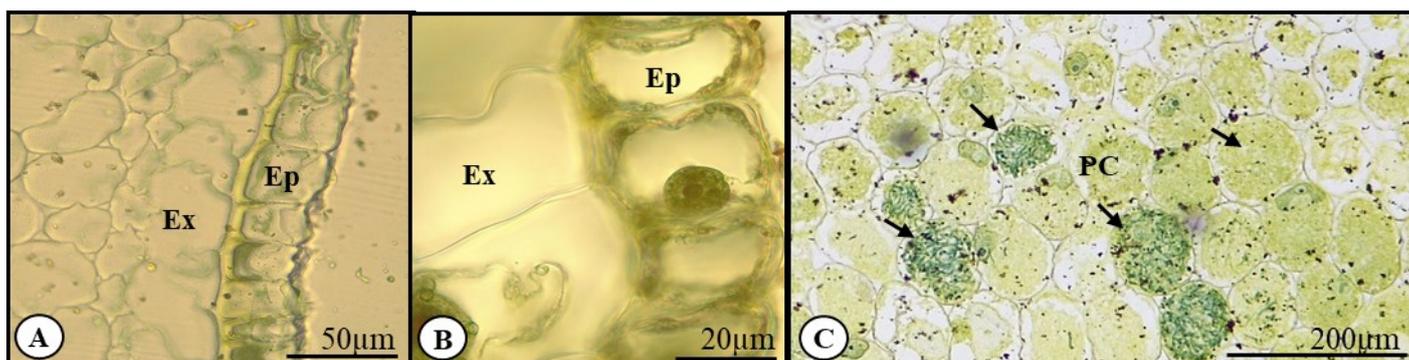


Figura 2: Composição proteica das raízes de *Vanilla bahiana* (Orchidaceae). A) Corte transversal da raiz livre, evidenciando a exoderme e a epiderme simples com células vivas na maturidade. B) Corte transversal da raiz aderida ao forófito evidenciando a epiderme simples. C) Corte transversal da raiz fixada no solo, evidenciando o parênquima cortical infestado com micorrizas. Ep= epiderme; Ex= exoderme e PC= parênquima cortical.

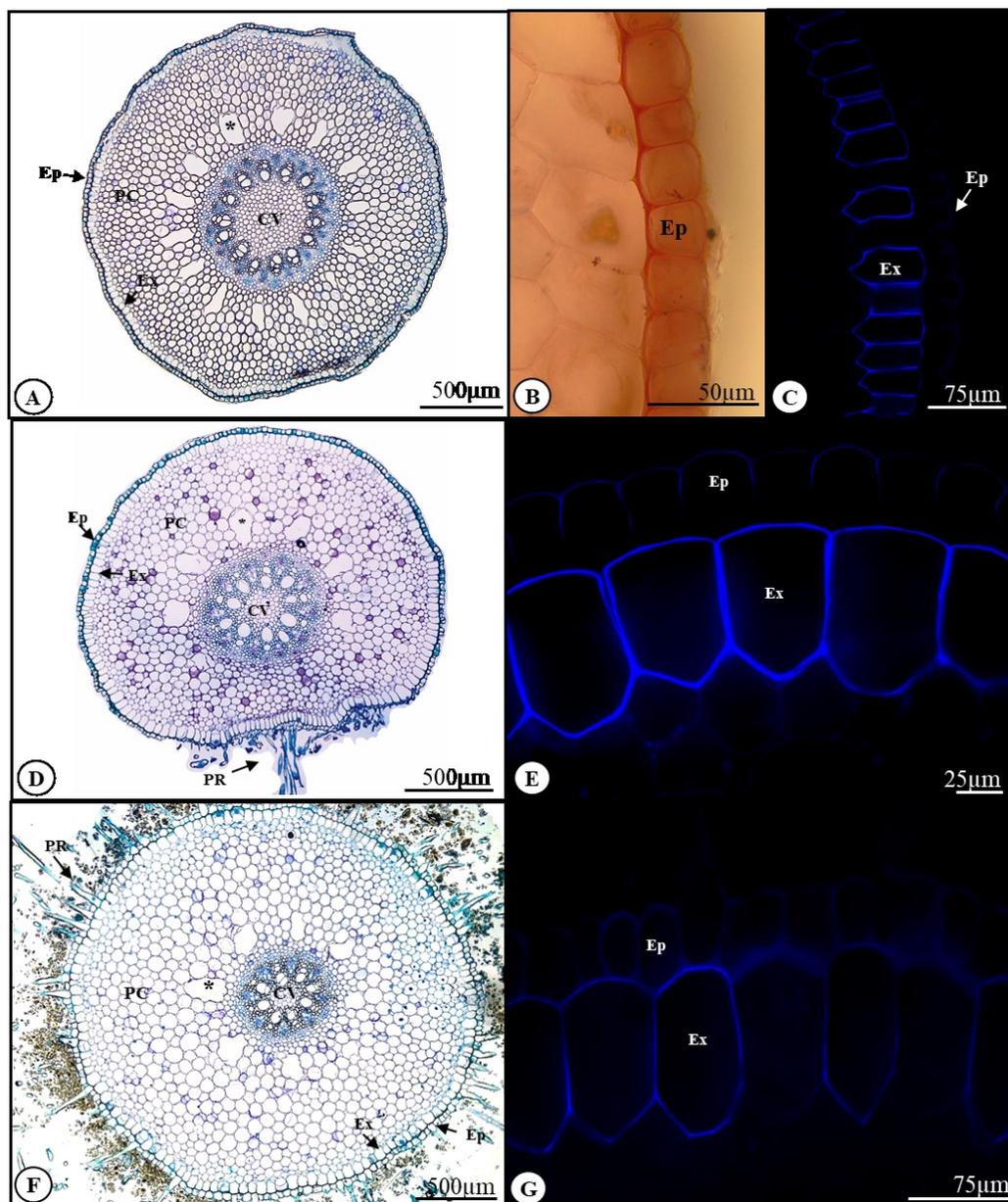


Figura 3: Secções transversais das raízes de *Vanilla bahiana* (Orchidaceae). A, B e C) Raiz livre, (A) visão geral do corte transversal da raiz mostrando a epiderme (seta), exoderme (seta), parênquima cortical, lacunas do aerênquima (*) e o cilindro vascular, (B) evidenciando a epiderme levemente impregnada com lipídio, (C) detalhe da epiderme levemente lignificada. D e E) Raiz aderida ao forófito, (D) visão geral do corte transversal da raiz, mostrando a epiderme, exoderme, parênquima cortical, lacunas do aerênquima (*), cilindro vascular, e (E) detalhe da epiderme levemente lignificada. F e G) Raiz fixada no solo, (F) evidenciando a epiderme, exoderme, parênquima cortical, lacunas do aerênquima (*), cilindro vascular e os pelos radiculares, (G) detalhe da epiderme levemente lignificada. Marcação para lipídio (Sudam), e para lignina (Filtro DAPI). Ep= epiderme; Ex= exoderme; PC= parênquima cortical; CV= cilindro vascular e PR= pelos radiculares.

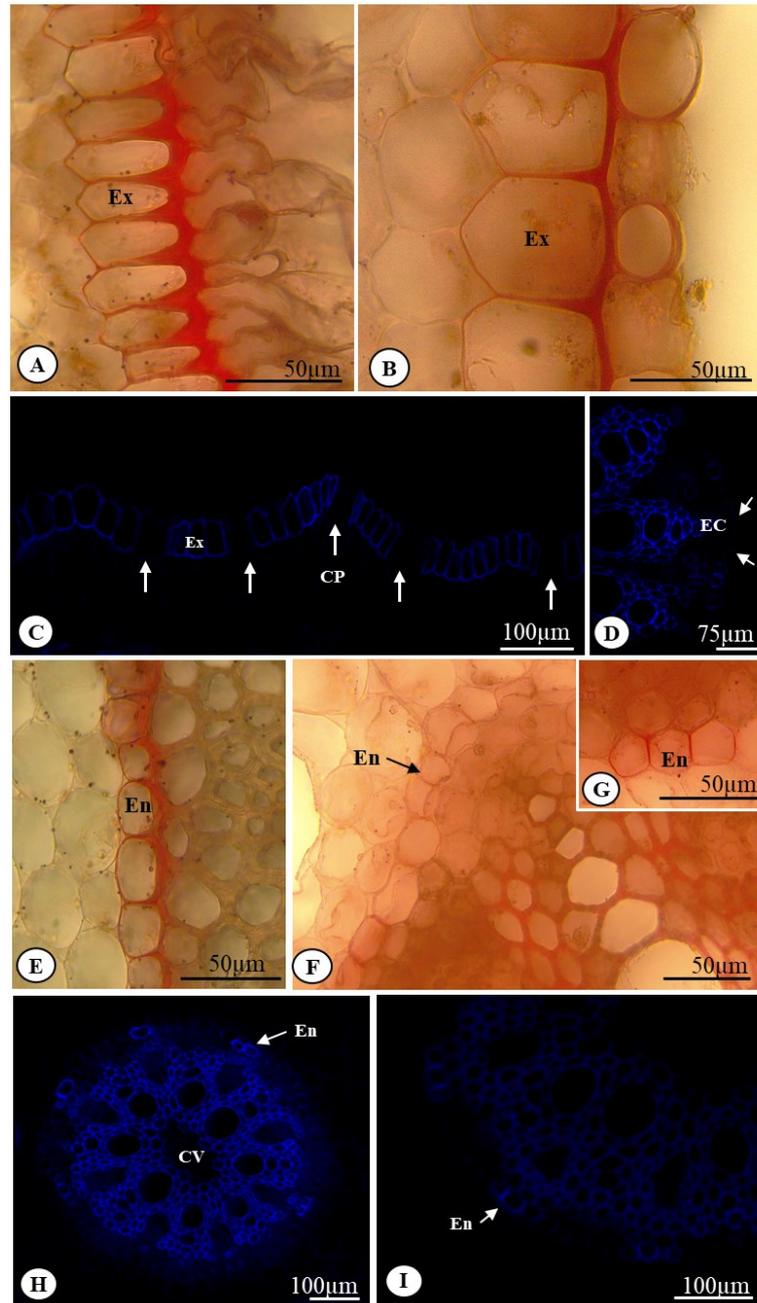


Figura 4: Presença de lipídios e lignina nos tecidos radiculares de *Vanilla bahiana* (Orchidaceae). A e B) Evidenciando a impregnação lipídica nas células da exoderme das raízes (A) aderidas ao forófito e (B) fixadas no solo. C) Exoderme lignificada e as células de passagem na região em contato com o forófito (setas). D) Detalhe das estrias de Caspary lignificadas nas células da endoderme (seta) da raiz livre. E, F e G) Detalhe da endoderme com impregnação lipídica em raízes (E) nas aderidas ao forófito (F e G) e fixada no solo. H e I) Células da endoderme com presença de lignina (seta) em raízes (H) fixadas no solo e (I) livres. Ex= exoderme; En= endoderme; CP= células de passagem; EC= estrias de Caspary e CV= cilindro vascular.

Discussão

As raízes adventícias de *V. bahiana* são estruturalmente semelhantes a outras espécies de orquídeas, mas diferente do relatado na literatura (Stern & Judd 1999), aqui não podemos considerar a epiderme como um velame. A epiderme unisseriada apresenta células vivas na maturidade, assemelhando-se ao velame apenas pela presença de espessamentos parietais impregnados por lipídeos e lignina, e ainda assim muito pouco conspícuos. Além disso, neste estudo foram observadas diferenças morfológicas nas raízes crescidas sob as três condições ambientais (aderidas ao forófito, livres e fixadas ao solo) fortemente relacionadas com o hábito (aéreo ou terrestre), com menor plasticidade observada entre as raízes que crescem nos dois hábitos aéreos (aderidas ao forófito ou livres). As características que se mostraram mais plásticas entre as três condições foram os espessamentos periclinais internos da epiderme e a área total ocupada pelas lacunas na região interna do córtex, enquanto o número de polos de protoxilema foi a característica mais conservativa.

O maior diâmetro das raízes fixadas no solo com relação às livres poderia estar relacionado com a absorção e a condução da água e nutrientes (Olatunji & Nengim 1980; Zotz 1999), ou ser definido pelo volume do solo explorado com relação à quantidade de fotossintato produzido (Atkinson 1991; Zotz 1999). De fato, o maior diâmetro pôde ser atribuído a presença de um córtex mais desenvolvido, mas não foi observada grande quantidade de amido nesta região, apenas pequenas gotículas de natureza lipídica. O contato das raízes com o forófito causa mudanças em sua conformação, incluindo o desenvolvimento de pelos e alterações na epiderme e exoderme, como por exemplo a ausência de espessamento periclinal na epiderme e o maior número de células de passagem na exoderme. Em muitos gêneros, as raízes cilíndricas em contato com o substrato se diferenciam-se em dorsiventrais, cuja face dorsal assume função protetora (Stern 2014) e a ventral desenvolve pelos radiculares (Dycus & Knudson 1957; Sanford & Adalawo 1973; Benzing *et al.* 1982; Moreira *et al.* 2013; Stern 2014) que auxiliam

a fixação no substrato (Tomlinson & Metcalf 1969; Almeida *et al.* 2016) e apresentam função absorptiva (Stern 2014).

A epiderme, por estar em contato direto com o solo, exerce um papel de absorção e ao mesmo tempo seletivo (Barberon & Geldner 2014). Por definição, o velame é originado na protoderme e perde seu protoplasto quando maduro (Engard 1944; Pridgeon 1983). Embora o velame apareça em raízes de diversas famílias (Benzing 1990; Kauff *et al.* 2000), ele é particularmente especializado nas orquídeas de ambientes xéricos (Benzing 1990). Nessas plantas, as paredes celulares apresentam um complexo arranjo de poros e estrias lignificadas (Pridgeon *et al.* 1983; Porembski & Barthlott 1988) que conferem função absorptiva, pelo aumento da capilaridade e higroscopia no tecido (Benzing 1990), e suporte mecânico evitando o colapso celular durante a dissecação (Benzing 1986). Em geral, o velame aparece como multisseriado, porém algumas revisões incluem espécies com epiderme unisseriada pertencentes ao mesmo grupo (Stern & Judd 1999; Zotz 2013). Entretanto, aqui observamos que em *V. bahiana* a epiderme apresenta conteúdo celular e espessamentos parietais pouco conspícuos, impossibilitando sua determinação como velame.

Em contraste com as raízes livres analisadas, que não apresentaram pelos radiculares, corroborando com observações anteriores de Stern & Carlswald (2009) e Moreira *et al.* (2013), pelos radiculares foram observados por toda a circunferência das raízes fixadas no solo, evidenciando seu papel na absorção de água e nutrientes. Por outro lado, apesar da mesma espessura obtida para as raízes crescidas nos três ambientes estudados, foi observado maior espessamento da parede celular quando livres ou aderidas ao forófito. Além disso, o espessamento parietal apresenta uma plasticidade maior entre os ambientes analisadas.

A exoderme, o córtex e a endoderme têm como origem o meristema fundamental (Engard 1944). Nas raízes analisadas a exoderme e a endoderme são semelhantes, formadas por uma camada uniestratificada indicando o limite externo e interno do córtex (Engard 1944; Esau

1966; Cutter 1969; Fahn 1974; Rudall 1987). A exoderme com espessamento de parede formado por lignina fornece proteção mecânica e diminui a transpiração na raiz, pois aumenta a umidade ao redor do córtex ao dificultar o retorno da água presente neste para o meio externo, como Sanford & Adalawo (1973) e Benzing *et al.* (1982; 1983) observaram em orquídeas. Por outro lado, a endoderme apresenta estrias de Caspary constituídas por lignina. Ela atua como barreira apoplástica influenciando na seletividade da absorção de nutrientes e água pelas raízes (Peterson & Enstone 1996; Enstone *et al.* 2003; Schreiber & Frank 2011; Andreota *et al.* 2015). As raízes aderidas ao forófito apresentaram um maior número de células de passagem na exoderme na região em contato com o substrato. Tal fato sugere que estas raízes absorvem grande parte de seus recursos do substrato, o que reduz ainda mais as evidências funcionais da epiderme como velame.

Todas as raízes apresentaram lacunas na região interna do córtex, mas as raízes livres diferenciam-se por apresentar um número maior de lacunas. A área total ocupada pelas lacunas é uma das características que se mostraram mais plásticas entre as três os ambientes analisados (aérea, aderida e terrestre). Stern (1997) assumiu estes espaços com o armazenamento de oxigênio (Stern 1997), enquanto Meyer (1940) associou ao transporte da água por capilaridade. Em síntese, essa adaptação reflete na redução dos custos metabólicos da exploração no solo ao passo que aumenta a aquisição de água e nutrientes (Jaramillo *et al.* 2013). Estes espaços podem ser formados por uma variedade de estímulos, como seca, alta temperatura, deficiência nutricional e hipóxia (Drew *et al.* 2000; Bouranis *et al.* 2006; Zhu *et al.* 2010; Jaramillo *et al.* 2013).

O que mais destacou-se em relação ao córtex no sistema estudado foi a alta infestação por micorrizas nas raízes fixadas no solo com relação às raízes aderidas que apresentaram apenas na face em contato com o substrato (as raízes livres não apresentaram infestação micorrízica). Os fungos endomicorrízicos entram no córtex através das células de passagem

exodérmica e estabelecem frequentes associações com orquídeas (Peterson & Enstone 1996; Senthilkumar *et al.* 2000). De fato, a relação simbiótica entre fungos e orquídeas é comum (Zotz 1999), sendo uma condição fundamental para a germinação de sementes e estabelecimento destas plantas (Muthukumar & Sathiyadash 2009; Rasmussen & Rasmussen 2014). Para Senthilkumar e Krishnamurthy (1998), existem diferentes tipos de associações micorrízicas se o córtex da raiz for levado em consideração como sítio de instalação. No entanto, no caso das orquídeas, as hifas dos fungos formam corpúsculos intracelulares (pelotons) que podem ser digeridos pelas células hospedeiras, tornando-os importantes para a nutrição da planta (Lesica & Antibus 1990; Senthilkumar *et al.* 2000). Além disso, as associações micorrízicas podem beneficiar a planta na proteção de patógenos, melhor tolerância a metais pesados, maior área de superfície radicular e captação aprimorada de nutrientes e água (Smith & Read 1997).

O cilindro vascular é formado por xilema poliarco em todas as raízes analisadas. Apresentaram um número de polos variados, conforme já observado em outras espécies (Rosso 1966; Singh 1986). Alguns autores relacionam o número de pólos de xilema com o diâmetro da raiz, no qual as raízes finas têm menor número de pólos que as raízes grossas (Rütter & Stern 1992; Rosso 1966). Porém, os nossos resultados indicaram que o número de pólos de xilema nas raízes livres e aderidas ao forófito são maiores que nas fixadas no solo, que apresentam diâmetro maior. Todavia, o aproveitamento eficiente dos recursos é maior devido ao grande número de cordões de xilema, visto que a distribuição da água e nutrientes pelo corpo da planta será mais rápida (Joca *et al.* 2017).

Em síntese, os parâmetros analisados nas raízes adventícias que se desenvolvem em ambientes diferentes estão relacionados com a hábito na qual estas se desenvolveram, mais especificadamente, no hábito aéreo (livres e aderidas ao forófito) e terrestre (fixadas no solo). Levando-as a desenvolverem características que aumentam o seu sucesso no ambiente.

Conclusão

A estrutura presente nas três raízes analisadas assume um papel importante do ponto de vista funcional. Revela a adoção de estratégias distintas nas diferentes condições ambientais, com diferentes diâmetros, área ocupada pelo aerênquima, número de cordões de protoxilema, presença de pelos radiculares e até mesmo na distribuição de células de passagem. Tais características buscam maximizar a aquisição e distribuição de nutrientes, refletindo em um sucesso expressivo no ambiente em que se encontra. As raízes desenvolvidas no hábito aéreo (aderidas ao forófito e livres) se diferenciam das que se desenvolvem no hábito terrestre (fixadas no solo). Pela presença de proteínas foi possível determinar a ocorrência de uma epiderme viva, diferente da estrutura em velame reportada na literatura. Além disso, foi observada maior infestação de micorrizas no córtex das raízes fixadas no solo, e a ocorrência também nas aderidas ao forófito, o que sugere a dependência desta simbiose para sua nutrição.

Referências

- Alconero R. 1968. *Vanilla* root anatomy. *Phyton* 25: 103-110.
- Almeida ABR, Smidt EC, Amano E. 2016. Development and function of root hairs in *Acianthera* Scheidw. (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 10(18): 122-126.
- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Arditti J. 2013. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley, New York.
- Andreota RC, Barros F, Sajo MG. 2015. Root and leaf anatomy of some terrestrial representatives of the Cranichideae tribe (Orchidaceae). *Brazilian Journal of Botany* 38(2): 367-378.

- Atkinson D. 1991. Influence of root system morphology and development on the need for fertilizers and the efficiency of use. In: Waisel, Y.A., Eshel, Kafkaki, U. (Eds.), *Plant Roots: The Hidden Half*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, p. 411–451.
- Barberon M, Geldner N. 2014. Radial transport of nutrients: the plant root as a polarized epithelium. *Plant Physiology* 166: 528-537.
- Barthlott W. 1976. Struktur und Funktion des Velamen radicum der Orchideen. In *Proceedings of the 8th World Orchid Conference*. Frankfurt am Main: German Orchid Society p. 438-443.
- Benzing, DH. 1986. The vegetative basis of vascular epiphytism. *Selbyana* 9(1): 23-43.
- Benzing DH, Ott DW, Friedman WE. 1982. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex. *American Journal of Botany* 69: 608-614.
- Benzing DH, Friedman WE, Peterson G, Renfrow A. 1983. Shootlessness, velamentous roots and the preeminence of orchidaceae in the epiphytic biotype. *American journal of botany* 70: 121-133.
- Benzing DH. 1990. *Vascular epiphytes, general biology and related biota*. Cambridge: Cambridge University Press 17: 354.
- Black PMcK. 1973. *Orquídeas*. 1a ed. Hamlyn Publishing Group Limited. Tradução Maria Adelaide Freitas Soares. Ao Livro Técnico S/A. Rio de Janeiro.
- Bouranis DL, Chorianopoulou SN, Kollias C, Maniou P, Protonotarios VE, Siyiannis VF, Hawkesford MJ. 2006. Dynamics of aerenchyma distribution in the cortex of sulfate-deprived adventitious roots of maize. *Annals of Botany* 97: 695-704.
- Brundrett MC. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154: 275-304.

- Bukatsch F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung: Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61: 255.
- Cameron KM. 2011. *Vanilla* Phylogeny and Classification. In: HAVKIN-FRENKEL D, BELANGER FC. Handbook of *Vanilla* Science and Technology. Chichester, West Sussex; Ames, Iowa: Blackwell Pub p.241-255.
- Capesius I, Barthlott W. 1975. Isotopen-Markierungen und Raster-elektronmikroskopische Untersuchungen des Velamen radicum der Orchideen. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 75(5): 436-448.
- Chomicki G, Bidel LPR, Jay-Allemand C. 2014. Exodermis structure controls fungal invasion in the leafless epiphytic orchid *Dendrophylax lindenii* (Lindl.) Benth. ex Rolfe. *Flora* 209: 88-94.
- Coxson DS, Nadkarni NM. 1995. Ecological roles of epiphytes in nutrient cycles of forest systems. In: LOWMAN MD, NADKARNI NM (eds) *Forest Canopies*. Academic Press, San Diego p. 495–543.
- Cutter EG. 1969. *Plant anatomy: experiment and interpretation*. Part 1. Edward Arnold, London.
- Drew MC, HE C, Morgan PW. 2000. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in Plant Science* 5: 123-127.
- Durrum EL. 1950. A microelectrophoretic and microionophoretic technique. *Journal of the American Chemical Society* 72: 2493-2498.
- Dycus AM, Knudson L. 1957. The role of the velamen of the aerial roots of orchids. *Botanical Gazette* 119(2): 78-87.
- Engard C J. 1944. Morphological identity of the velamen and exodermis in orchids. *Botanical Gazette* 105: 457-462.

- Enstone DE, Peterson CA, Ma F. 2003. Root Endodermis and Exodermis: Structure, function, and Responses to the Environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 335-351.
- Esau K. 1966. *Anatomy of seed plants*. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.
- Fahn A. 1974. *Plant Anatomy*. 2nd ed. Pergamon Press, Oxford.
- Fahn A. 1990. *Plant anatomy*. 4th ed. Pergamon Press, Oxford.
- Ferreira AWC, Oliveira MS, Silva EO, Campos DS, Pansarin ER, Guarçoni EAE. 2017. *Vanilla bahiana* Hoehne and *Vanilla pompona* Schiede (Orchidaceae, Vanilloideae): two new records from Maranhão state, Brazil. *Check List* 13(6): 1131-1137.
- Holbrook NM, Putz FE. 1996a. From epiphyte to tree: differences in leaf structure and leaf water relations associated with the transition in growth form in eight species of hemiepiphytes. *Plant Growth Regulation* 19: 631–642.
- Holbrook NM, Putz FE. 1996b. Physiology of tropical vines and hemiepiphytes: plants that climb up and plants that climb down. In: MULKEY SS, CHAZDON RL, SMITH AP (eds) *Tropical forest plant ecophysiology*. Chapman & Hall, New York, USA, p. 363-393.
- Holbrook NM, Putz FE. 1996c. Water relations of epiphytic and terrestrially-rooted strangler figs in a Venezuelan palm savanna. *Oecologia* 106: 424-431.
- Jaramillo RE, Nord EA, Chimungu JG, Brown KM, Lynch JP. 2013. Root cortical burden influences drought tolerance in maize. *Annals of Botany* 112: 429-437.
- Joca TAC, Oliveira DC, Zotz G, Moreira ASFP. 2017. The velamen of epiphytic orchids: Variation in structure and correlations with nutrient absorption. *Flora* 230: 66-74.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw Hill Book Company.
- Kaiser E. 1880. Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. *Botanisch zentralb.* p. 25-26.
- Kauff, F, Rudall P, Conran J. 2000. Systematic root anatomy of Asparagales and other monocotyledons. *Plant Systematics and Evolution*. 223: 139-154.

- Kraus JE, Arduin M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, EDUR.
- Kress WJ. 1986. The systematic distribution of vascular epiphytes: an update. *Selbyana* 9(1): 2-22.
- Lesica P, Antibus RK. 1990. The occurrence of mycorrhizae in vascular epiphytes of two Costa Rican rain forests. *Biotropica* 22(3): 250-258.
- Meyer L. 1940. Zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Bromeliaceenwurzeln. *Planta* 31: 492-522.
- Moreira ASFP, Isaias RMS. 2008. Comparative anatomy of the absorption roots of terrestrial and epiphytic orchids. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51: 83-93.
- Moreira ASFP, Lemos Filho JP, Isaias RMS. 2013. Structural adaptations of two sympatric epiphytic orchids (Orchidaceae). *Revista de Biologia Tropical* 61: 1053-1065.
- Moreira FMS, Siqueira JO. 2002. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras. UFLA editora p. 626.
- Muthukumar T, Sathiyadash K. 2009. Mycorrhizal morphology of Nun's orchid [*Phaius tankervilleae* (Banks ex L' Herit.) Blume]. *Mycorrhiza News* 21: 9-11.
- O'Brian TP, Feder N, Mccully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- Olatunji OA, Nenguim RO. 1980. Occurrence and distribution of tracheoidal elements in the Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 80: 357-370.
- Oliveira VC, Sajo MG. 1999. Root anatomy of nine Orchidaceae species. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 42(4): 405-413.
- Peterson CA, Enstone DE. 1996. Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of root. *Physiologia Plantarum* 97: 592-598.

- Pridgeon AM. 1987. The velamen and exodermis of orchid roots. In: Arditti J (ed), *Orchid Biology: Reviews and Perspectives, IV*. New York, Ithaca, Cornell University Press, p.140-192.
- Porembski S, Barthlott W. 1988. Velamen radicum micromorphology and classification of Orchidaceae. *Nordic Journal of Botany* 8(2): 117-137.
- Putz FE, Holbrook NM. 1986. Notes on the natural history of hemiepiphytes. *Selbyana* 9(1): 61-69.
- Queiroz MSR, Janebro DI, Cunha MAL, Medeiros JS, Sabaa-Srur AUO, Diniz MFFM, Santos SC. 2012. Effect of the yellow passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* deg.) in insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutrition Journal* 11: 89.
- Rasmussen HN, Rasmussen FN. 2014. Seedling mycorrhiza: a discussion of origin and evolution in Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 175: 313-327.
- Ribeiro JF, Walter BMT. 2008. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In *Cerrado: ecologia e flora* (S.M. SANO, S.P. ALMEIDA & J.F. RIBEIRO, eds.). Embrapa Cerrados, Planaltina. p.151 -212.
- Rosso SW. 1966. The vegetative anatomy of the Cypripedioideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 59: 309-341.
- Rudall P. 1987. *Anatomy of flowering plants. An introduction to structure and development*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Rütter BE, Stern WL. 1992. An assessment of quantitative features of velamen stratification and protoxylem strands in roots of Orchidaceae. *Lindleyana* 9: 219- 225.
- Sanford WW, Adanlawo I. 1973. Velamen and exodermis characters of the WestAfrican epiphytic orchids in relation to taxonomic grouping and habitat tolerance. *Botanical Journal of Linnean Society* 66: 307-321.

- Senthilkumar S, Krishnamurthy KV. 1998. A cytochemical study on the mycorrhizae of *Spathoglottis plicata*. *Biologia Plantarum* 41(1): 111-119.
- Senthilkumar S, Britto SJ, Krishnamurthy KV, Hariharam C. 2000. Biochemical analysis of mycorrhizal roots of *Aerides maculosum*. *Phytomorphology* 50(3 and 4): 273-279.
- Silva CI, Milaneze-Gutierrez MA. 2004. Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). *Acta Scientiarum* 26(1): 91-100.
- Singh H. 1986. Anatomy of root in some Orchidaceae. *Acta Botanica* 14: 24-32.
- Smith SE, READ DJ. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic, London.
- Soto-Arenas MA, Dressler RL. 2010. A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla* Plumier ex Miller with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana* 9(3): 285–354.
- Stern WL. 1997. Vegetative anatomy of subtribe Orchidinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 124: 121-136.
- Stern WL, JUDD WS. 1999. Comparative vegetative anatomy and systematics of *Vanilla* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 131: 353–382.
- Stern WL, Whitten WM. 1999. Comparative vegetative anatomy of Stanhopeinae (Orchiaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 129: 87-103.
- STERN WL, Judd WS. 2001. Comparative anatomy and systematics of Catasetinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 136: 153-178.
- Stern WL, Carlswald BS. 2009. Comparative vegetative anatomy and systematics of Laeliinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 160: 21–41.
- Stern WL. 2014. Anatomia do volume X das monocotiledôneas: Orchidaceae. OUP Oxford.

- Swagel EN, Bernhard AVanH, ELLMORE GS. 1997. Substrate water potential constraints on germination of the strangler fig, *Ficus aurea* (Moraceae). *American Journal of Botany* 84(5): 716–722.
- Trépanier M, Lamy MP, Dansereau B. 2008. Phalaenopsis can absorb directly through their roots. *Plant and Soil* 319(1-2): 95-100.
- Tomlinson P, Metcalf CR. 1969. Commelinales-zingiberales. *Anatomy of the Monocotyledons: III*. Clarendon Press, Oxford, p. 193–294.
- Valladares F, Sánchez-Gómez D, Zavala MA. 2006. Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology* 94: 1103-1116.
- Zotz G. 1999. Altitudinal changes in diversity and abundance of non-vascular epiphytes in the tropics: an ecophysiological explanation. *Selbyana* 20:256–260.
- Zotz G. 2013. The systematic distribution of vascular epiphytes - a critical update. *Botanical Journal of the Linnean Society* 171: 453–481.
- Zhu W, Baud P, Wong T. 2010. Micromechanics of cataclastic pore collapse in limestone. *Journal of Geophysical Research*. p. 115.