

KAROLINE PEREIRA ANGELI

**FUNGOS MICORRÍZICOS RIZOCTONIOIDES ASSOCIADOS A PLÂNTULAS  
DE *Arundina graminifolia* (ORCHIDACEAE) E SEU POTENCIAL PARA  
GERMINAÇÃO SIMBIÓTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A582f  
2019  
Angeli, Karoline Pereira, 1987-  
Fungos micorrízicos Rizoctonioides associados a plântulas de *Arundina graminifolia* (Orchidaceae) e seu potencial para germinação simbiótica / Karoline Pereira Angeli. – Viçosa, MG, 2019.

vii, 27 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Olinto Liparini Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 19-27.

1. Orquídea. 2. Rhizoctonia. 3. Germinação. 4. Simbiose.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.  
II. Título.

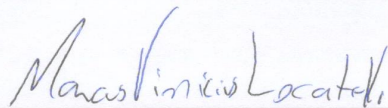
CDD 22. ed. 584.4

KAROLINE PEREIRA ANGELI

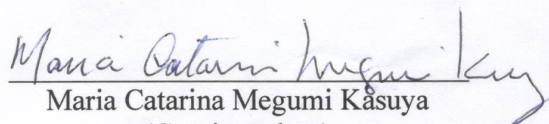
**FUNGOS MICORRÍZICOS RIZOCTONIOIDES ASSOCIADOS A PLÂNTULAS  
DE *Arundina graminifolia* (ORCHIDACEAE) E SEU POTENCIAL PARA  
GERMINAÇÃO SIMBIÓTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

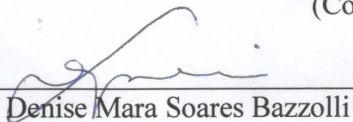
APROVADA: 20 de fevereiro de 2019.



Marcus Vinicius Locatelli  
(Coorientador)



Maria Catarina Megumi Kasuya  
(Coorientadora)



Denise Mara Soares Bazzolli



Olinto Liparini Pereira  
(Orientador)

*A toda minha família e amigos que torceram por mim,*

*DEDICO.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por iluminar o meu caminho.

Aos meus pais Altair (*in memoriam*) e Kátia, que sempre me deram muito amor, incentivo e apoio durante toda a minha jornada. Aos meus irmãos Jaqueline, Rafael e Isabella, por todo o carinho, apoio e amizade.

Ao meu namorado Gustavo, pelo amor, companheirismo e compreensão.

A Cora e Lina, por serem fonte de amor inesgotável e que sempre me trazem alegria ao coração.

Aos familiares, pelo carinho e por torcerem sempre por mim.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar esta pesquisa. À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de Mestrado. À CAPES e CNPQ por fomentarem a pesquisa científica no Brasil.

Ao meu orientador professor Olinto, pela orientação, atenção, confiança e ensinamentos. Ao meu coorientador doutor Marcus V. Locatelli, pelos ensinamentos e atenção sempre que precisei. A minha coorientadora professora Catarina, por ter colocado o Laboratório de Associações Micorrízicas à minha disposição e incentivo a continuar minha carreira acadêmica.

Ao doutorando Tomás, por toda a paciência e solicitude em me auxiliar na excussão e avaliação dos experimentos.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas em especial ao pós-doutor André (Deco) por me ajudar com as análises filogenéticas e sempre que precisei, ao Athus pela ajuda nas análises de PCR e extração de DNA, ao Fábio Alex pela ajuda com todas as dúvidas e sempre que precisei, a Marina, a Vanessa, a Simone, ao André (Jack), a Pricila, a Mayara, ao Daniel, ao Danilo, ao Thiago e a Victória por sempre serem solícitos quando precisei e pela amizade durante o período de mestrado.

Aos meus colegas e amigos do mestrado e fora dele, pela amizade, apoio e pelos momentos de alegria vividos. A todos os professores da graduação e da pós-graduação que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal. Muito Obrigada!

## **BIOGRAFIA**

KAROLINE PEREIRA ANGELI, filha de Altair Angeli e Kátia Loureiro Pereira, nasceu no Espírito Santo.

Residiu no Espírito Santo, onde concluiu o ensino médio e o curso técnico em química no Instituto Federal do Espírito Santo.

Em 2010, ingressou no curso de Agronomia do Instituto Federal do Espírito Santo, onde foi monitora de química geral e química orgânica e foi bolsista de iniciação científica trabalhando com manejo integrado de doenças da videira em ambiente protegido.

Em 2012, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa na Zona da Mata Mineira. Participou da Empresa Júnior do curso de Agronomia (AgroPlan – UFV), participou do Núcleo de Estudos em Olericultura – UFV, onde publicou seu primeiro artigo. Estagiou nos laboratórios de Interação Planta-Patógeno e Proteção de Plantas do Departamento de Fitopatologia. Obteve experiência internacional atuando na produção de plantas ornamentais perenes e nos laboratórios de Fitopatologia das professoras Samac e Kinkel no ano de 2015 na University of Minnesota, Minnesota - EUA.

Graduou-se como Engenheira Agrônoma em julho de 2016. Em março de 2017, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa. Defendeu sua dissertação em fevereiro de 2019.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	4
3.1 Coleta de plântulas e cápsulas de <i>A. graminifolia</i> .....	4
3.2 Coleta e análise do substrato .....	4
3.3 Averiguação da colonização do sistema radicular de plântulas de <i>A. graminifolia</i> ....	4
3.4 Isolamento dos fungos.....	5
3.5 Extração de DNA, sequenciamento e análises filogenéticas .....	5
3.6 Germinação simbiótica de sementes de <i>A. graminifolia</i> e <i>P. tankervilleae</i> .....	6
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	7
5. CONCLUSÕES.....	16
6. REFERÊNCIAS .....	17

## RESUMO

ANGELI, Karoline Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Fungos micorrízicos Rizoctonioides associados a plântulas de *Arundina graminifolia* (Orchidaceae) e seu potencial para germinação simbiótica.** Orientador: Olinto Liparini Pereira. Coorientadores: Marcus Vinícius Locatelli e Maria Catarina Megumi Kasuya.

A germinação e desenvolvimento de protocormos em sementes de orquídeas está condicionada a diversos fatores, dentre eles a especificidade na associação com fungos micorrízicos rizoctonioides. O presente estudo objetivou isolar e identificar espécies de fungos rizoctonioides associados ao sistema radicular de plântulas de *Arundina graminifolia*, uma espécie de orquídea terrícola asiática, estabelecida espontaneamente em Itabirito-MG, e avaliar o seu potencial de aplicação na germinação simbiótica da espécie também asiática e terrícola de interesse comercial *Phaius tankervilleae*. Foram obtidos 21 isolados de fungos rizoctonioides, sendo 15 identificados filogeneticamente com base na sequência da região ITS, 12 pertencentes à família Tulasnellaceae e 03 à família Ceratobasidiaceae, constituindo 04 possíveis espécies novas de *Tulasnella* spp. e 01 de *Ceratobasidium* sp.. Três isolados de *Tulasnella* spp. e dois de *Ceratobasidium* spp. foram selecionados para o teste de germinação. Apenas os isolados K12, K18 e K20 pertencentes ao gênero *Tulasnella*, promoveram a germinação de sementes de *A. graminifolia*, em diferentes níveis de desenvolvimento. O isolado K12 favoreceu o desenvolvimento mais rápido do protocormo. No teste com *P. tankervilleae* apenas o isolado K9 (*Ceratobasidium* sp.) promoveu o desenvolvimento do embrião dentro do envoltório com formação de rizoides, mas sem o desenvolvimento do protocormo. Diante dos resultados foi possível concluir que há uma variedade de fungos micorrízicos rizoctonioides associados ao sistema radicular de *A. graminifolia* e os isolados possuem capacidade diferenciada de germinação de sementes e estabelecimento de protocormos de *A. graminifolia* e *P. tankervilleae*.

## ABSTRACT

ANGELI, Karoline Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Rhizoctonia-like mycorrhizal fungi of *Arundina graminifolia* (Orchidaceae) seedlings and their potential for symbiotic germination.** Advisor: Olinto Liparini Pereira. Co-advisors: Marcus Vinícius Locatelli and Maria Catarina Megumi Kasuya.

The germination and development of protocorms in orchid seeds is conditioned by several factors, among them the rhizoctonioid fungi specificity. The present study aimed to isolate and identify species of rhizoctonioid fungi species associated with the root system of *Arundina graminifolia*, a species of Asian terrestrial orchid, established spontaneously in Itabirito-MG and to evaluate its potential for application in the symbiotic germination of the Asian terrestrial species of commercial interest, *Phaius tankervilleae*. Twenty-one isolates of rhizoctonioid fungi were obtained, being 15 phylogenetically identified based on the sequence of the ITS region, 12 belonging to the Tulasnellaceae family and 03 to the Ceratobasidiaceae family, constituting 04 possible new species of *Tulasnella* spp. and 01 from *Ceratobasidium* sp.. Three isolates of *Tulasnella* spp. and two from *Ceratobasidium* spp. were selected for the germination test. Only isolates K12, K18 and K20 belonging to the genus *Tulasnella* promoted the germination of *A. graminifolia* seeds at different levels of development. The K12 isolate favored the faster development of the protocorm. In the *P. tankervilleae* test only the K9 isolate (*Ceratobasidium* sp.) promoted the development of the embryo inside the wrapping with rhizoid formation, but without the development of the protocorm. From the results it was possible to conclude that there are a variety of rhizoctonioid mycorrhizal fungi associated with the *A. graminifolia* root system and the isolates have different seed germination capacity and establishment of *A. graminifolia* and *P. tankervilleae* protocorms.

# 1. INTRODUÇÃO

Orchidaceae é uma família com ampla adaptação a diversos habitats sendo possível encontrar representantes do sul ao extremo norte do planeta, com uma maior concentração de espécies nos trópicos (DRESSLER, 1981; MYERS et al., 2000; KOOPOWITZ, 2001; HUGHES, 2018). É a família com maior riqueza de espécies do reino vegetal, representando 8 % da diversidade de espécies de angiospermas (CHASE et al., 2003, 2015; WILLIS, 2017; FAY, 2018). Estima-se uma variedade de espécies entre 17.500 - 35.000 (GARAY; SWEET, 1974; GENTRY; DODSON, 1987; MABBERLEY, 1997; CRIBB et al., 2003; ZOTZ, 2013; CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016; WCSP, 2017), além de inúmeros híbridos, naturais e artificiais.

As sementes de Orchidaceae apresentam tamanho diminuto, o que limita o armazenamento de nutrientes necessários para a germinação e desenvolvimento de protocormo. A associação de um ou mais fungos específicos com a semente induzem uma resposta micotrófica do embrião da orquídea, e a germinação se dá em consequência da obtenção de carbono e nutrientes minerais provindos da digestão do tecido fúngico simbiote, possibilitando a formação de protocormos para o desenvolvimento de novas plantas (RASMUSSEN, 1995; CAMERON et al., 2006; STEINFORT et al., 2010; DEARNALEY et al., 2012). Diante disso, a germinação das sementes está diretamente condicionada a interação com fungos micorrízicos para que o desenvolvimento ocorra na natureza (RASMUSSEN, 1995).

Fungos micorrízicos de orquídeas apresentam uma perceptível diversidade relatada em diferentes habitats, com a presença de uma grande variedade de fungos em todas as fases de desenvolvimento da planta (HADLEY, 1970; RASMUSSEN, 1995; CURRAH et al., 1997; BRUNDRETT, 2004), sendo esses em sua maioria encontrados no Filo Basidiomycota e majoritariamente pertencentes a um grupo polifilético conhecido como rizoctonioides, cujos membros abrangem três famílias separadas: Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae e Serendipitaceae (WELLS 1994; RAFTER et al., 2016; WEISS et al., 2016).

A especificidade das orquídeas com os fungos micorrízicos pode variar ao longo da vida, indo de altamente específico para mais generalistas durante a fase adulta das orquídeas (BONNARDEAUX et al., 2007; BIDARTONDO e READ, 2008).

A dependência das orquídeas com os fungos micorrízicos provem de uma alta especialização desenvolvida em uma consistente estratégia de um sistema alternativo nutricional (RASMUSSEN, 1995) que pode ser estabelecido em diferentes fases do ciclo de vida das orquídeas, mas principalmente durante a germinação (HUGHES, 2017). A relação simbiótica pode ser específica da espécie e, em alguns casos, apenas um fungo é capaz de germinar sementes de um grupo de espécies relacionados entre si, ou mesmo uma única espécie de orquídea pode apresentar mais de um fungo associado a ela (OTERO et al., 2004; STEWART; KANE, 2007; STEINFORT et al., 2010). Por vezes, a especificidade estabelecida por cada grupo ou espécie pode gerar espécies geograficamente limitadas à certos habitats ou regiões (CRIBB et al., 2003), acarretando assim, em micro-endemismos.

Existem poucos trabalhos voltados para a interação fungos micorrízicos na germinação de sementes de orquídeas de espécies terrícolas em ambiente tropical. No Brasil os estudos de germinação simbiótica *in vitro* de orquídeas utilizando culturas puras tiveram início em 2005 (PEREIRA et al., 2005) e desde então poucas foram as publicações com as técnicas simbióticas aplicadas a orquídeas (PEREIRA O.L. et al., 2005; PEREIRA M.C. et al., 2015).

*Arundina graminifolia* (D.Don) Hochr. (Figura 1), também conhecida como orquídea bambu, é de habitat terrícola, exibe mais comumente flores magentas, podendo também ocorrerem formas alba e semi-alba, apresenta comportamento perene e seu pseudobulbo cilíndrico e fibroso pode atingir até 2 m de altura. É originária da Ásia tropical que se estende da Tailândia, Cingapura, Índia, Nepal, Malásia, Indonésia, China, Sri Lanka, Vietnã, Filipinas (SEIDENFADEN, 1986; FERNANDO; ORMEROD, 2008) e há cinco décadas foi introduzida na América do Sul (KOLANOWSKA; KONOWALIK, 2014). Germinações espontâneas e estabelecimento de plântulas de *A. graminifolia* formas alba e semi-alba foram observadas em condições naturais no distrito de Itabirito-MG. Por estar germinando espontaneamente em condições brasileiras, sendo uma espécie asiática, supõe-se que há a presença de fungos micorrízicos não específicos induzindo a germinação das sementes. *Arundina graminifolia* também foi observada surgindo espontaneamente na encosta das lavas do vulcão Mauna Loa no Hawaii (CLARKSON, 1997), mas nunca foi estudado os simbiontes associados a ela.

Com o presente estudo objetivou-se isolar e identificar as espécies de fungos rizoctonioides associados ao sistema radicular de plântulas de *A. graminifolia* estabelecidas espontaneamente em Itabirito-MG e avaliar o seu potencial de aplicação na germinação simbiótica da espécie asiática e terrícola de interesse comercial, *Phaius tankervilleae* (Banks ex L' Herit) Bl.

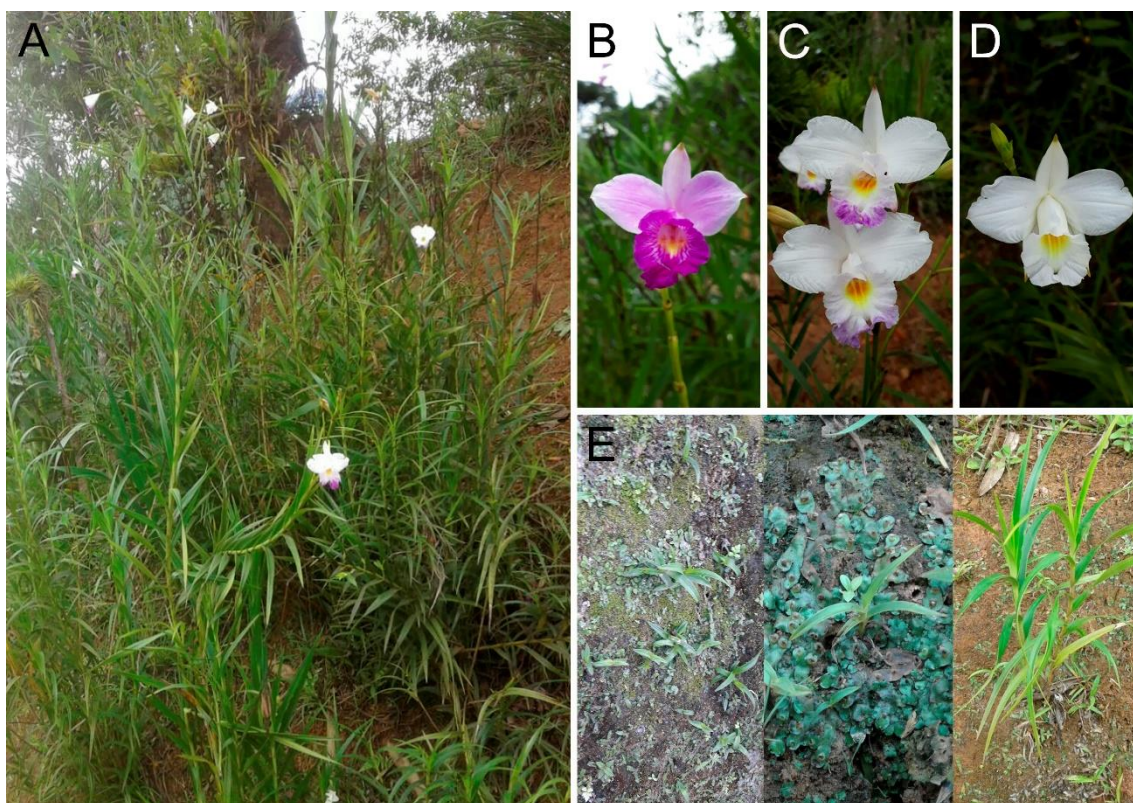


Figura 1. Morfologia de plantas de *Arundina graminifolia*. (A): Plantas adultas no distrito de Ribeirão do Eixo, Itabirito, Minas Gerais; (B-D): Variações cromáticas de *A. graminifolia*: (B): flor magenta (tipo); (C): *semi-alba*; (D): *alba*; (E): plântulas e plantas estabelecidas, provenientes de germinação simbiótica em campo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Isolar, identificar e avaliar o potencial de fungos micorrízicos não específicos, obtidos de *A. graminifolia*, em germinar simbioticamente *Phaius tankervilleae*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar fungos rizoctonioides associados ao sistema radicular de plântulas de *A. graminifolia*;
- Estabelecer o posicionamento filogenético das espécies encontradas;

- Avaliar a capacidade dos isolados em germinar simbioticamente *A. graminifolia*, comprovando a relação micorrízica de determinados isolados;
- Avaliar o potencial dos isolados em germinar simbioticamente *P. tankervilleae*.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas, pertencente ao Departamento de Fitopatologia e no Laboratório de Associações Micorrízicas, pertencente ao Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

#### **3.1 Coleta de plântulas e cápsulas de *A. graminifolia***

Raízes sadias de 15 plântulas provenientes de germinação espontânea e cápsulas maduras de plantas adultas adjacentes de *A. graminifolia* foram coletadas no distrito de Ribeirão do Eixo, Itabirito, Minas Gerais.

As amostras de raízes e cápsulas foram armazenadas sob refrigeração de 4 – 6 °C assim que chegaram no laboratório. As sementes foram retiradas das cápsulas e armazenadas em dessecador contendo sílica-gel.

#### **3.2 Coleta e análise do substrato**

Amostras do substrato *in loco* foram coletas no entorno de plântulas de *A. graminifolia* em pontos distintos para análise. O substrato foi separado em duas camadas para caracterização física e química, sendo uma mais superficial até aproximadamente 3 cm de profundidade, destacadamente rasa com resíduos orgânicos, e a outra mais profunda subsequente acompanhando o sistema radicular. Foram realizadas análise química e física de ambas camadas do substrato separadamente.

#### **3.3 Averiguação da colonização do sistema radicular de plântulas de *A. graminifolia***

Parte das amostras de raízes das plântulas foram lavadas em água corrente para remoção dos detritos aderidos ao velame e seccionados manualmente para montagem entre lâmina e lamínula com adição de lactoglicerol e observação de *pelotons* sob microscópio Olympus BX 53<sup>®</sup> equipado com uma câmera digital Q-Color 5 Olympus.

### 3.4 Isolamento dos fungos

Seguindo o protocolo descrito por Zambolim e Pereira (2012), realizou-se o isolamento fúngico, pelo método indireto, das raízes. Para a obtenção dos isolados, fragmentos de 5 mm de diâmetro de folhas, ramos e frutos sadios foram desinfestados em etanol 95 % (v/v) por 1 minuto, hipoclorito de sódio 3 % (v/v) por 1 minuto, etanol 95 % (v/v) por 30 segundos e lavados com água destilada autoclavada (PROMPUTTHA et al., 2007). Posteriormente, os fragmentos foram dispostos sobre o meio batata-dextrose (BDA) com antibiótico rifamicina SV sódica 10 mg/ml, em placas de Petri e incubados a 25 °C. Seguindo as características descritas por Pereira e Kasuya (2010), colônias que apresentavam a formação de ângulos retos de 90 ° nas ramificações, células monilíoides, coloração de colônia castanho/bege à branca e aspecto granuloso, aveludado ou liso, foram transferidos para placas com meio aveia agar (OMA) para obtenção de cultura pura. Fungos com micélio negro, escuros e/ou que esporularam foram descartados. Após a obtenção de todos os isolados, as culturas puras cultivadas foram armazenadas em glicerol e sílica gel conforme protocolo de Dhingra e Sinclair (1985) e depositados na Coleção Octávio Almeida Drummond (COAD).

### 3.5 Extração de DNA, sequenciamento e análises filogenéticas

A caracterização molecular dos fungos foi efetuada por análise filogenética, baseada em regiões gênicas usadas como marcadores universais para fungos (SCHOCH et al., 2012). Os isolados foram cultivados em meio BDA onde cresceram sob papel celofane a 25 °C. O micélio foi raspado com um palito estéril e transferido para um microtubo de 1,5 ml. A extração genômica de DNA foi realizada usando o Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard® (Promega Corporation, WI, EUA) de acordo com Pinho et al. (2012) usando os *primers* ITS5 (White et al. 1990) / LR5 (Vilgalys; Hester, 1990). A reação de PCR de cada isolado foi realizada com 12,5 µl de Master Mix TM 2 × Dream Taq TM (MBI Fermentas, Vilnius, Lituânia); 1 µl de cada *forward* e *reverse* e 10 µM do *primer* (Invitrogen, Carlsbad, CA); 1 µl de dimetilsulfido (DMSO, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO); 7,5 µl de água sem nuclease e 2 µl de DNA gênico (50 ng/µL). As condições de ciclagem das regiões genômicas compreenderam uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, alongamento a 72 °C por 1 min e um alongamento final a 72 °C por 10 min. A temperatura de anelamento dos iniciadores ITS5 / LR5 foi de 50 °C durante 30 segundos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2

% corados com GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA) em tampão 1 x TAE e visualizados sob luz UV para verificar o tamanho da amplificação. O produto de PCR foi purificado utilizando 5 µl dos produtos de amplificados e 2 µl do ExoProStar da PCR passo 1. O produto final desta purificação foi diluído com 15 µl de água sem nuclease. O sequenciamento foi realizado pela Macrogen Inc., Coréia (<http://www.macrogen.com>). As seqüências de nucleotídeos foram editadas e verificadas manualmente para obter as seqüências de consenso usando o software BioEdit® (HALL, 2013). As seqüências de consenso foram comparadas com o banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando o programa BLAST. Seqüências das espécies com cada gênero identificado foram baixadas no formato FASTA e alinhadas usando o programa de alinhamento de múltiplas seqüências MUSCLE® (EDGAR, 2004), que é executado pelo software MEGA v. 7 (KUMAR et al., 2016). Análises filogenéticas foram realizadas por inferência bayesiana (BI) empregando o método de Markov Chain Monte Carlo. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado usando MrMODELTEST® v.2.3 (POSADA e CRANDALL, 1998) e selecionado de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC). A análise filogenética foi realizada no portal CIPRES (MILLER et al., 2010) usando MrBayes v.3.2.3 (RONQUIST et al. 2012). Quatro cadeias MCMC foram executadas simultaneamente, a partir de árvores aleatórias até 10 000 000 gerações. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, queimando 25 % de todas as árvores obtidas. Probabilidades posteriores (RANNALA; YANG, 1996) foram determinadas na árvore mais consensual entre as 15.000 árvores remanescentes. As árvores foram visualizadas no FigTree® v. 1.4.3 (RAMBAUT, 2009) e exportadas para programas gráficos. Os fungos *Botryobasidium botryosum* e *Waitea circinata* foram usados como *outgroup* nas análises filogenéticas da família Tulasnellasceae, seguindo a filogenia de Solís et al. (2017), e da família Ceratobasidiaceae, de acordo com a análise de Melo et al. (2018), respectivamente.

### **3.6 Germinação simbiótica de sementes de *A. graminifolia* e *P. tankervilleae***

O teste de germinação foi conduzido em dois meios sólidos de cultivo, sendo um assimbiótico e o outro simbiótico (com os isolados inoculados) em meio aveia, com controle e teste negativo. Para o cultivo assimbiótico de orquídeas foram usados 2 g de carvão ativado, 30 g de açúcar cristal, 5 ml de adubo para orquídeas (Orquídeas B&G®) e 10 g de ágar por litro. Para o meio simbiótico foi usado o protocolo de Rafter et al., 2016, com 3,5 g de aveia e 0,1 g de extrato de levedura. A quantidade de sementes foi

calibrada através da câmara de Peters, ajustada de 300 a 350 sementes por placa de *A. graminifolia* e de 400 a 450 sementes por placa de *P. tankervilleae*, por se serem sementes menores.

As sementes foram embebidas em água destilada autoclavada por 2 h, em seguida colocadas em solução de 25% (v/v) com água sanitária comercial 2,5 % (v/v) por 10 minutos com posterior lavagem com água destilada autoclavada e repetição desse passo.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Pelotons* intactos e degradados foram observados nos cortes transversais realizados em raízes de plântulas de *A. graminifolia* confirmando a associação de fungos micorrízicos com a planta (Figura 2). Também foi possível constatar que as raízes mais jovens estavam mais colonizadas do que as mais velhas, além de apresentarem uma maior quantidade de *pelotons* intactos, também observados por Nogueira et al (2005) em orquídeas de campos rupestres do Quadrilátero Ferrífero e por Bonnardeaux et al., (2007) em orquídeas terrícolas da Austrália e África do Sul.

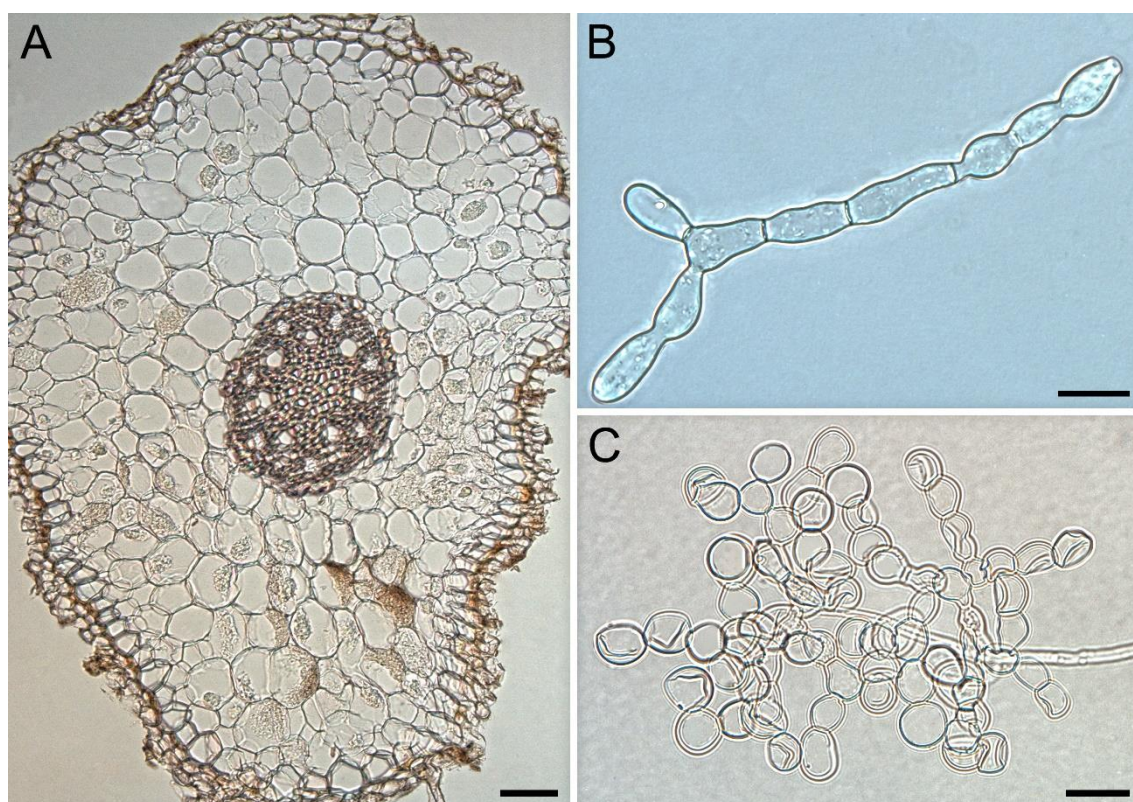


Figura 2. Corte transversal de raízes de plântulas de *A. graminifolia* colonizados por fungos micorrízicos. (A): corte transversal de raiz de plântula de *Arundina graminifolia* com presença de *pelotons*, escala: 100  $\mu\text{m}$ ; (B): células molinioides de *Ceratobasidium* sp. (K8), escala: 20  $\mu\text{m}$ ; (C): células molinioides de *Tulasnella* sp. (K12), escala: 20  $\mu\text{m}$ .

Os dados da análise física permitiram classificar a textura do substrato, pertencente ao terço inferior do corte do barranco, onde se observa a germinação *A. graminifolia*, como franco-argilo-siltosa (Tabela 1) que em conjunto com a análise química (Tabela 2) tratando-se de um substrato de baixa fertilidade natural que condiz com a descrição de Valente (2009) sobre a região do Quadrilátero Ferrífero que, em geral, apresenta solos ácidos, pobres em nutrientes e ricos em alumínio trocável. A matéria orgânica presente na camada superior do solo possivelmente está desempenhando um importante papel no estabelecimento da comunidade fúngica micorrízica, visto que esses fungos possuem crescimento favorecido em solos ricos em materiais orgânicos (GOSLING et al., 2006; CLEMMENSEN et al., 2013). A associação micorrízica é formada pela interação simbiótica entre solo, planta e fungos micorrízicos (ATLAS; BARTHA, 1997; SMITH; READ, 1997; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Assim como em orquídeas, essa associação pode ser muito benéfica para plantas em condições ambientais desfavoráveis, tais como solos pobres ou em períodos de estiagem (SMITH; READ, 1997), pois auxiliam na aquisição de nutrientes através da mineralização e solubilização, principalmente na aquisição de P e N para as plantas a eles associados (HADLEY; PEGG, 1989; SMITH; READ, 1997; JONER et al., 2000). Além disso, atuam como mediadores no transporte de água e de nutrientes da solução do solo para a planta, abrangendo uma maior área de absorção nutritiva da planta com o solo (CAMERON et al., 2006).

Tabela 1. Composição física do substrato do entorno e rizosfera de *Arundina graminifolia*.

Areia		Argila	Silte	Classificação textural*
grossa	fina	-----kg kg <sup>-1</sup> -----		
0,042	0,037	0,593	0,328	Franco-Argilo-Siltosa
0,027	0,038	0,634	0,300	

\*Sistema Brasileiro de Classificação de Solos - SBCS

Foram obtidos 21 isolados de fungos rizoctonioides, dos fragmentos da raiz de plântulas de *A. graminifolia*, com características culturais semelhantes, como micélio esbranquiçado à marrom claro, hifas com ramificação em ângulo reto e presença de células monilioides.

Tabela 2. Composição química do substrato do entorno e rizosfera de *Arundina graminifolia*.

Profundidade do material coletado	pH	Al <sup>3+</sup>	H + Al	Ca	Mg	K	P	V	P-rem	MO
		----- cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----				-- mg dm <sup>-3</sup> --		%	mg L <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>
0 – 3 cm	4,87	0,20	1,6	1,16	0,19	71	1,5	48,9	25,3	2,61
3 – 15 cm	4,80	0,39	1,3	0,40	0,07	6	0,3	27,4	38,8	0,65

pH em água, KCl e CaCl - Relação 1:2,5; P - K - Extrator Mehlich-1; H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L - pH 7,0; V= Índice de Saturação por Bases ; P-rem = Fósforo Remanescente; Ca<sup>2+</sup> - Mg<sup>2+</sup> - Al<sup>3+</sup> - Extrator: KCl - 1 mol/L; MO (Mat. Orgânica) = C.Org x 1,724 -Walkley-Black.

No entanto, as características morfológicas não são consideradas suficientes para a identificação dos isolados, ressaltando a importância da identificação com base na análise molecular.

Quinze fungos micorrízicos foram identificados com base na sequência da região ITS, sendo doze pertencentes à família Tulasnellaceae e três a família Ceratobasidiaceae. Para os demais isolados (seis) não foram obtidas sequências de qualidade para análise molecular, devido ao menor tamanho desses *amplicons*.

Tulasnellaceae e Ceratobasidiaceae são pertencentes ao Filo Basidiomycota. Segundo Rasmussen (1995) e Taylor et al. (2002) quase todos os fungos micorrízicos de orquídeas conhecidas são pertencentes ao Filo Basidiomycota. Diversos trabalhos envolvendo a identificação de fungos micorrízicos em orquídeas terrícolas têm observado a associação com membros de Tulasnellaceae (SHARMA et al., 2003; STEINFORT et al., 2010; KEEL et al., 2011; SATHIYADASH et al., 2014; FRERICKS et al., 2018) e Ceratobasidiaceae (ZETTLER et al., 2001; SHARMA et al., 2003; SAZAK; OZDENER, 2006; AGGARWAL; ZETTLER, 2010; STEINFORT et al., 2010; DECRUSE et al., 2018). Fungos rizoctonioides pertencentes aos gêneros *Rhizoctonia*, *Ceratobasium*, *Tulasnella* e *Sebacina* vêm sendo identificados com base em análises filogenéticas, especialmente utilizando a região ITS.

Entretanto, a grande maioria das sequências da região ITS depositadas em banco de dados são referentes à isolados identificados apenas em nível de gênero ou oriundos de sequências amplificadas diretamente do DNA total do sistema radicular colonizado. Outro fator que dificulta a identificação da espécie é a falta de sequências de tipos ou culturas de referências nos bancos de dados (NILSSON et al., 2008; PEREIRA et al., 2009). Linde et al. (2014) propuseram análises *multilocus* (sendo seis genes de sequência

que inclui um gene mitocondrial (C14436; ATP) e cinco genes nucleares: C3304; helicase dependente de ATP, C10499; 26 complexo regulador do proteossoma, C12424; isocitrato desidrogenase, C4722; CAS1, C4102; sintase do glutamato) para delimitar espécies de *Tulasnella* em suporte a utilização apenas da região ITS, entretanto a topologia da árvore concatenada é muito semelhante a análise utilizando apenas a região ITS, o que não justifica o aumento do custo das análises, além de conter poucos ou nenhum dado das regiões gênicas propostas depositadas no NCBI. Além disso, a região ITS tem sido amplamente utilizada para delimitação de espécies em *Tulasnella* e *Ceratobasidium* (SOLÍS et al., 2017; LINDE et al., 2017; e MELO et al., 2018).

Com base na análise filogenética, utilizando sequências nucleotídicas da região ITS (Figura 3), é possível observar que os três isolados de *Ceratobasidium* spp. formam um clado separado das demais espécies conhecidas, o que sugere ser uma nova espécie.

Para *Tulasnella* spp. a análise filogenética também baseada na região ITS (Figura 4), apresenta uma distribuição mais diversificada com o isolado K12 se agrupando no clado de *Tulasnella repens*, os isolados K1, K3, K4, K5, K14, K16, K17 e K20 agruparam juntos, e esse clado se diferenciou do isolado K21 com suporte de 0,97, o que possivelmente mostram ser duas espécies diferentes. O isolado K2 formou um ramo com suporte de 1, ficando isolado dos demais, bem como o isolado K18.

Com base nesses dados é possível distinguir pelo menos quatro espécies diferentes pertencentes ao gênero *Tulasnella* e uma de *Ceratobasidium*.

Com base nas análises filogenéticas foram escolhidos três representantes distintos de *Tulasnella* spp. e dois representantes de *Ceratobasidium* spp. para os testes de germinação simbiótica de sementes de *A. graminifolia* e *P. tankervilleae*. Apenas os isolados K12 e K20 pertencentes ao gênero *Tulasnella*, promoveram a germinação de sementes de *A. graminifolia* após 15 dias e o isolado K18 aos 22 dias, em diferentes níveis de desenvolvimento (Figura 5). Foram observadas as fases da germinação e estabelecimento do protocormo conforme descritas por Zettler e Hofer (1998), passando pela formação de rizoides, rompimento da testa, aparecimento do pró-meristema e lançamento da primeira e segunda folha, induzido pelos três isolados, com destaque para o isolado K12 com formação da segunda folha em 30 dias e os demais isolados em aproximadamente 37 dias. Os isolados do gênero *Ceratobasidium* (K8 e K9) não promoveram a germinação das sementes (Figura 5).

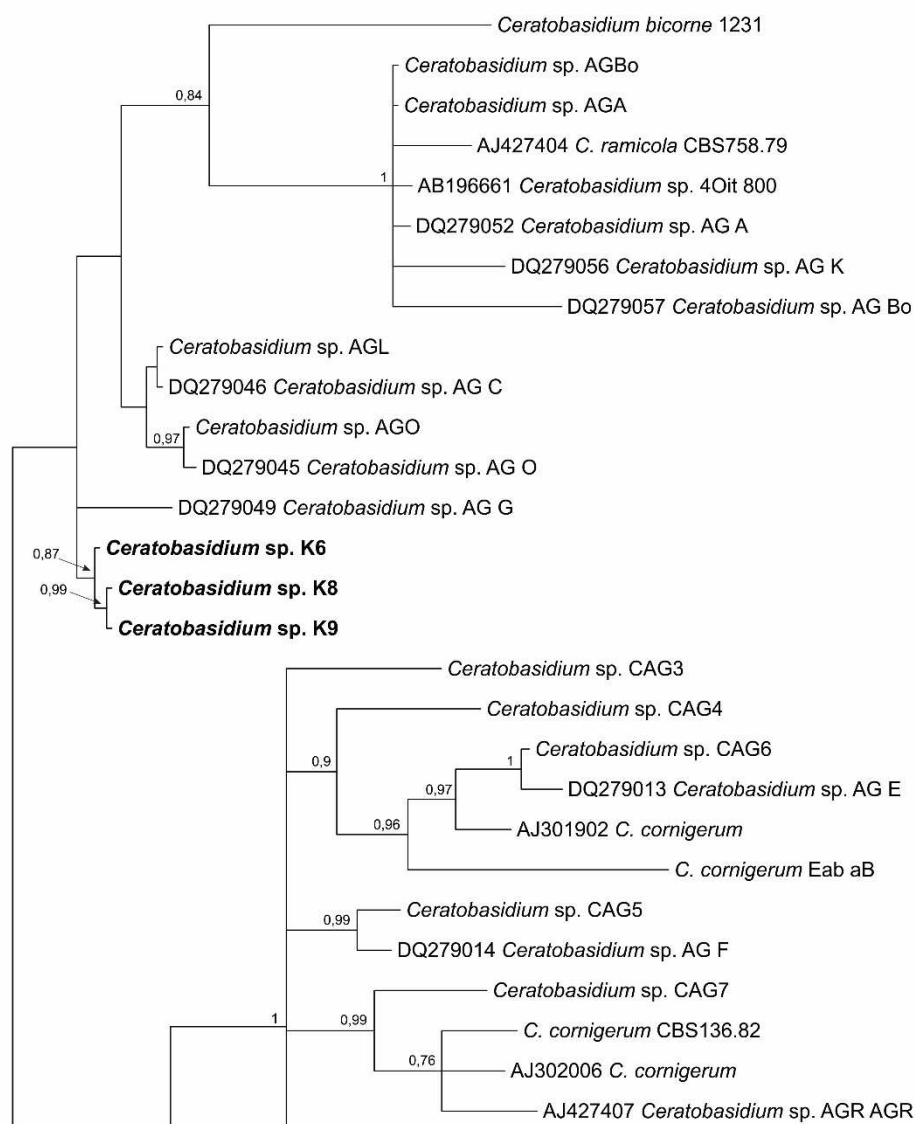


Figura 3. Árvore Filogenética Bayesianas baseada nas sequências nucleotídicas da região ITS-5.8S rRNA mostrando as relações entre espécies conhecidas de *Ceratobasidium* spp. Valores de probabilidade posteriores > 0,7 são indicados acima dos nós. A árvore foi enraizada com *Waitea circinata* IMI 375117.

Essas observações sugerem que a *A. graminifolia* possui maior especificidade com *Tulasnella* spp. do que *Ceratobasidium* spp. para a germinação de sementes. Nos meios de cultivo com aveia modificado sem isolados fúngicos não houve a germinação da semente. No meio B&G com 30 dias as sementes apresentavam o embrião bem desenvolvido, mas sem rizoides e rompimento da testa.

Os mesmos isolados de *Tulasnella* spp. e *Ceratobasidium* spp., foram utilizados para indução da germinação de sementes de *P. tankervilleae*, para avaliação do potencial



Figura 4. Árvore filogenética Bayesiana baseada nas sequências nucleotídicas da região ITS-5.8S rRNA mostrando as relações entre espécies conhecidas de *Tulasnella* spp. Valores de probabilidade posteriores > 0,7 são indicados acima dos nós. A árvore foi enraizada com *Botryobasidium botryosum* AFTOL ID604.

desses isolados em promover a germinação de uma outra espécie de orquídea também de origem asiática e terrícola. Em contraste com o observado em *A. graminifolia*, apenas o isolado K9 (*Ceratobasidium* sp.) promoveu um bom desenvolvimento do embrião dentro do envoltório com formação de rizoides em 14 dias, chegando apenas até a formação do pró-meristema.

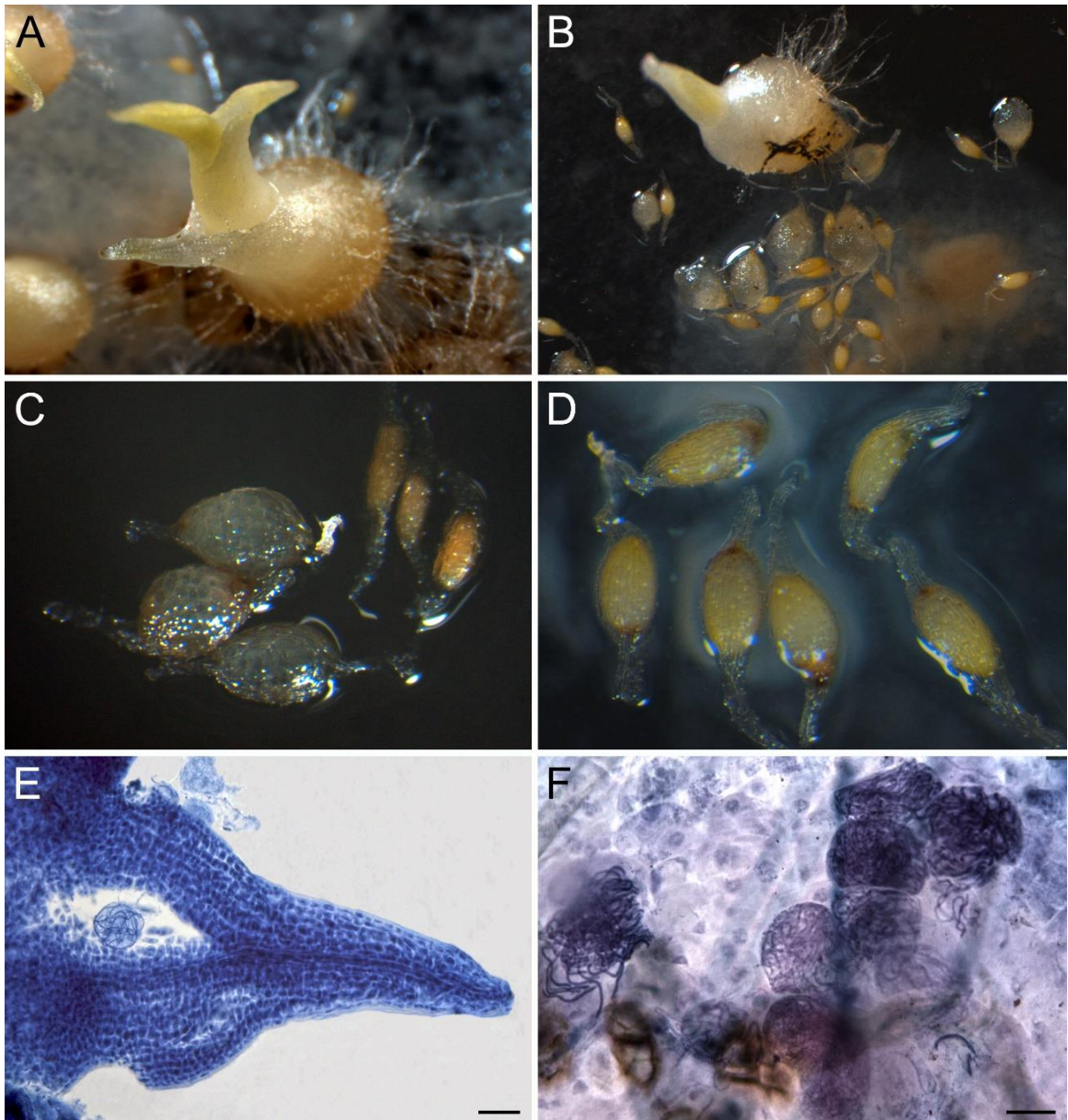


Figura 5. Teste de germinação de *A. graminifolia* em meios simbiótico e assimiótico. (A): germinação simbiótica e formação da primeira e segunda folha, utilizando isolado K12 de *Tulasnella* sp.; (B): formação de protocormo em meio simbiótico e aparecimento do pró-meristema, utilizando isolado K20 de *Tulasnella* sp.; (C): formação de protocormo em meio assimiótica B&G; (D): sementes em meio aveia modificado (controle); (E): esmagamento do protocormo e coloração com azul de tripano para constatação da formação de *pelotons*, escala: 100 µm; (F): *pelotons* nos tecidos do protocormo corados com azul de tripano, escala: 50 µm.

Tabela 3. Avaliação do desenvolvimento da germinação de sementes e estabelecimento dos protocormos de *Arundina graminifolia* e *Phaius tankervilleae* em condições simbiótica e assimbiótica.

Espécie	Meio de cultura	Isolado	Germinação e rizoides (até 25 dias) <sup>1</sup>	Formação de protocormo <sup>1,2</sup>
<i>Arundina graminifolia</i>	Aveia*	K8	-	-
		K9	-	-
		K12	+	+
		K18	+	+
		K20	+	+
	B&G	Assimbiotico	-	+
		Assimbiotico	-	-
<i>Phaius tankervilleae</i>	Aveia*	K8	-	-
		K9	-	-
		K12	-	-
		K18	-	-
		K20	-	-
	B&G	Assimbiotico	-	-
		Assimbiotico	-	-

<sup>1</sup>(-) Ausência, (+) Presença; <sup>2</sup>Formação de rizoides bem desenvolvidos, colonizados e protocormos até o primeiro par de folhas; \*Meio aveia modificado.

Mesmo que alguns fungos colonizem as células do embrião de uma semente, nem todos são capazes de promover a germinação das sementes e estabelecimento/desenvolvimento do protocormo até o início de sua fase autotrófica com a emissão da primeira folha clorofilada (ARDITTI, 1992; PEREIRA et al., 2005; 2011). No teste de indução da germinação de sementes de *P. tankervilleae* o isolado K9 correspondente a *Ceratobasidium* sp. apresentou maior especificidade do que os isolados de *Tulasnella* spp. e o isolado K8 de *Ceratobasidium*, mesmo que não tenha alcançado a fase autotrófica. Bidartondo e Read (2008) relatam que algumas orquídeas são sustentadas por grupos filogeneticamente específicos de fungos simbiotes que interagem de diferentes formas em diferentes etapas do ciclo de vida da planta. Portanto, é provável que a colonização, desde a germinação, não seja realizada apenas por um organismo simbiote, mas por um conjunto deles, promovendo interações diferentes entre si (fungo-fungo e orquídea-fungo), durante todo o desenvolvimento e estabelecimento das necessidades intrínsecas e extrínsecas relacionadas a planta.

Em geral as espécies de orquídeas possuem especificidade a nível de gêneros, espécies ou isolados de fungos micorrízicos (HADLEY; PEGG, 1989; VALADARES, 2009). Alguns autores questionam o uso exclusivo da técnica *in vitro* para determinar a especificidade entre fungo e orquídea, considerando que tais condições nem sempre representam as mesmas onde naturalmente ocorrem a germinação simbiótica (PHILLIPS et al., 2011). Diante disso, mesmo que os isolados K8 e K9 de *Ceratobasidium* não

possuam a capacidade de germinação de sementes de *A. graminifolia in vitro*, é possível que sejam em condições *in situ* ou em um posterior estabelecimento do protocormo. Uma outra possibilidade é que esses isolados possam ter influência em algum outro estágio de desenvolvimento no ciclo de vida da planta, visto que *Ceratobasidium* spp. são comumente relatados como fungos micorrízicos de orquídeas (e.g. DECRUSE et al., 2018). Ainda assim, fungos endofíticos não-micorrízicos contribuem para o ciclo de vida da planta ampliando o acesso das raízes aos nutrientes do solo, ativam a indução de resistência da planta pela produção de metabólitos secundários e podem até auxiliar no crescimento da planta através de fitoreguladores (STONE et al. 2000; CHEN et al., 2010; XING et al., 2011; DUTTA et al., 2014).

*Arundina graminifolia* (Figura 1) e *P. tankervilleae* espécies de mesma origem e terrícolas, apresentam especificidades distintas no que tange a germinação de suas sementes. Essa especificidade talvez seja uma característica conservada ao longo da evolução e talvez seja mais provável que orquídeas próximas em um mesmo habitat compartilhem mais fungos micorrízicos em comum do que as orquídeas de ambientes distantes. McKendrick et al., (2002) e McCormick et al., (2004) relatam que fungos micorrízicos associados às orquídeas são mais semelhantes quando as orquídeas crescem próximas umas das outras. Outro dado interessante foi a constatação de especificidade inclusive entre os próprios simbiontes isolados das raízes de plântulas *A. graminifolia*, na germinação de suas sementes.

Zettler et al. (1998) e Pereira et al. (2005) confirmam que algumas espécies de orquídea apenas germinam com fungos isolados de suas próprias raízes em campo. No entanto, existem trabalhos com sucesso na germinação *in vitro* de orquídeas com isolados fúngicos oriundos de outras orquídeas. Segundo Hadley (1970), em testes de germinação simbiótica *in vitro* é possível a associação de simbiontes de uma gama diferente da encontrada no sistema radicular, em seu habitat natural. Contudo, na natureza variações intraespecíficas existentes entre os isolados rizoctonioides, assim como entre as populações de uma espécie de orquídea, podem interferir no sucesso da associação micorrízica (PEREIRA et al., 2011). Segundo Pereira et al., (2006) a especificidade da associação micorrízica em orquídeas ainda é fonte de controvérsia, pois existem trabalhos demonstrando a existência de especificidade entre fungo e planta e outros demonstrando a baixa ou até nenhuma especificidade.

A especificidade está atrelada a vários fatores sejam eles bióticos ou abióticos, mas principalmente às associações micorrízicas recrutadas pelo hospedeiro, que podem determinar inclusive a sua distribuição geográfica. Orquídeas amplamente distribuídas geralmente apresentam especificidade baixa com fungos micorrízicos, ou são específicas a associações fúngicas igualmente bem distribuídas, como se observa em diversas relações mutualísticas (BASCOMPTE et al., 2003; VAZQUEZ; AIZEN, 2003, OTERO, 2007). Mas também pode ser uma questão de plasticidade da associação micorrízica, onde as orquídeas são capazes de alternar entre os fungos simbiotes em resposta a uma adaptação a ambientes hostis (MCCORMICK et al., 2006).

A observação de *A. graminifolia* germinando espontaneamente em campo levantou a possibilidade de se descobrir um potencial isolado generalista com aplicações comerciais para orquídeas valorizadas comercialmente. No entanto, com base nos resultados, por mais que um dos fungos isolados seja generalista de fato, ainda assim, a germinação de sementes poderá depender de diversos outros fatores.

Existem isolados fúngicos com capacidade de germinação de várias espécies de orquídeas, porém essa compatibilidade nem sempre será observada ou de fato promissora até a planta tornar-se autotrófica. Portanto, se faz necessário a manutenção de coleções amplas de isolados diferentes tanto para o estudo de especificidade fungo-orquídea, quanto para a conservação de espécies e exploração comercial de orquídeas através da germinação simbiótica.

## 5. CONCLUSÕES

Há diferentes famílias de fungos micorrízicos rizotonioides associados ao sistema radicular de *Arundina graminifolia*.

Os isolados possuem capacidade diferenciada de germinação de sementes e estabelecimento de protocormos de *Arundina graminifolia* e *Phaius tankervilleae*.

## 6. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S.; ZETTLER, L. W. Reintroduction of an endangered terrestrial orchid, *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don) Soo, assisted by symbiotic seed germination: first report from the Indian subcontinent. **Nature and Science**. v. 8, p. 139 -145, 2010.

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. Wiley, New York, 1992.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology Fundamentals and Principles**. Menlo Park, Benjamin/Cummings Science Publishing Company, 4 th Ed., p. 511-573, 1997.

BASCOMPTE, J.; P. JORDANO, C. J.; MELIAN, J.; OLESEN M. The nested assembly of plant–animal mutualistic networks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, p. 9383–9387, 2003.

BIDARTONDO, M.; READ, D.J. Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. **Mol. Ecol**. v. 17, p. 3707–3716, 2008.

BONNARDEAUX, Y.; BRUNDRETT, M.; BATTY; A.; DIXON, K.; KOCH, J.; SIVASITHAMPARAM, K. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. **Mycol Res.**, v. 3, p. 51-61, 2007.

BRUNDRETT, M. Diversity and classification of mycorrhizal associations. **Biol Rev**, n. 79, p. 473–495, 2004.

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

CURRAH, R. S.; ZELMER, C. D.; HAMBLETON, S.; RICHARDSON, K. A. Fungi from orchid mycorrhizas. In: ARDITTI, J.; PRIDGEON, A. M. (eds) **Orchid biology: reviews and perspectives**, VII. Springer, Netherlands, 1997, p. 117–170.

CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; BARRETT, R.L.; FREUDENSTEIN, J. V. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: DIXON, K.W.;

KELL, S. P.; BARRETT, R. L.; CRIBB, P. J. (eds) **Orchid conservation**. Sabah Natural History Publications, Kota Kinabalu, 2003, p. 69–89.

CHASE, M.W., CAMERON, K.M., FREUDENSTEIN, J.V., PRIDGEON, A.M., SALAZAR, G., VAN DEN BERG, C., SCHUITEMAN, A. An updated classification of Orchidaceae. **Bot. J. Linn. Soc.**, n.177, p. 151-174, 2015.

CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, n. 261 p.201-217, 2016.

CLARKSON, B. D. Vegetation succession (1967–1989) on five recent montane lava flows, Mauna Loa, Hawaii. **New Zealand Journal of Ecology**, n. 22, p. 1–9, 1997.

CLEMMENSEN, K. E.; BAHR, A.; OVASKAINEN, O.; DAHLBERG, A.; EKBLAD, A.; WALLANDER, H.; LINDAHL, B. D. Roots and associated fungi drive long- term carbon sequestration in boreal forest. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1615–1618, 2013.

CRIBB, P. J.; KELL, S. P.; DIXON, K. W.; BARRETT, R. L. Orchid conservation: a global perspective. In: DIXON, K. W.; KELL, S. P.; BARRETT, R. L.; CRIBB, P. J. (eds) **Orchid conservation**. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia, 2003, p. 1–24.

CHEN, X. M.; DONG, H. L.; HU, K. X.; SUN, Z. R.; CHEN, J.; HUO, S. X. Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe. **J Plant Growth Regul.** v. 29, p. 328–337, 2010.

DECRUSE, S. W.; NEETHU, R. S.; PRADEEP, N. S.; Seed germination and seedling growth promoted by a Ceratobasidiaceae clone in *Vanda thwaitesii* Hook. f., an endangered orchid species endemic to South Western Ghats, India and Sri Lanka. **South African Journal of Botany**, v. 116, p. 222–229, 2018.

DEARNALEY, J. D. W.; MARTOS, F.; SELOSSE, M-A. Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In: HOCK, B. (ed) **Fungal associations**, v. 9, 2nd ed. Springer, Berlin Heidelberg, 2012, p. 207–230.

DUTTA, D.; PUZARI, K. C.; GOGOI, R.; DUTTA, P. Endophytes: Exploitation as a Tool in Plant Protection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 621-629, 2014.

DRESSLER R. L. The orchids. Natural history and classification. **Cambridge: Harvard University Press**, 1981.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 1985.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792–1797, 2004.

FAY, M. F. Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? **Botanical Studies**, p. 59-16, 2018.

FERNANDO, S.; ORMEROD, P. An annotated checklist of the orchids of Sri Lanka. **Rheedea**, v. 18, n. 1, p. 1–28, 2008.

FRERICKS, J.; MUNKACSI, A.; RITCHIE, P.; LUO, Y.; LEHNEBACH, C. A.; Phylogenetic affinities and in vitro seed germination of the threatened New Zealand orchid *Spiranthes novae-zelandiae*. **New Zealand Journal of Botany**, 2018.

GARAY, L. A.; SWEET, H. R. Orchidaceae. In: HOWARD, R. A. (ed) **Flora of the Lesser Antilles**. Arnold Arboretum. Harvard University, Jamaica Plain, Massachusetts, 1974.

GENTRY, A. H.; DODSON, C. H. Diversity and Biogeography of Neotropical Vascular Epiphytes. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. N. 74, p. 205-233, 1987.

GOSLING, P.; HODGE, A.; GOODLASS, G.; BENDING, G. D. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and organic farming. **Agric. Ecosyst. Environ.** v. 113, p. 17-35, 2006.

MABBERLEY, D. J. **The Plant Book**. Cambridge University Press, Cambridge, 1997.

HADLEY, G.; PEGG, G. F. Host-fungus relationships in orchids mycorrhizal systems. In: PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Modern methods in orchid conservation: The role of physiology, ecology and management**. Cambridge University Press, 1989, p.57-71.

HADLEY, G. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. **New Phytol**, n. 69, p.1015–1023, 1970.

HUGHES, O. T. W. Orchid – mycorrhiza relationships, propagations of terrestrial and epiphytic orchids from seed. 2018. Thesis (Doctoral of Biology and Conservation) – Ecology School of Science and the Environment, **Manchester Metropolitan University**. Manchester.

JONER EJ, RAVNSKOV S, JAKOBSEN I. Arbuscular mycorrhizal phosphate transport under monoxenic conditions using radio- labelled inorganic and organic phosphate. **Biotechnology Letters**, p. 1705–1708, 2000.

KEEL, B. G.; ZETTLER, L.W.; KAPLIN, B. A. Seed Germination of *Habenaria repens* (Orchidaceae) *in situ* beyond its range, and its potential for assisted migration imposed by climate change. **Castanea**, v. 76, p. 43–54, 2011.

KOLANOWSKA, M.; KONOWALIK, K.; Niche conservatism and future changes in the potential area coverage of *Arundina graminifolia*, an invasive orchid species from Southeast Asia, **Biotropica**, v.46 , n. 2, p. 157–165, 2014.

KOPOWITZ, H. Orchids and their conservation. **Timber Press**, Portland; 2001.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v.33, n.7, p. 1870–1874, 2016.

KRISTIANSEN, K. A.; FREUDENSTEIN, J. V; RASMUSSEN, F. N.; RASMUSSEN; H. N. Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). **Mol Phylogenet Evol**, v. 33, p. 251–258, 2004.

LINDE, C. C.; PHILLIPS, R. D.; CRISP, M. D.; PEAKALL, R. Congruent species delineation of *Tulasnella* using multiple loci and methods. **New Phytologist**, v. 201, p. 6–12, 2014.

LINDE, C.C.; MAY, T.W.; PHILLIPS, R.D.; RUIBAL, M., SMITH, L.M.; PEAKALL, R. New species of *Tulasnella* associated with terrestrial orchids in Australia. **The International Mycological Association Fungus**, n. 8, p. 27–47, 2017.

MELO, M.P., MATOS, K.S., MOREIRA, S.I. et al. Two new *Ceratobasidium* species causing white thread blight on tropical plants in Brazil. *Trop. plant pathol.* (2018) n. 43, p. 559, 2018.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**. New Orleans LA, 2010, p.1-8.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006, p. 729.

MCCORMICK, M. K.; WHIGHAM, D. F.; O'NEILL, J. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. **New Phytol**, v. 163, p. 425–438, 2004.

MCCORMICK, M. K.; WHIGHAM, D. F.; SLOAN, D.; O'MALLEY, K.; HODKINSON, B. Orchid–fungus fidelity: a marriage meant to last? **Ecology**, v. 87, p. 903–911, 2006.

MCKENDRICK, S. L.; LEAKE, J. R.; TAYLOR, D. L.; READ, D. J. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. **New Phytol**, v. 154, p. 233–247, 2002.

MYERS, N.; MITTERMAYER, R. A.; MITTERMAYER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.

NILSSON, R. H.; KRISTIANSOON, E.; RYBERG, M.; HALLENBERG, N.; LARSSON, K- H. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 4, p. 193 – 201, 2008.

NOGUEIRA, R. E.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; LANNA, M. C.; MENDONÇA, M. Fungos micorrízicos associados e orquídeas em campos rupestres na Região do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 3, p. 417-424, 2005.

OTERO, J.T.; ACKERMAN, J. D.; BAYMAN, P. Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. **Am. J. Bot**, n. 89, p. 1852–1858, 2002.

OTERO, J.T.; ACKERMAN, J.D.; BAYMAN, P. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. **Molecular Ecology**, n. 13, p. 2393–2404, 2004.

OTERO, J. T.; FLANANGAN, N. S.; HERREN, E. A.; ACKERMAN, J. D.; BAYMAN, P. Widespread mycorrhizal specificity correlates do mycorrhizal function in the neotropical epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 94, n. 12, 2007.

PEREIRA, M. C. **Diversidade e especificidade de fungos micorrízicos de orquídeas associados a *Epidendrum secundum* em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-MG**. 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PEREIRA, M. C.; KASUYA, M. C. M.; PEREIRA, O. L.; COSTA, M. D.; ROCHA, R. B. Diversidade de fungos micorrízicos *Epulorhiza* sp. isolados de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1187-1197 2009.

PEREIRA, M. C.; TORRES, D. P.; GUIMARAES, F. A. R.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, p. 534-541, 2011.

PEREIRA, M. C.; ROCHA, D. I.; VELOSO, T. G. R.; PEREIRA, O. L.; FRANCINO, D. M. T.; MEIRA, R. M. S. A.; KASUYA, M. C. M. Characterization of seed germination and protocorm development of *Cyrtopodium glutiniferum* (Orchidaceae) promoted by mycorrhizal fungi *Epulorhiza* spp. **Acta Botanica Brasilica**, v. 29, n. 567–574, 2015.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; ROLLEMBERG, C. L.; BORGES, A. C. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Coppensia doniana flexuosum* por fungos micorrízicos rizoctonioides **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa-MG, v. 29, p. 199-206, 2005a.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; ROLLEMBER, C. L.; CHAER, G. M.; Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonioides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v.29 p.191-197, 2005b.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M. Micorrizas em orquídeas In: **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**, Lavras: UFLA, 2010, p. 583-613.

PINHO, D. B.; FIRMINO, A. L.; PEREIRA, O.L.; FERREIRA JUNIOR, W. G. An efficient protocol for DNA extraction from *Meliolales* and the description of *Meliola centellae* sp. nov. **Mycotaxon**, v. 122, p. 333-345, 2012.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, p. 817–818, 1998.

PHILLIPS, R. D.; BARRETT, M. D.; DIXON, K. W.; HOPPER, S. D. Do mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids? **Journal of Ecology**, v. 99, p. 858–869, 2011.

PROMPUTTHA, I.; LUMYONG, S.; DHANASEKARAN, V.; MCKENZIE, E.; HYDE, K.; JEEWAN, R. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 579–590, 2007.

RAFTER, M.; YOKOYA, K.; SCHOFIELD, E.J.; ZETTLER, L.W.; SARASAN, V. Non-specific symbiotic germination of *Cynorkis purpurea* (Thouars) Kraezl., a habitat-specific terrestrial orchid from the Central Highlands of Madagascar. **Mycorrhiza**, v. 26, p. 541-552, 2016.

RAMBAUT, A. FigTree version 1.2.2. 2009. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>. Acesso em 20 de maio de 2018.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**, v.43, p. 304–311, 1996.

RASMUSSEN, H. N. Terrestrial Orchid: From Seed to Mycotrophic Plant. **Cambridge University Press**, Cambridge, 1995.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGE, T. B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012.

SAZAK, A.; OZDENER, Y.; Symbiotic and asymbiotic germination of endangered *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. and *Dactylorhiza osmanica* (Kl.) Soo var. *Osmanica* (Endemic). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 9, p. 2222–2228, 2006.

SATHIYADASH, K.; MUTHUKUMAR, T.; MURUGAN, S.B.; RAMALINGAM, SATHISHKUMAR, R.; PANDEY, R. R. *In vitro* symbiotic seed germination of South Indian endemic orchid *Coelogyne nervosa*. **Mycoscience**, v. 55, p. 183–189, 2014.

SHARMA, J.; ZETTLER, L. W.; SAMBEEK, J. W. V.; ELLERSIECK, M. R.; STARBUCK, C. J. Symbiotic seed germination and mycorrhizae of federally threatened *Platanthera praeclara* (Orchidaceae). **The American Midland Naturalist**, v. 149, p. 104–120, 2003.

SELOSSE, M. A.; WEI, J. M.; JANY, L.; TILLER, A. Communities and populations of sebacinoïd Basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidusavis* (L.) L. C. M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. **Molecular Ecology**, Malden, v.11, p.1831–1844, 2002.

SEIDENFADEN, G.; A collection of orchids from Malaya, **Nord. J. Bot.**, v. 6, n. 2, p. 157–181, 1986.

SUÁREZ, J. P.; WEIß, M.; ABELE, A.; GARNICA, S.; OBERWINKLER, F.; KOTTKE, I. Diverse tulasnelloïd fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. **Mycol Res.**, v. 110, p. 1257– 1270, 2006.

SUÁREZ, J. P.; WEIß, M.; ABELE, A.; OBERWINKLER, F.; KOTTKE, I. Members of Sebacinales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. **MycolProgr**, v. 7, p. 75–85, 2008.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **PNAS**, v. 109, p. 6241-6246, 2012.

SHEFFERSON, R. P.; TAYLOR, D. L.; WEIß, M.; GARNICA, S.; MCCORMICK, M. K.; ADAMS, S.; GRAY, H. M.; MCFARLAND, J. W.; KULL, T.; TALI, K.; YUKAWA, T.; KAWAHARA, T.; MIYOSHI, K.; LEE, Y. I. The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. **Evolution**, v. 61, p. 1380–1390, 2007.

SHEFFERSON, R. P.; KULL, T.; TALI, K. Mycorrhizal interactions of orchids colonizing Estonian mine tailings hills. **Am J Bot.**, v. 95, p.156–164, 2008.

SMITH, S. E.; READ, D. J. Mycorrhizal Symbiosis. **Academic Press**, 2nd ed., London, UK, 1997.

SOLÍS, K.; BARRIUSO, J. J.; GARCÉS-CLAVER, A.; GONZÁLEZ, V. *Tulasnella tubericola* (Tulasnellaceae, Cantharellales, Basidiomycota): a new Rhizoctonia-like fungus associated with mycorrhizal evergreen oak plants artificially inoculated with black truffle (*Tuber melanosporum*) in Spain. **Phytotaxa**, n. 317, p. 175–187, 2017.

STEINFORT, U.; VERDUGO, G.; BESOAIN, X.; CISTERNAS, M.A. Mycorrhizal association and symbiotic germination of the terrestrial orchid *Bipinnula fimbriata* (Poepp.) Johnst (Orchidaceae). **Flora**, n. 205, p. 811–817, 2010.

STEWART, S. L.; KANE, M. E. Symbiotic seed germination and evidence for *in vitro* mycobiont specificity in *Spiranthes brevilabris* (Orchidaceae) and its implications for species-level conservation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, n. 43, p. 178–186, 2007.

STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: BACON, C.W.; WHITE, J. F. (eds) **Microbial endophytes**. Marcel Dekker, New York, p. 3–29, 2000.

TAYLOR, D. L.; BRUNS, T. D. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza macula* and *C. mertensiana*. **Molec. Ecol.**, v. 8, p. 1719-1732, 1999.

TAYLOR, D. L.; BRUNS, T. D.; LEAKE, J. R.; READ, D. J. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; SANDERS, R. I. eds. **The ecology of mycorrhizas**. Berlin, Germany: Springer-Verlag, p. 375–414, 2002.

VALADARES, R. B. S. *Diversidade micorrízica em Coppensia doniana (Orchidaceae) e filogenia de fungos micorrízicos associados à subtribo Oncidiinae*. 2009. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VALENTE, E. L. **Relações solo-vegetação no parque nacional da Serra do Cipó, Espinhaço Meridional, Minas Gerais**. 2009. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

VAZQUEZ, D. P.; AIZEN, M. A. Null model analyses of specialization in plant–pollinator interactions. **Ecology**, London, v.84, p.2493– 2501, 2003.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of Bacteriology**, n. 513, v. 172, p. 4239–4246, 1990.

XING, Y. M.; CHEN, J.; CUI, J. L.; CHEN, X. M.; GUO, S. X. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsoiflorum* from Vietnam. **Curr Microbiol**, v. 62, p. 1218–1224, 2011.

WEISS, M.; SELOSSE, M-A.; REXER, K-H.; URBAN, A.; OBERWINKLER, F. Sebaciales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. **Mycol Res.**, v. 108, p. 1003–1010, p. 2004.

WEISS, M.; WALLER, F.; ZUCCARO, A.; SELOSSE, M-A. Sebaciales—one thousand and one interactions with land plants. **New Phytol**, v. 211, p. 20–40, 2016.

WELLS, K. Jelly fungi, then and now! **Mycologia**, n. 86, p. 18–48, 1994.

WILLIS, K. J. (ed) State of the world’s plants 2017. Report. **Royal Botanic Gardens**, Kew. 2017.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of 517 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: A guide to methods and applications** (INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. eds). San Diego, California, USA, Academic Press, 1990, p.315-322.

WCSP WORLD CHECKLIST OF SELECTED PLANT FAMILIES. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew, 2017. Published on the Internet; <http://apps.kew.org/wcsp/> Retrieved 10/12/2018.

ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, O. L. Isolamento de Fungos. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; OLINTO, L. P. O essencial da Fitopatologia: agentes causais. Viçosa, Editora Universidade Federal de Viçosa, 2012. v. 2, p. 262-263.

ZETTLER, L.W.; STEWART, S. L.; BOWLES, M. L.; JACOBS, K. A. Mycorrhizal fungi and cold assisted symbiotic germination of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley. The American Midland Naturalist, v. 145, p. 168–175, 2001.

ZETTLER, L. W.; HOFER, C. J. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. Environ. Exp. Bot., v. 39, p. 189-195, 1998.

ZOTZ, G. The systematic distribution of vascular epiphytes – a critical update. **Bot J Linn Soc.**, v. 171, p. 453-481, 2013.