

DANIELLE OLIVEIRA LINHARES

Caracterização morfológica de micorrizas de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* nativas do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (MG)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

DANIELLE OLIVEIRA LINHARES

Caracterização morfológica de micorrizas de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* nativas do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (MG)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 14 de março de 2006.

Prof. Arnaldo Chaer Borges

Prof Wagner Campos Otoni

Prof. Maurício Dutra Costa
(Conselheiro)

Prof^a. Renata Maria Strozi Alves Meira
(Conselheira)

Prof^a. Maria Catarina Megumi Kasuya
(Orientadora)

À Maria Luíza,
Aos meus pais, Helenice e Flávio,
Ao meu irmão Francis,
Ao Juliano.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realizar o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento dos projetos CAG 708/02 e IDT 005/04.

Ao Instituto Estadual de Floresta (IEF), pela concessão da licença para a realização da pesquisa no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro - MG.

À Professora Maria Catarina Megumi Kasuya, pela orientação. Agradeço a confiança em mim depositada, pelo incentivo, pelas doses de ânimo, e principalmente, ao carinho e amizade que ficam.

Ao Professor Maurício Dutra Costa, pelo incentivo, apoio e aconselhamentos e durante a realização desse trabalho.

À Professora Renata Maria Strozi Alves Meira pelo convite de trabalhar na Serra do Brigadeiro, o bom humor de sempre, apoio e pelo aconselhamento durante a realização deste trabalho.

Aos professores Wagner Otoni Campos e Arnaldo Chaer Borges pelas sugestões valiosas e leitura crítica do manuscrito.

A coordenação da pós-graduação em Microbiologia Agrícola, na pessoa da Professora Célia Alencar de Moraes, e aos demais professores pela contribuição dada durante minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, pela amizade e pelo tempo a mim dispensado. Por tornarem o trabalho menos árduo e mais alegre.

Ao Olinto Liparini Pereira pela amizade, pelo apoio e incentivo. Pelo aconselhamento dado durante a realização deste trabalho. A você dedico minha admiração, pois o amor que você demonstra ter pelo que faz, além de encorajador, é um exemplo a ser seguido.

Ao Gilmar Edilberto Valente, pela alegria contagiante, pelas horas de caminhada, pelo tempo a mim dedicado durante a realização do trabalho.

À Ivone Vieira da Silva, pelo auxílio na identificação das plantas no campo.

Ao John Alexander Zambrano, por propor a técnica e auxiliar as análises de colonização micorrízica.

Ao Valcir e sua família, por nos receber sempre de braços abertos em sua residência. Pelo cafezinho e bate papo à beira do fogão de lenha depois de um dia de trabalho.

Aos professores, estudantes e funcionários do Laboratório de Anatomia Vegetal, onde fui tão bem recebida. Em especial, à Vânia, pelos ensinamentos, pelo tempo a mim dispensado, por todo o material e equipamento concedidos.

Aos funcionários do Setor de Transporte, pela atenção e serviços prestados.

Aos amigos dos laboratórios de Genética, Café, Fisiologia, Petróleo, Industrial, Alimentos e Anaeróbios. A todos agradeço as horas de descontração, o incentivo e a amizade.

Aos amigos que me acompanham desde a graduação.

Aos companheiros de disciplinas.

Aos amigos que levarei por toda a vida.

Aos amigos que fizeram e fazem parte da família micorriza. A vocês meus amores, faltam palavras para agradecer o carinho a mim dedicado e aos momentos que passamos juntos.

Ao querido Marlon, em especial, agradeço a amizade e o companheirismo de todos os dias.

Às minhas irmãs queridas Taís e Yaska.

Aos meus familiares por compreenderem minha ausência e pelo apoio.

Ao Juliano, um companheiro para toda vida. Agradeço a amizade e a dedicação. O apoio frente às inúmeras dificuldades. Ao tempo que este trabalho nos furtou. Agradeço pela dádiva que nos foi concebida, o melhor presente que poderia ganhar, nossa “gorduchinha”, Maria Luiza.

Aos meus pais e meu irmão Francis, pelo carinho, por compartilharem de todos os momentos de minha vida, tendo sempre um gesto de encorajamento. Por permitirem sonhar. Por tudo.

Em especial à minha mãe, agradeço o apoio incondicional, desprendimento e sacrifícios. Por assumir a Maria Luiza nos últimos meses de trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Danielle Oliveira Linhares, filha de Flávio Geraldo Ramos Linhares e Helenice Fátima de Oliveira Linhares, nasceu em Volta Redonda, Rio de Janeiro, no dia 24 de dezembro de 1980. Em março de 1998, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se, em março de 2003, em Agronomia. Em março de 2004, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na UFV.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
MATERIAL E MÉTODOS.....	7
1. Área de amostragem.....	7
2. Espécies de orquídeas e coleta de amostras.....	9
3. Isolamento dos fungos micorrízicos.....	9
4. Caracterização morfológica dos fungos micorrízicos.....	10
5. Caracterização anatômica da associação micorrízica.....	10
6. Taxa de colonização.....	11
7. Análise dos dados.....	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
1. Caracterização morfológica dos fungos micorrízicos.....	13
2. Caracterização morfológica e anatômica do sistema radicular.....	17
3. Colonização, formação e degradação dos <i>pelotons</i>	19
4. Colonização micorrízica.....	25
CONCLUSÕES.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

RESUMO

LINHARES, Danielle Oliveira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2006.
Caracterização morfológica de micorrizas de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* nativas do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (MG).
Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Conselheiros: Maurício Dutra Costa e Renata Maria Strozi Alves Meira.

Epidendrum secundum e *Zygopetalum mackaii*, nativas do Parque Estadual Serra do Brigadeiro (MG), foram estudadas com objetivo de caracterizar a associação micorrízica e os fungos micorrízicos associado a estas plantas. Durante o período de agosto/2004 a julho/2005, foram realizadas coletas do sistema radicular dessas espécies crescendo em quatro áreas com características distintas. Obtiveram-se o total de 28 isolados fúngicos, todos pertencentes ao gênero *Epulorhiza*, os quais foram divididos em três grupos, de acordo com as características culturais e morfológicas. A micorriza encontrada foi o tolipofágico, sendo observado *pelotons* intactos e degradados em toda a extensão do sistema radicular das espécies estudadas. A infecção da raiz ocorre via pêlo radicular ou células epidérmicas, enquanto a colonização do córtex é, principalmente, via célula de passagem da exoderme. A colonização no córtex ocorre via célula-célula, sendo todo o espaço celular ocupado pela estrutura fúngica, os *pelotons*. O estágio de degradação inicia-se pela deformação do *peloton*, seguida da redução uniforme de seu volume. A intensidade de colonização foi maior nos períodos de seca. As espécies crescidas diretamente sobre rochas apresentaram maior frequência de colonização e maior atividade micotrófica. Este é o primeiro relato sobre o isolamento e caracterização de fungos micorrízicos em *Z. mackaii*. Os fungos isolados neste trabalho apresentam um grande potencial para serem utilizados na propagação comercial destas orquídeas.

ABSTRACT

LINHARES, Danielle Oliveira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March of 2006.
Morphological characterization of mycorrhizae of *Epidendrum secundum* and *Zygopetalum mackaii* natives of the Serra do Brigadeiro State Park (MG).
Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Committee members: Maurício Dutra Costa and Renata Maria Strozi Alves Meira.

Epidendrum secundum and *Zygopetalum mackaii*, native from State Park of Serra do Brigadeiro, Minas Gerais State, Brazil, were studied to characterize the structure of mycorrhizae and associated mycorrhizal fungi. From August/2004 to July/2005, roots were collected from four different areas. A total of 28 isolates were obtained, all belonging to genus *Epulorhiza*, which were separated in three groups according their morphological and cultural characteristics. In both orchid species, mycorrhizae were tolipophagic, and colonizing all extension of the root system, presenting intact and degraded pelotons. Root colonization occurs mainly through root hairs and sometimes via epidermic cells, while cortex colonization occurs, mainly, via passage cells of the exodermis. Cortex colonization occurs by cell-to cell, and *pelotons* occupy all cellular space. *Peloton* degradation starts by hypha deformation, followed by a uniform reduction of peloton volume. Colonization intensity was higher in the dry season. The species growing on rocks showed higher colonization frequency and higher mycotrophic activity. This is the first report on the mycorrhizal association of *Z. mackaii*. Isolated fungi in this study show high potential to be used in commercial propagation of this orchid species.

INTRODUÇÃO

A família das Orchidaceae é uma das maiores dentre as Angiospermas e estimam-se 30.000 espécies descritas. Existem, ainda, híbridos naturais e anualmente são registradas centenas deles produzidos pelo homem. As orquídeas ocorrem em todo o globo terrestre, do ártico aos trópicos. Entretanto, a diversidade é maior nas florestas tropicais, onde o Brasil se destaca pelo elevado número de espécies. São plantas altamente especializadas, podendo ser terrestres, rupícolas ou epífitas e apresentam uma série de adaptações anatômicas, morfológicas e fisiológicas.

As orquídeas desenvolveram um distinto relacionamento com fungos micorrízicos. Durante o estágio inicial de desenvolvimento, entre o embrião e a plântula, formam uma estrutura organizada, não fotossintética, com pólo apical e basal, destituída de tecido vascular e micoheterotrófica, denominada de protocórmio. Tal estrutura é dependente do simbiote fúngico, o qual possibilita a aquisição de carboidratos, o crescimento e a diferenciação dos tecidos.

Orquídeas aclorofiladas, incluindo as espécies de orquídea, são micoheterotróficas durante todo o ciclo de vida, mas plantas adultas clorofiladas também apresentam raízes colonizadas. O papel dos fungos micorrízicos associados às plantas clorofiladas adultas não está esclarecido e pouco se conhece sobre como a diversidade fúngica afeta a distribuição, o tamanho da população e a diversidade genética das orquídeas.

O Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB) é uma das 76 áreas prioritárias para conservação da biodiversidade no Estado de Minas Gerais, avaliada pela riqueza das espécies em geral. O PESB possui áreas extensas bem preservadas, destacando-se pela importância biológica e presença de vegetação remanescente com

alto grau de conectividade (Costa *et al.*, 1998). Trabalho recente mostrou ampla diversidade de espécies de Orchidaceae nas áreas do PESB (Caiafa, 2002), contudo, não foram encontrados relatos de estudos sobre micorriza de orquídeas nessa área. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a da associação micorrízica de duas espécies de orquídeas nativas da Serra do Brigadeiro, município de Araponga do Estado de Minas Gerais, bem como caracterizar os fungos associados a essas plantas.

REVISÃO DE LITERATURA

Os membros da família Orchidaceae apresentam um distinto relacionamento com fungos micorrízicos em razão da essencialidade do fungo durante a germinação da semente e o desenvolvimento do protocórmio (Leake, 1994). Sementes de orquídeas são geralmente muito pequenas e caracterizam-se pela ausência de endosperma e cotilédones (Arditti, 1992). O amido é a principal fonte de carbono em sementes de orquídeas imaturas. No entanto, com a maturação, o amido é substituído por proteínas, lipídeos e fontes de reservas complexas como a celulose e a hemicelulose (Arditti & Ghani, 2000). O acréscimo de composto protéico implica em dormência da semente, pois a quantidade de reserva energética é suficiente para a manutenção da respiração basal (Arditti & Ghani, 2000). Assim, por não possuir fonte para derivar energia para mobilização dos lipídeos, a semente não germina sem que haja uma fonte externa de açúcar, como a glicose. O suprimento contínuo de açúcar solúvel, vitaminas e outros fatores necessários ao crescimento, não é disponível na natureza, assim, a semente obtém essa fonte de açúcar graças à associação com fungos micorrízicos que viabiliza energeticamente a germinação da semente e o estabelecimento da planta (Rasmussen, 1995).

Embora muitas espécies de orquídeas sejam clorofiladas, tornando-se autotróficas com o desenvolvimento da plântula, o estágio de protocórmio é tipicamente micoheterotrófico (Peterson *et al.*, 1998). O protocórmio, característico de Orchidaceae, é uma estrutura não fotossintética, organizada em região apical e basal, com ausência de tecido vascular e formada a partir do embrião. À medida que o protocórmio se desenvolve, o meristema apical e as raízes adventícias são formados e originam a plântula (Peterson *et al.*, 1998). Orquídeas aclorofiladas dependem do micobionte para a aquisição de carbono, sendo micoheterotróficas durante todo o seu ciclo de vida

(Peterson *et al.*, 1998). Orquídeas clorofiladas adultas também são colonizadas. Contudo, o papel dos fungos micorrízicos associados a essas plantas não está totalmente elucidado. Assim, não se conhece como a diversidade fúngica afeta a distribuição, o tamanho da população e a diversidade genética das orquídeas.

O micoheterotrofismo não é exclusivo da família Orchidaceae, sendo também observado em espécies aclorofiladas de outras famílias de monocotiledôneas como Burmanniaceae, Corsiaceae, Lacandoniaceae, Petrosaviaceae e Triuridaceae e em famílias de dicotiledôneas como Ericaceae (Monotropoideae), Polygalaceae e Gentianaceae (Leake, 1994; McKendrick *et al.*, 2000b; Taylor *et al.*, 2002).

Os fungos que formam as micorrizas em orquídeas são pertencentes aos dos basidiomicetos e ascomicetos (Currah *et al.*, 1997; Rasmussen, 2002). Contudo, os fungos que são usualmente observados são espécies de basidiomicetos que não apresentam conidiogênese na fase assexuada (*Mycelia Sterilia*) e, no estágio anamórfico, são classificados como *Rhizoctonia sensu lato* ou gêneros afins (Andersen, 1996). Embora os estádios perfeitos para muitas espécies de *Rhizoctonia s.l.* sejam conhecidos, a indução do estágio teleomórfico em laboratório nem sempre é bem sucedida (Pereira, 2001). Muitas espécies de *Rhizoctonia* são patogênicas em diversas espécies vegetais, algumas são saprófitas decompondo matéria orgânica, enquanto outras são observadas associadas a orquídeas (Rasmussen, 2002).

Diferentes gêneros anamorfos são reconhecidos: *Moniliopsis*, *Ceratorhiza*, *Epulorhiza*, *Ascorhizoctonia* e *Rhizoctonia* (Moore, 1987), entretanto não foram encontrados registros de *Ascorhizoctonia* associado a orquídeas. Esses gêneros foram agrupados com base na conexão anamorfo-teleomorfo e na ultraestrutura do septo (Moore, 1987). Isolados binucleados de *Rhizoctonia* com parenteossoma perfurado e com teleomorfo em *Ceratobasidium* foram classificados como *Ceratorhiza*. Isolados binucleados de *Rhizoctonia* com parenteossoma imperfurado e teleomorfo em *Tulasnella* foram classificados como *Epulorhiza*. Aqueles com teleomorfo em *Sebacina* foram classificados como *Opadorhiza*. Isolados multinucleados com parenteossoma perfurado e teleomorfo em *Thanatephorus* foram classificados como *Moniliopsis*, anteriormente, *Rhizoctonia* (Moore, 1987), mas o nome *Rhizoctonia* foi mantido por conservação (nomina conservanda) em razão da importância econômica desse táxon e do número de trabalhos já publicados (Stalpers *et al.*, 1998).

A taxonomia de fungos micorrízicos de orquídeas é dificultada não só pela característica de não produzir conídios na fase assexuada, mas também pela rara observação da fase sexuada no campo (Otero *et al.*, 2004) e difícil indução em

laboratório (Pereira, 2001). Entretanto, Currah & Zelmer (1992) propuseram uma chave de classificação baseada em características morfológicas culturais (hifas e células monilióides) e a condição nuclear, tornando possível a separação dos gêneros mais freqüentes e facilitando estudos de fungos formadores de micorriza de orquídeas.

A principal característica da micorriza de orquídea é a formação de novelo de hifas no interior das células colonizadas, chamado *peloton*. (Warcup, 1981; Peterson *et al.*, 2004). O contato entre o embrião e o fungo simbiote ocorre via pêlo epidérmico, células suspensoras ou pela infecção direta das células basais do embrião (Richardson *et al.*, 1992; Zelmer *et al.*, 1996). Uma hifa entra na célula e, a partir deste ponto, ocorre a invaginação da membrana plasmática da célula vegetal acompanhada pelo crescimento fúngico, selando a interação. Os *pelotons* estão separados do citoplasma das células hospedeiras por uma membrana derivada do hospedeiro (membrana perifúngica) e por uma matriz interfacial (Peterson *et al.*, 1996). A função da interface não é clara e não foi comprovada a ocorrência de troca entre os simbiotes (Peterson & Massicotte, 2004).

Vários estádios de formação e degradação dos *pelotons* são observados no tecido vegetal. A parede das hifas formadoras de *pelotons* é fina e o citoplasma apresenta muitas mitocôndrias, ribossomos e outras organelas (Peterson *et al.*, 1998). Durante a lise do *peloton*, a célula vegetal permanece ativa, e pode ser colonizada novamente pela porção da hifa que não sofreu o processo lítico, ou pela hifa oriunda da célula adjacente (Uetake *et al.*, 1997). Não está claro se a degradação dos *pelotons* é resultado de autólise ou da ação de enzimas hidrolíticas dentro das células dos protocórmios. Entretanto, já se observou uma maior quantidade de enzimas digestivas nos tecidos infectados em comparação aos não infectados (Senthilkumar *et al.*, 2000).

Dois tipos distintos de micorrizas de orquídeas são reconhecidos, tolipofágico, verificada na grande maioria das espécies, e ptiofágico, notada em um restrito número de espécies tropicais (Rasmussen, 1995). O autor caracteriza tolipofágico pela formação dos *pelotons*, lise e reinfecção. A hifa fúngica é separada da célula do hospedeiro por uma interface constituída de parede celular fúngica, matriz interfacial e membrana plasmática do hospedeiro. O tipo ptiofágico não apresenta estrutura definida, sendo caracterizada por um contínuo processo de deformação e lise da hifa intracelular, que ao penetrar no hospedeiro é digerida, liberando assim seu conteúdo (Jonsson & Nylund, 1979). As micorrizas do tipo tolipofágico tem sido estudado com mais detalhes em nível histológico e citoquímico.

Dois modelos de colonização em plantas adultas foram propostos (Zelmer *et al.*, 1996). No primeiro, os *pelotons* formados na camada externa da região cortical não são

degradados, pois servem como inóculo para recolonização das células da região mais externa do córtex, onde os *pelotons* sofrem a lise, como observado em *Corallorhiza* sp., e pode estar relacionado com a persistência da simbiose. O outro modelo é observado em espécies de *Platanthera* e *Spiranthes* e baseia-se em um sincronismo entre a formação e a degradação dos *pelotons* ao longo do tecido cortical. Esse representa eventos individuais de colonização, pois regiões adjacentes podem ser colonizadas por diferentes fungos.

O conhecimento da estrutura e da biologia celular das interações micotróficas tem progredido significativamente e o entendimento da simbiose micorrízica em orquídeas é de grande importância por avaliar o real papel do micobionte como determinante da distribuição e diversidade das espécies de orquídeas. A maioria dos estudos visa ao estabelecimento de germinação simbiótica (Zettler & Mcinnis, 1993; Zelmer & Currah, 1997; McKendrick *et al.*, 2000b; Zettler *et al.*, 2001; McKendrick *et al.*, 2002; Brundett *et al.*, 2003; Pereira, 2004; Pereira *et al.*, 2005b) definições de padrões de especificidade entre simbiontes (Taylor *et al.*, 2002; Otero *et al.*, 2002, 2004), a sistemática e a taxonomia dos fungos (Ma *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2005a), o uso de técnicas moleculares (Kristiansen *et al.*, 2001a, 2001b) e a verificação de interações múltiplas exercidas pelos fungos (Zelmer & Currah, 1997; Mckendrick *et al.*, 2000a).

Em regiões tropicais os trabalhos são menos numerosos e estão relacionados com a observação de fungos associados a orquídeas (Richardson *et al.*, 1993; Richardson & Currah, 1995; Bayman *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2005a, 2005c), o estudo dessa associação em espécies raras de orquídeas (Tremblay *et al.*, 1998; Batty *et al.*, 2001), a definição de padrões de especificidade (Otero *et al.*, 2002, 2004) e a sistemática dos simbiontes (Pereira *et al.*, 2003; Nogueira, 2004).

Pouca atenção tem sido dada à dinâmica e local de infecção de plantas adultas. Desta forma, não são conhecidas as mudanças progressivas da interação no campo e o modo como o ambiente e a interação planta-fungo influenciam a morfologia dessa associação.

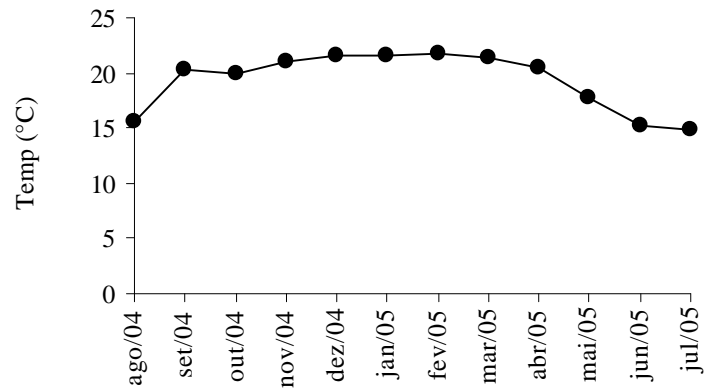
MATERIAL E MÉTODOS

1. Área de amostragem

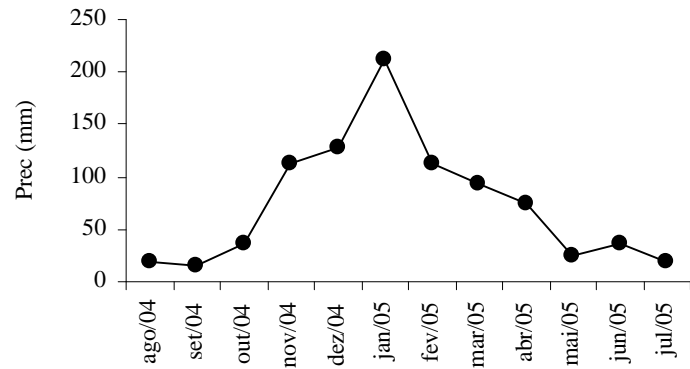
O material botânico foi coletado na Serra das Cabeças, sub-serra “Totem Deitado”, no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), Minas Gerais. O parque criado por meio do Decreto nº 38.319 de 27/07/1996 está situado no Maciço da Mantiqueira, entre os meridianos 42°20’ e 42°40’S e os paralelos 20°20’ e 21°00’W, e está totalmente inserido na Zona da Mata mineira (Engevix, 1995). Ocupa uma área de 13.210 ha, abrangendo oito municípios e se constitui em um conjunto de serras. Seu relevo é acidentado, apresentando escarpas e maciços com grande área de rocha aflorada e picos sempre acima da cota de 1500 m. O relevo e a altitude, entre 1000 e 1995 m, exercem importante influência nas características climáticas do parque, amenizando as temperaturas e criando um clima tipicamente serrano nas regiões mais elevadas. O regime pluvial é caracterizado por um período chuvoso, entre os meses de novembro a março, e por um período seco, de maio a setembro (Engevix, 1995). As médias da precipitação, temperatura e umidade relativa do ar, durante os períodos de coleta, estão apresentadas na Figura 1.

A Serra das Cabeças localiza-se a 5 km da Sede do Parque, no município de Araponga. Possui três sub-serras que são nomeadas: “Cabeça de Elefante”, “Cabeça de Mamute” e “Totem Deitado”, sendo a última o local do presente estudo. A sub-serra denominada “Totem Deitado” encontra-se a 1.700 m de altitude e possui uma área de aproximadamente seis hectares, composta por uma tipologia vegetal Campo de Altitude (Caiafa, 2002).

a



b



c

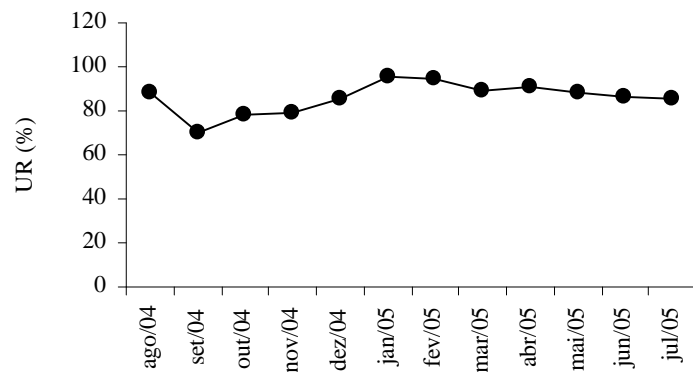


Figura 1. Médias de temperatura (a), precipitação (b) e umidade relativa (c) entre agosto 2004 e julho 2005 da região de Araponga - Minas Gerais, segundo SIMGE – Sistema de Meteorologia e Recursos Hídricos de Minas Gerais.

2. Espécies de orquídeas e coleta de amostras

As espécies estudadas foram *Epidendrum secundum* Jacq. e *Zygopetalum mackaii* Hook. As espécies foram escolhidas em razão do elevado número de indivíduos na população local e pelo fato das plantas se encontrarem em diferentes habitats (Tabela 1). As populações foram selecionadas aleatoriamente e a área foi demarcada com auxílio de GPS. Selecionaram-se três indivíduos para cada área estudada, que foi considerada como repetição. Bimestralmente, no período de agosto de 2004 a julho 2005, amostras de raízes saudáveis foram coletadas, sob licença concedida pelo Instituto Estadual de Floresta (IEF). Essas amostras foram transportadas e examinadas no Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO/UFV e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal/UFV.

Tabela 1. Descrição das características das áreas de coleta das espécies de Orchidaceae estudadas na sub-serra “Totem Deitado”, Serra das Cabeças, Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – MG.

Área	Caracterização	Tribo	Espécies
1	Veloziceae sobre rocha		
2	Diretamente sobre a rocha	Epidendreae	<i>Epidendrum secundum</i>
3	Camada de substrato orgânico < 20 mm		
4	Tapete de monocotiledôneas sob rocha	Maxillarieae	<i>Zygopetalum mackaii</i>

3. Isolamento de fungos micorrízicos

Amostras de raízes de orquídeas foram lavadas em água corrente, cortados em fragmentos de 2 a 3 cm e desinfestadas superficialmente por imersão em etanol a 70%, durante 1 minuto e, posteriormente, em solução de hipoclorito de sódio (comercial) a 10%, por 5 minutos, seguido de três lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. As raízes desinfestadas foram levadas ao microscópio estereoscópico (Olympus SZ 40) para visualização dos *pelotons* com auxílio de estiletos e bisturis. Os *pelotons* foram colocados em placa de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), adicionado de cloranfenicol (50 mg/L). As placas foram incubadas a 28 °C no escuro e observadas

diariamente em microscópio de luz invertido (Olympus IX 70) para a verificação do crescimento micelial do fungo a partir dos *pelotons*. Culturas estoque foram mantidas em meio BDA no escuro a 28 °C.

4. Caracterização morfológica de fungos micorrízicos

As características de crescimento da colônia em meio BDA (Merck) a 28 °C foram descritas quanto à coloração, aspecto da colônia (liso, aveludado ou floculoso) e presença de micélio aéreo (abundante ou escasso) presença de borda, sendo tomadas as medições do diâmetro das hifas vegetativas. O exame da morfologia e da medição do tamanho das células monilióides foi feito em micélio dos isolados cultivados em meio Milho:Agar:água (CMA), conforme descrito por Zelmer & Currah (1995), sendo a condição nuclear, binucleado ou multinucleado, determinada por meio da coloração dos núcleos (Meinhardt *et al.*, 2001).

A atividade de polifenol-oxidases foi constatada pela presença ou ausência de formação de halo em meio extrato de malte, pela adição de ácido tânico após o crescimento (Davidson *et al.*, 1938). Como controle positivo foi utilizado um isolado de *Ceratorhiza* pertencente à coleção de fungos micorrízicos de orquídeas do Laboratório de Associações Micorrízicas.

Para a identificação dos isolados adotou-se a chave e notas para fungos micorrízicos em orquídeas proposta por Currah & Zelmer (1992), a qual se baseia nas características morfológicas dos isolados.

5. Caracterização anatômica da associação micorrízica

Amostras do sistema radicular foram fixadas em FAA₅₀ (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 50% 5:5:90 v/v), mantidas sob vácuo por 48 horas e estocadas em etanol 70% a temperatura ambiente (Johansen, 1940). Cortes longitudinais seriados, das amostras fragmentos de raízes de 1 cm foram obtidos com auxílio de um micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bheling). Os cortes foram descorados com hipoclorito de sódio (comercial) 10 %, lavados em água destilada, submetidos à dupla coloração com “safrablau” (solução aquosa de safranina 1 % - solução aquosa de azul de astra 1 % - duas gotas de ácido acético glacial) e as lâminas montadas com gelatina glicerínada (Kraus & Arduin, 1997). As observações e documentações fotográficas foram realizadas com auxílio de fotomicroscópio (Olympus AX 70) com sistema U-

PHOTO acoplado a um microcomputador equipado com software de análise de imagem (IMAGE PRO-PLUS).

6. Taxa de Colonização

A taxa de colonização foi avaliada conforme metodologia descrita por Trouvelot *et al.* (1986) adaptada. Fragmentos de raízes fixados foram selecionados ao acaso e a partir deste foram obtidos 40 cortes transversais, com auxílio do micrótomo de mesa. Os cortes foram descorados e corados com “safrablau” (Kraus & Arduin, 1997) e foram examinados em microscópio óptico, para se quantificar a colonização micorrízica e a presença de *pelotons* intactos e degradados. Foram observados 40 cortes de cada amostra.

Para a avaliação dos dados utilizou-se o programa proposto por Trouvelot *et al.* (1986), no qual se realizou a quantificação de quatro características: frequência de colonização (F), intensidade global de colonização (M), *pelotons* intactos na porção colonizada (p) e *pelotons* intactos no sistema radicular (P). As características foram quantificadas utilizando as seguintes fórmulas:

Frequência de Colonização:

$$F\% = (\text{Número de fragmentos colonizados} / \text{Número total de fragmentos})$$

Intensidade Global de Colonização (% total de córtex colonizado):

$$M\% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / \text{Número total de fragmentos}$$

Em que:

n_1, n_2, n_3, n_4 e n_5 , correspondem a diferentes percentagem do fragmento de raiz colonizado, de acordo com Trouvelot *et al.* (1986).

***Pelotons* intactos na porção colonizada:**

$$p\% = (100m_{P3} + 50m_{P2} + 10m_{P1}) / 100,$$

Em que:

m_{P0}, m_{P1}, m_{P2} e m_{P3} , correspondem a diferentes percentagens de *pelotons* intactos, em relação ao total de *pelotons*, sendo considerados, respectivamente, 0; $m_{P1} < 50\%$, $50\% < m_{P2} < 99\%$; $m_{P3} = 100\%$

Riqueza de *pelotons* intactos do sistema radicular:

$$P\% = p * (M\% / 100)$$

7. Análises dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Scott – Knott, a 5 % de significância.

Com base nos dados morfológicos, foram feitas análises de agrupamento para os dados qualitativos (cor, aspecto da colônia, micélio aéreo, borda da colônia, condição nuclear) e atividade da enzima polifenol-oxidase. O índice de similaridade utilizado foi de coincidência simples, uma vez que para todas as características as variáveis foram transformadas em dados binários. A análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGMA (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Averages) com o uso do programa Statistica 4.2 para Windows®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Caracterização morfológica dos fungos isolados

Os fungos isolados diretamente dos *pelotons* apresentam características do grupo rizoctonióides, com constrição de hifas no ponto da ramificação, ramificação em ângulo reto, ausência de grampo de conexão e formação de células monilióides (Figura 2). Todos os isolados apresentam micélio binucleado (Figura 2 D), e são polifenol-oxidase negativos, o que os classificam como sendo *Epulorhiza* Moore. Nenhum fungo binucleado do gênero *Ceratorhiza* ou multinucleado do gênero *Moniliopsis* foi isolado. Os gêneros *Ceratorhiza* foram encontrados em regiões de Campos rupestres do Quadrilátero Ferrífero mineiro (Nogueira, 2004) e *Ceratorhiza* e *Rhizoctonia* em regiões de Mata Atlântica na Zona da Mata mineira (Pereira *et al.* 2005a; 2005c), porém, nas espécies estudadas na Serra das Cabeças, sub-serra “Totem Deitado” não foi constatada a presença desses gêneros.

A tipologia encontrada na sub-serra “Totem Deitado” caracteriza-se em Campo de Altitude (Caiafa, 2002). Essa formação é distinta às áreas dos trabalhos realizados por Nogueira (2004) e Pereira *et al.*, (2005a; 2005c), tanto quanto ao clima quanto à rocha de origem. Assim, por ser o primeiro trabalho sobre os fungos micorrízicos de orquídeas na Serra do Brigadeiro, não se pode concluir que outras espécies de fungos não ocorram, mas há relatos que os fatores citados, além das espécies vegetais podem influir nas espécies de fungos micorrízicos presentes (Rasmussen, 2002).

A análise de agrupamento (UPGMA) dos dados morfológicos permitiu a separação dos isolados obtidos em três grupos (Figura 3). Todos os isolados apresentam micélio aéreo escasso, diâmetro de hifa inferior a 4 μm (Tabela 2). O crescimento lento

da cultura foi observado somente nos isolados do grupo I, característico de *Epulorhiza* (Currah & Zelmer, 1992), enquanto nos do grupo II e III apresentavam crescimento foi duas vezes maior (Tabela 2). Os isolados foram obtidos tanto de *Epidendrum secundum* como de *Zygopetalum mackaii* nas diferentes áreas, uma indicação da predominância destes fungos associados a estas espécies na região do “Totem Deitado”.

Fungos do gênero *Epulorhiza* e *Ceratorhiza* são os mais comumente associados a orquídeas nativas dos trópicos, sendo observados associados a espécies terrestres, epífitas (Richardson *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 2005a; 2005c) e rupícolas (Nogueira, 2004). Entretanto, em orquídeas do gênero *Epidendrum*, de habitat tropical e temperado, geralmente tem sido observada a associação com *Epulorhiza* (Currah *et al.*, 1997; Zettler *et al.*, 1998; Yoder *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2003). *Epulorhiza* sp. foi também isolado de raízes de *Epidendrum secundum* no Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais (Nogueira, 2004). Esse fungo possivelmente apresenta uma especificidade hospedeira, pois sementes de *Epidendrum conopseum* só germinaram *in vitro* na presença de *Epulorhiza* isolado originalmente obtido do sistema radicular de plantas da mesma espécie (Zettler *et al.* 1998). A especificidade da associação micorrízica em orquídeas não está demonstrada, pois a metodologia utilizada pode culminar em diferentes resultados resultando em divergentes conclusões para uma determinada espécie (Andersen & Rasmussen, 1996; Taylor & Bruns, 1999).

Os resultados mostram a ocorrência de apenas um gênero de fungo micorrízico de orquídeas na região do “Totem Deitado”, mas, considerando o número amostras, e de espécies estudadas, há necessidade de outras análises a fim de se obter respostas conclusivas a respeito das populações de fungos micorrízicos na referida área.

Os isolados fúngicos obtidos no presente estudo apresentam alto potencial para utilização em horticultura, principalmente das espécies de orquídeas estudadas. Este trabalho consiste no primeiro relato de isolamento de fungos micorrízicos associados à espécie de orquídea *Z. mackaii*.

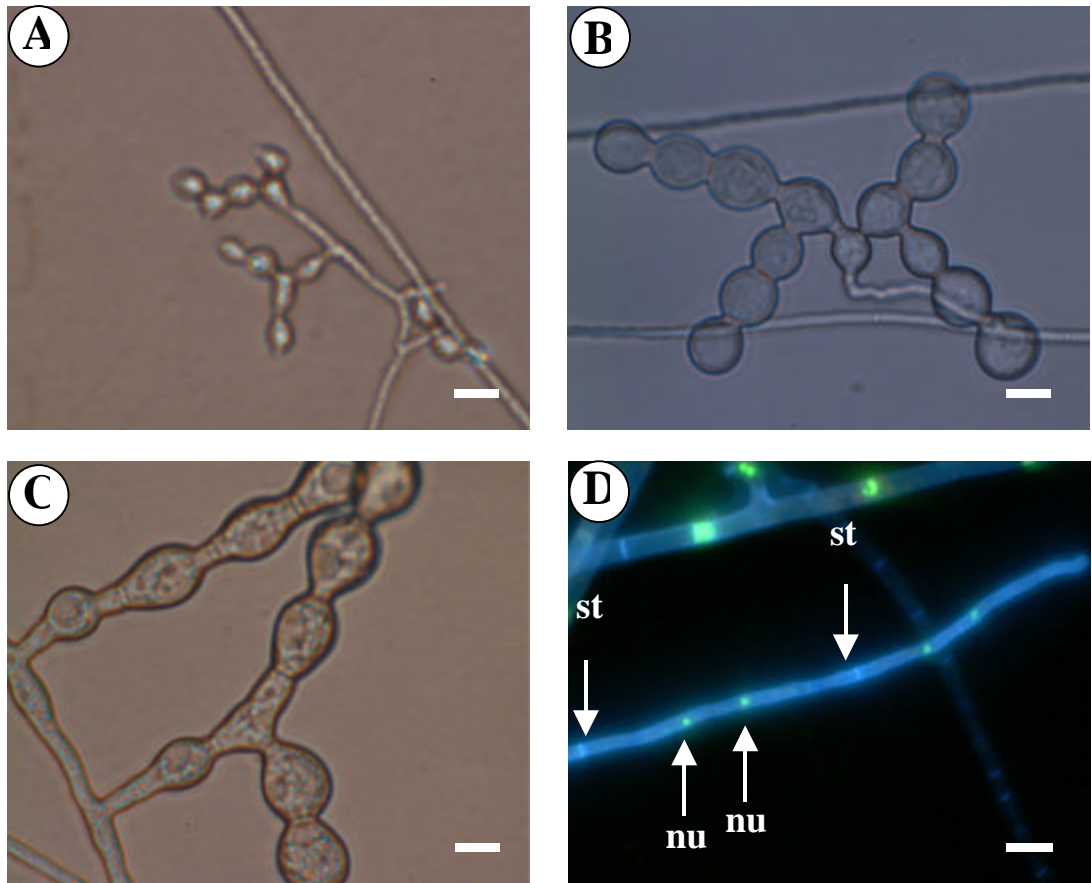


Figura 2. Morfologia do micélio dos isolados de fungos micorrízicos de orquídeas. Células monilióides de *Epulorhiza* sp. isolados do grupo I (A), grupo II (B) e grupo III (C). Imagem de micélio com fluocromo Syber Green I e Calcofluor sob microscopia de fluorescência, mostrando micélio binucleado e os septos (D). Nu: núcleo; st: septo. Escala: 10 μ m.

Tabela 2. Taxa de crescimento em meios de cultivo após 48 h a 28 °C no escuro, cor do micélio aéreo, característica do micélio aéreo, presença de borda da colônia, aspecto das colônias, diâmetro de hifa vegetativa e tamanho das células monilióides dos grupos de *Epulorhiza* isolados de orquídeas.

Grupo	Taxa de crescimento (cm h ⁻¹)		Cor	Micélio Aéreo	Borda	Aspecto	Diâmetro de hifa (BDA) ³	Célula Monilióide (CMA) ³
	BDA ¹	CMA ²						
I	0,005	0,018	Palha	Escasso	Sim	Liso	2,0	3-5 x 3-5
II	0,015	0,030	Creme	Escasso	Sim	Floculoso	2,0-3,0	11-16 x 13-17
III	0,015	0,034	Creme	Escasso	Não	Floculoso	2,0-3,0	9-13 x 10-17

1 - BDA – Batata dextrose ágar; 2 - CMA – Milho ágar; 3 – m.

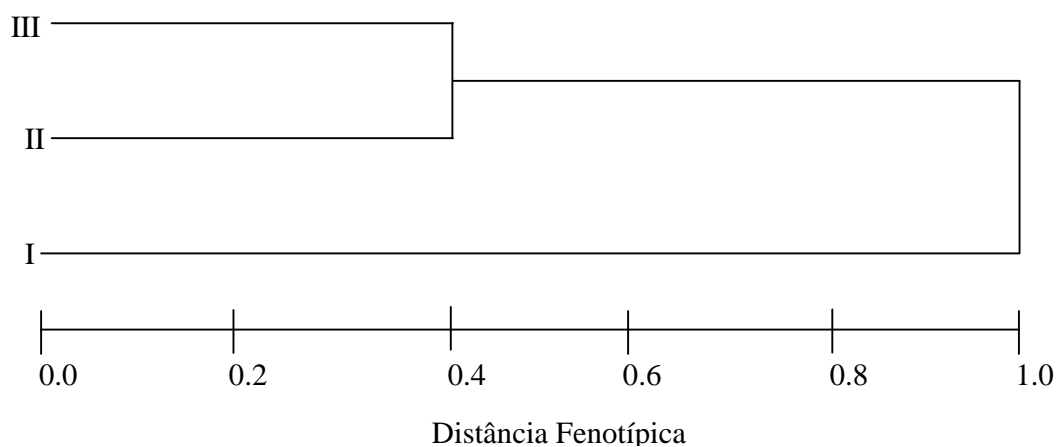


Figura 3. Dendrograma de agrupamento com base nas características qualitativas da caracterização morfológica dos isolados de fungos micorrízicos isolados de orquídeas da Serra do Brigadeiro, pelo método UPGMA.

2. Caracterização morfológica e anatômica do sistema radicular

A micorriza de orquídea foi identificada como do tipo tolipofágico, característica de fungos do grupo rizoctonióide (Figura 4 A). Os *pelotons* não apresentaram distinção morfológica entre as espécies de plantas, assim como também não se observou alteração no diâmetro das hifas que colonizavam o velame, as células de passagem e aquelas constituintes dos *pelotons*, provavelmente por pertencerem ao mesmo gênero de fungo, *Epulorhiza*. *Epidendrum secundum* apresenta raízes esbranquiçadas, com 4 a 6 mm de diâmetro, enquanto as raízes de *Zygopetalum mackaii* apresentam coloração amarelada, com 5 a 8 mm de diâmetro.

As plantas de *E. secundum* crescendo nas áreas 1 e 3 (Tabela 1) eram pequenas e apresentavam coloração arroxeada em resposta à exposição solar intensa. A variação de cor deve-se à presença de pigmentos antociânicos, principalmente nas folhas. A antocianina pode ser produzida em resposta ao estresse ambiental, como nutricional e hídrico, além de ser uma resposta à intensa radiação solar (Taiz, 2003). A atribuição à presença de antocianina nas folhas é coerente a essas respostas, pois o ambiente em questão proporciona tais condições. Por outro lado, *E. secundum* crescendo na área 2 apresentava-se com desenvolvimento normal, folhas verdes, túrgidas e vigorosas. As mudas de *Z. mackaii*, apesar de estarem expostas à alta irradiação solar, apresentavam-se com desenvolvimento normal, por ser uma espécie adaptada a essas condições.

Em ambas as espécies o velame é pluriestratificado com espessamento celulolítico em rede nas paredes (Figura 4 B). O velame é um tecido usualmente observado nas espécies de orquídeas e é formada por células mortas compactamente arranjadas, sendo considerado como uma característica adaptativa, especialmente em espécies tropicais (Arditti, 1992). Atribuí-se a este tecido a função de proteção mecânica, absorção e redução da perda de água pelo córtex das raízes aéreas de orquídeas (Arditti, 1992).

No córtex radicular das orquídeas das três regiões podem ser reconhecidas, a saber, exoderme, parênquima cortical e endoderme (Figuras 4). A exoderme, a camada mais externa do córtex, é uniestratificada (Figuras 4 B e C), constituída por dois tipos de células, uma tangencialmente mais alongada, cuja parede é espessa, e a outra, mais curta e de parede delgada, denominada de célula de passagem. Essas células permitem o transporte de água e nutriente via simplasto. Em *E. secundum*, nas células de passagem, foram observados os tilossomos (Figura 4 C), assim como observado por Silva (2005).

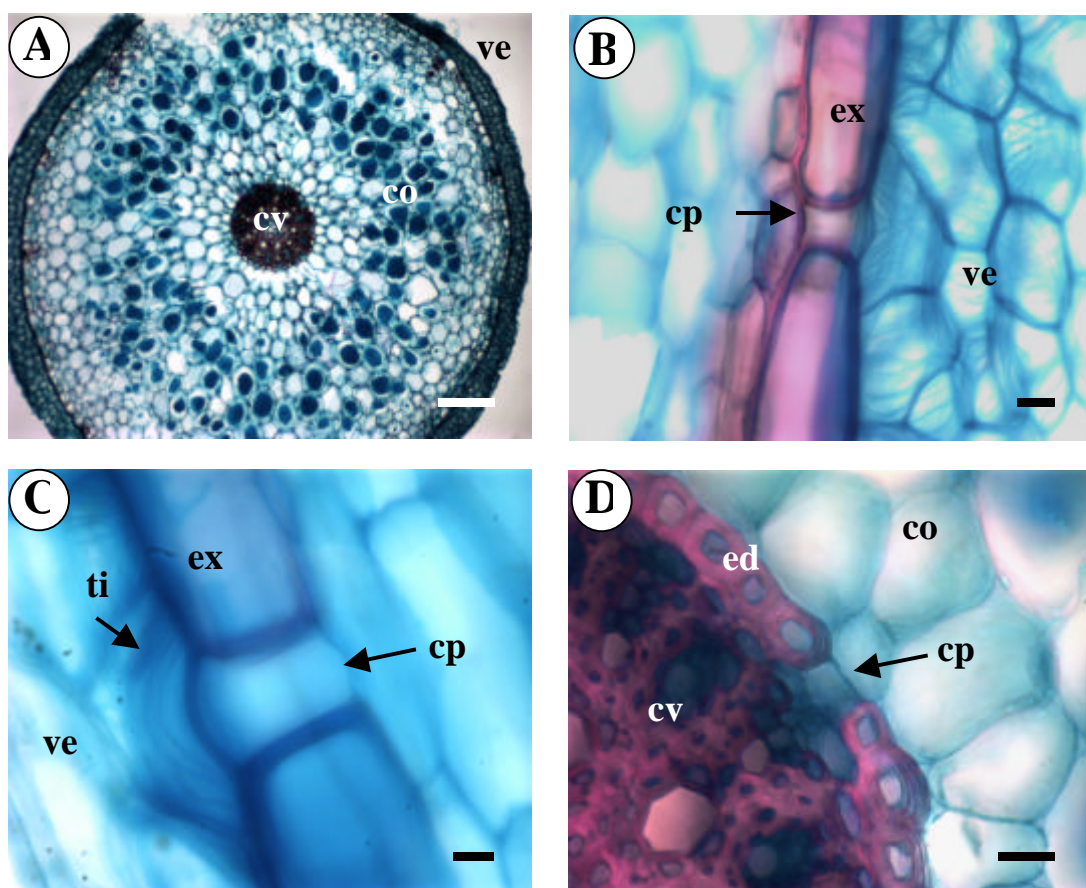


Figura 4. Caracterização do sistema radicular das espécies estudadas. (A) Seção transversal de *Zygopetalum mackaii* mostrando a colonização do córtex radicular. (B) Seção longitudinal de *Z. mackaii* destacando a exoderme e o velame. (C) Seção longitudinal de *Epidendrum secundum* destacando o tilossomo e o espessamento das células exodérmicas. (D) Seção transversal de *E. secundum* destacando a endoderme, célula de passagem, cilindro vascular. co: córtex radicular; cp: célula de passagem; cv: cilindro vascular; ed: endoderme; ex: exoderme; ti: tilossomos; ve: velame. Escala: 500 μ m (A); 20 μ m (B e D); 10 μ m (C).

O espessamento da parede das células da exoderme, em *E. secundum* é do tipo “O” e em *Z. mackaii* do tipo “U” (baseado em Arditti, 1992). As células do parênquima cortical de ambas as espécies são poliédricas e o arranjo é compacto (Figura 4 A).

Cristais do tipo ráfides foram observados dispersos em todo o córtex (Figura 5 A), estando mais presente a porção apical da raiz. Grãos de amido foram observados no parênquima de reserva (Figura 5 B), confirmada pelo teste do lugol (Johansen, 1940). Os grãos de amido estavam presentes somente em células não colonizadas, mas indistintamente em raízes colonizadas ou não. Cloroplastos foram observados em células da periferia do córtex de raízes aéreas das duas espécies estudadas (Figuras 5 C e D). Em raízes aéreas de orquídeas é comum a presença de cloroplastos, mas na literatura consultada não foi encontrado nenhum relato sobre a presença de *pelotons* em raízes clorofiladas como observado neste trabalho (Figuras 5 C e D). A presença colonização em células clorofiladas (Figura 5 C e D) é condizente com a informação de que os processos fotossintéticos e micotróficos ocorrem simultaneamente e aparentemente são independentes (Rasmussen & Whigham, 2002).

A endoderme é constituída apenas por uma camada de células de paredes espessas do tipo “O” e também células de parede delgada, que constituem as células de passagem da endoderme (Figura 4 D). A estrutura anatômica descrita confirma os resultados obtidos por Silva (2005), durante o estudo anatômico de espécies de orquídeas realizado na região do “Totem Deitado”.

3. Colonização, formação e degradação do *peloton*

O velame mostrou-se colonizado, apresentando o crescimento micelial dos fungos em toda a sua extensão (Figura 6 A) pelos fungos micorrízicos do grupo rizoctonióide. Essa distribuição tem sido observada em fungos associados às espécies de orquídeas tropicais (Richardson *et al.*, 1993; Pereira, 2005a; 2005c), mas não é comum em espécies temperadas (Rasmussen, 1995).

Fungos endofíticos, cuja morfologia está de acordo com a descrição dos “dark septated fungi” (DSF) (Barrow & Aaltonen, 2001) também foram observados colonizando o velame de *Z. mackaii* (Figura 6 B). Segundo Barrow & Aaltonen (2001) os DSF estão adaptados a plantas de ecossistemas áridos, passíveis a condições de déficit hídrico e estresse nutricional. Os autores observaram a colonização por DSF em plantas crescendo em regiões de escrubes e campos áridos no sudoeste dos Estados Unidos da América. Fungos DSF também foram observados no sistema radicular de

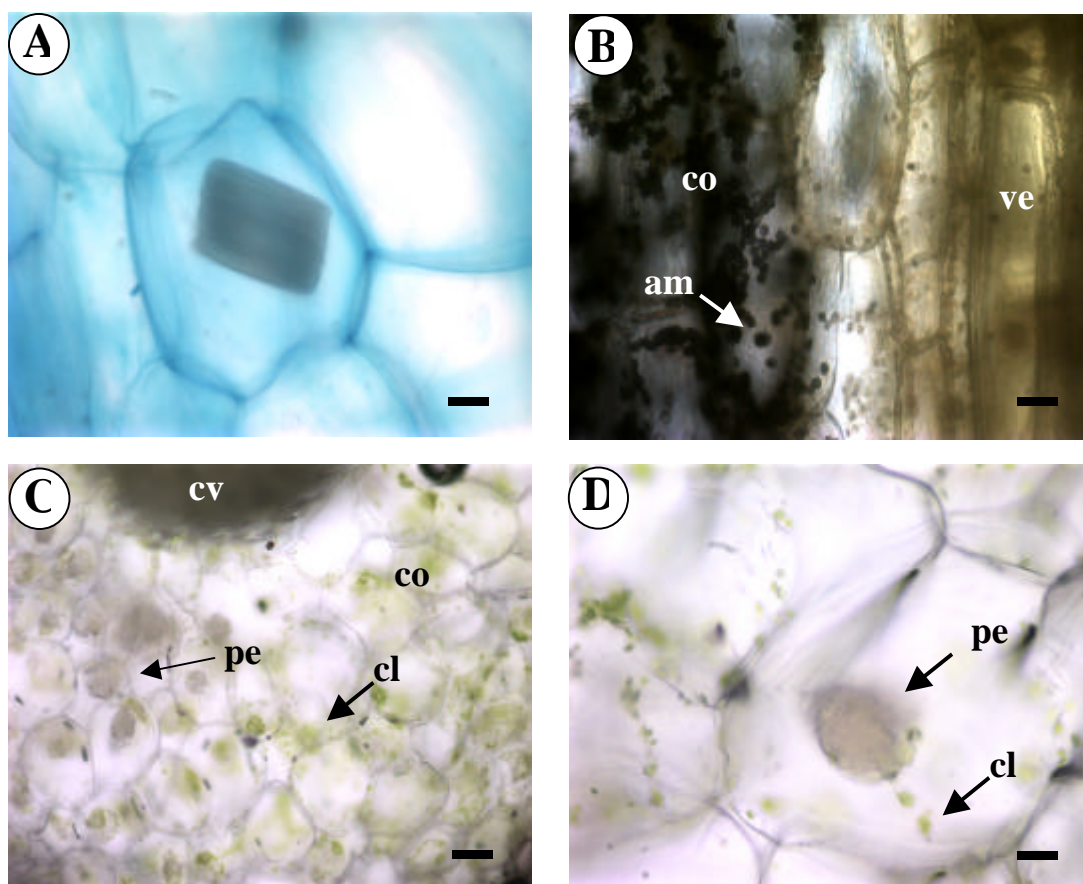


Figura 5. Caracterização do sistema radicular das espécies estudadas. (A) Presença de cristais tipo ráfites em *Zygopetalum mackaii*. (B) Presença de grânulos de amido em *Epidendrum secundum*. (C) Presença de cloroplastos em *E. secundum*. (D) Presença de cloroplastos em *Z. mackaii*. am: grânulos de amido; cl: cloroplastos; co: córtex radicular; pe: pelotão; ve: velame. Escala: 10 μm (A, B e D); 20 μm (C).

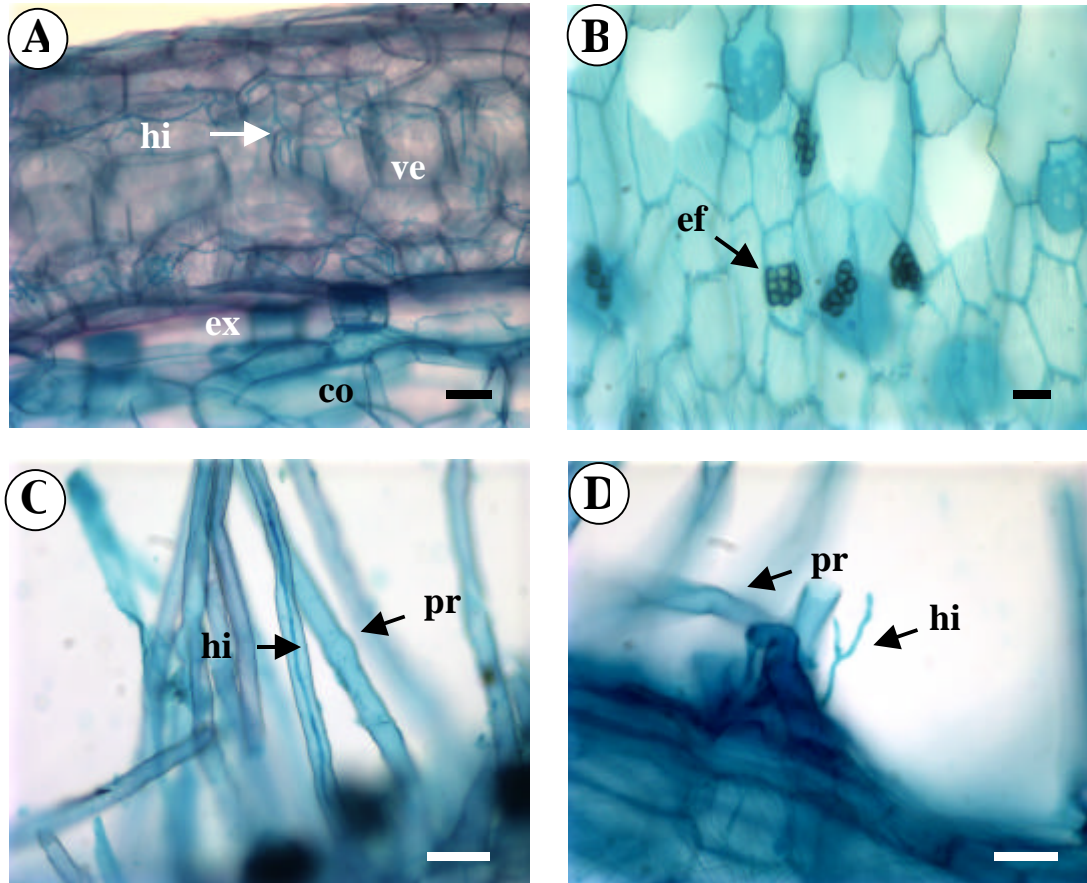


Figura 6. Colonização do sistema radicular de *Zygopetalum mackaii*. (A) Seção longitudinal mostrando o crescimento de hifas fúngicas entre as células do velame. (B) Seção longitudinal mostrando as estruturas de fungos endofíticos na região do velame. (C) Seção transversal mostrando a penetração de hifas via pêlo radicular. (D) Seção transversal mostrando a penetração das hifas via células epidérmicas. co: córtex radicular; ef: endofítico; ex: exoderme; hi: hifas; pr: pêlo radicular; ve: velame. Escala: 50 μ m (A, C e D); 20 μ m (B).

Croton migrans Casar (Euphorbiaceae) crescendo na sub-serra “Totem Deitado” (Vitarelli, 2006), entretanto, nenhum estudo para confirmar se os DSF encontrados no *Croton* e em *Zygopetalum* pertencem a uma mesma espécie foi ainda realizado.

A infecção das raízes ocorre via pêlos radiculares (Figura 6 C) ou diretamente pelo velame (Figura 6 D). Uma vez próximo à exoderme os fungos preferencialmente penetram via célula de passagem (Figura 7 A, B e C). Não foi observada a existência de célula de passagem colonizada, possivelmente não há a formação de *pelotons*, assim como não tem sido observada presença de arbúsculos ou vesículas nessas células, nas associações micorrízicas do tipo arbuscular (Peterson *et al.*, 2004). Essas células permitem, portanto, além da passagem de água e nutrientes, a penetração do fungo nas células corticais. Isso sugere que as orquídeas controlam o processo de infecção e que o fungo está adaptado a esse controle (Arditti, 1992).

Em *Z. mackaii*, embora raramente, a infecção foi também observada via células exodérmicas, na porção radicular próxima ao meristema (Figura 7 D). O fato das células exodérmicas próximas ao meristema apical não apresentarem as paredes espessadas, provavelmente pode contribuir para facilitar a penetração da hifa fúngica.

A colonização foi observada em todo o córtex, com exceção da região meristemática e da endoderme. Em *Z. mackaii* toda a extensão da raiz, desde o ápice até a porção distal se encontrava colonizada. Em *E. secundum* a colonização se mostrou menos intensa, espaçada, sem qualquer padrão de colonização ao longo da raiz.

Vários pontos de colonização foram observados em um mesmo fragmento radicular. Essa observação foi assumida como indicação de que essas plantas são colonizadas por propágulos de fungos do solo, e não somente por fungos associados desde a germinação. O fungo responsável pelo processo de germinação necessariamente não é o mesmo da fase adulta (McCormick *et al.*, 2004; Peterson & Massicotte, 2004), assim como, diferentes espécies de fungos podem colonizar concomitantemente o mesmo sistema radicular (Zelmer *et al.*, 1996).

Aparentemente, quando uma hifa invade a célula, ocorre o enovelamento e a formação do *peloton*. Quando completamente desenvolvido, o *peloton* pode ocupar todo o volume celular (Figura 8 A e B). A partir desses *pelotons*, novos *pelotons* são formados e todo o córtex pode ser colonizado, sendo a colonização célula-a-célula, não se observando estrutura intercelular (Zelmer *et al.*, 1996; Peterson *et al.*, 2004). A presença de somente células colonizadas por *pelotons* intactos foi verificada apenas nas porções radiculares cuja colonização encontrava-se em estágio inicial (Figura 7 A).

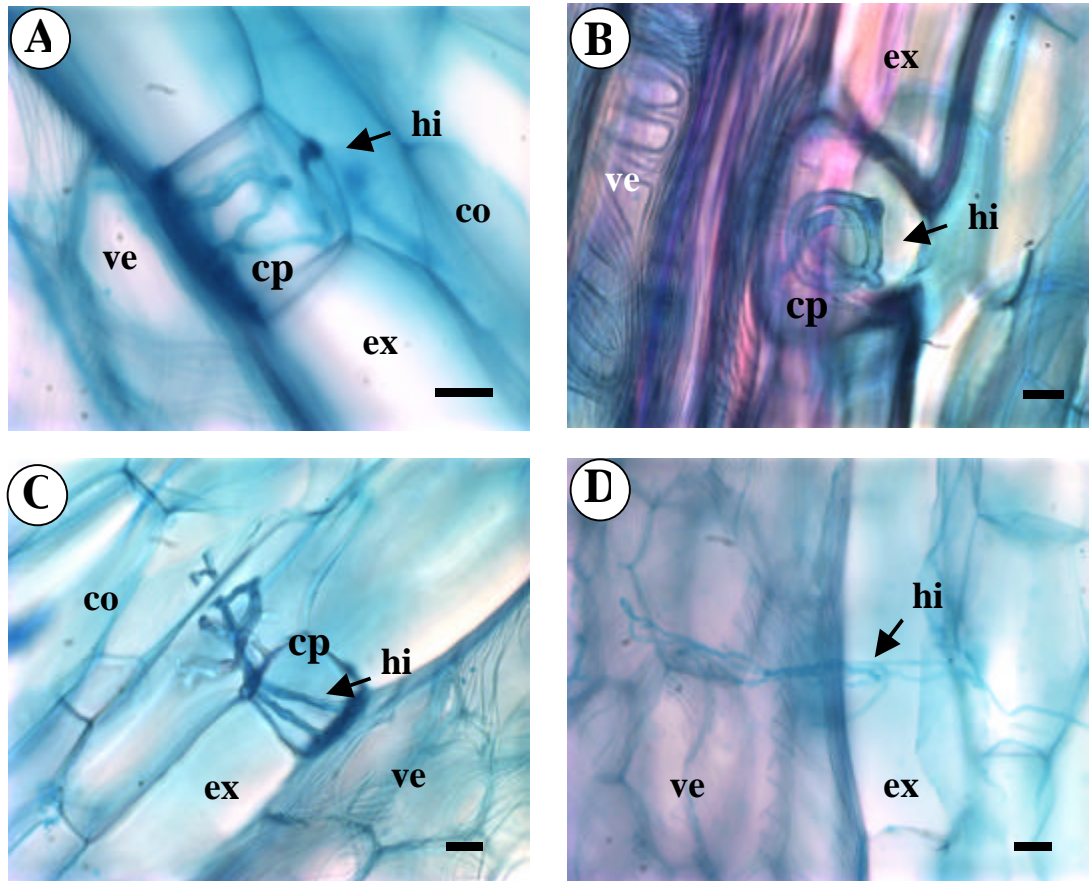


Figura 7. Colonização do sistema radicular. Passagem da hifa para as células do córtex via célula de passagem da exoderme em *Epidendrum secundum* (B) e *Zygopetalum mackaii* (A e C) e via célula exodérmica em *Z. mackaii* (D). co: córtex radicular; cp: célula de passagem; ex: exoderme; hi: hifas; ve: velame. Escala: 20 μ m (A, C e D); 10 μ m (B)

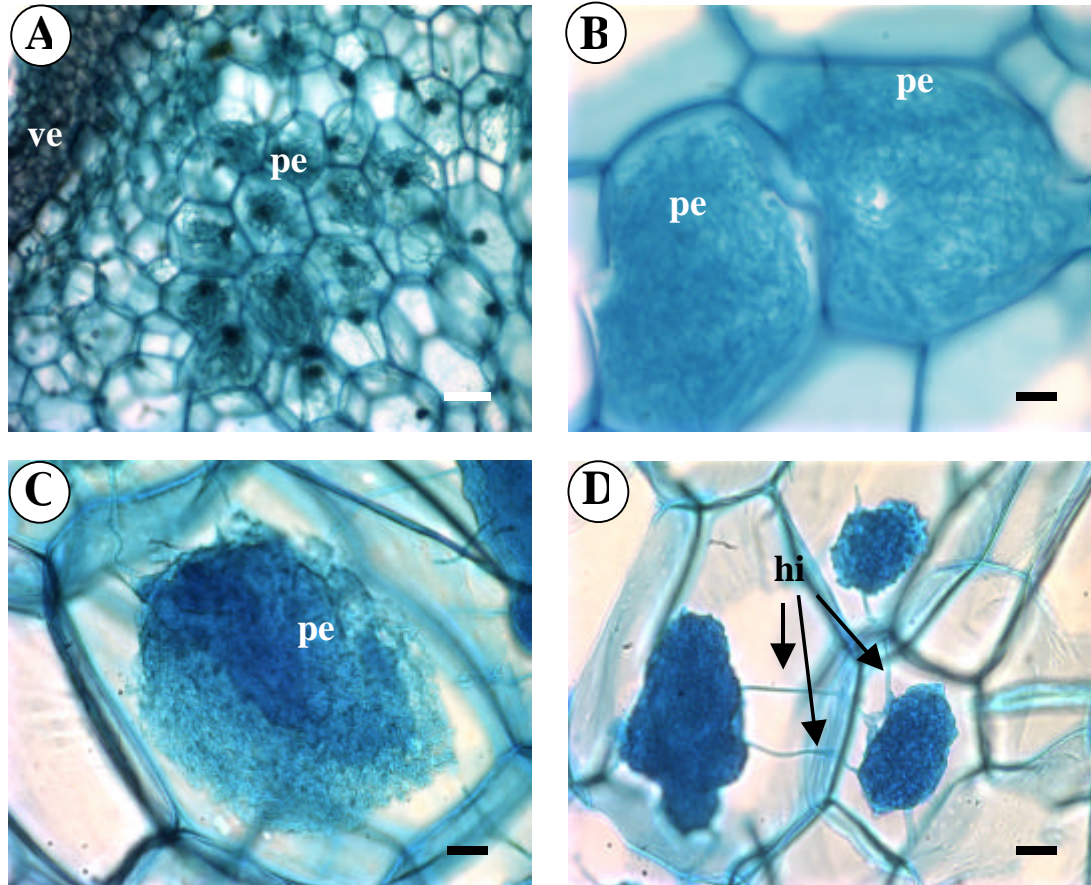


Figura 8. Formação e degradação dos pelotões. (A) Seção transversal de *Epidendrum secundum* mostrando córtex colonizado com pelotões intactos. (B) Seção longitudinal de *Zygopetalum mackaii* destacando células totalmente ocupadas por pelotões. (C) Seção longitudinal de *Z. mackaii* destacando a degradação do pelotão. (D) Seção longitudinal de *E. secundum* destacando hifas intactas conectando os pelotões degradados. Escala: 200 μ m (A); 10 μ m (B, C e D). hi: hifa; pe: pelotão; ve: velame

O estágio de degradação inicia-se por uma deformação de todo o *peloton*, seguido por uma redução uniforme de seu volume e formação de uma massa, onde não mais é possível distinguir as hifas (Figura 8 C). A degradação uniforme do conteúdo fúngico foi também observada em *Caladenia formosa* (Huynh *et al.*, 2004), *Epidendrum rigidum*, *Isochillus lineares*, *Maxillaria marginata*, *Oncidium varicosum*, *Oceoclades maculata* e *Polystachia concreta* (Pereira, 2005a). Ao contrário, em *Spiranthes sinensis* (Uetake *et al.*, 1997) a lise inicia-se no centro do *peloton* e, posteriormente, todo o conteúdo se degrada e permanece preferencialmente no centro da célula. A massa de hifas remanescente não perde por completo a sua atividade (Figura 8 D). Ela pode servir como inóculo para futura reinfecção (Uetake *et al.*, 1997). Os *pelotons* apresentam-se conectados, mesmo depois da degradação e redução de tamanho (Figura 8 D). Rasmussen & Whigham (2002) observaram em *Tipularia discolor* que o *peloton* era totalmente consumido, ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, onde o total consumo do *peloton* não pode ser observado. Observa-se, portanto, que essa característica pode estar relacionada com a relação planta-fungo em associação.

Em ambas as espécies estudadas, observaram-se *pelotons* degradados e intactos, concomitantemente, não se observando um padrão definido de distribuição, como o relatado por Pereira *et al.* (2005b), onde os *pelotons* não degradados estavam localizados próximos à exoderme e os *pelotons* degradados na região mediana e interna do córtex. Em razão das observações efetuadas infere-se que nessas espécies o modelo observado representa eventos individuais de colonização uma vez que não há distribuição espacial definida (Zelmer *et al.*, 1996).

Na literatura consultada, as informações sobre os primeiros estágios de colonização são referentes a observações *in vitro* de sementes e protocórmios (Peterson *et al.*, 1998; Uetake *et al.*, 1997). Atualmente, as novas técnicas de estudos desenvolvidas permitem a observação do processo de infecção no campo (Rasmussen & Whigham, 1993; Brundrett *et al.*, 2003), mas, ainda assim, restringem-se à observação da colonização da semente e do protocórmio.

4. Colonização micorrízica

Em todas as coletas, de todas as áreas, observaram-se fungos micorrízicos associados às raízes das plantas hospedeiras, inclusive naquelas que apresentavam o sistema radicular exposto, como é o caso de *Epidendrum secundum* crescendo sobre rochas (Tabela 3). Assim, esta informação entra em contradição com as observações

feitas por Rasmussen (1995) em relação às orquídeas terrestres e de Rivas *et al.* (1998) em orquídea epífita, onde as raízes aéreas não apresentavam colonização, mostrando que em condições deste estudo às orquídeas em questão são altamente dependentes da associação micorrízica.

A metodologia proposta por Trouvelot *et al.* (1986) com as alterações aplicadas foi utilizada com sucesso como alternativa para quantificar a colonização micorrízica em orquídeas (Tabela 3). Entretanto, há necessidade de desenvolvimento de métodos próprios que definam o procedimento de coleta e quantificação da colonização micorrízica em orquídeas, a fim de obtermos resultados mais claros quanto à dinâmica da associação e a dependência dos simbiossitos a associação. A determinação de uma metodologia auxiliaria também trabalhos que visam observar a influência de diversos fatores na colonização, não somente de raízes de plantas adultas, como também de sementes e protocormios.

Em micorriza de orquídeas é avaliada a atividade micotrófica da espécie pela relação e intensidade dos *pelotons* intactos e dos degradados (Rasmussen & Whigham, 2002), pois o fluxo de nutrientes é considerado unidirecional, sendo a planta o único beneficiário (Brundrett 2002; Brundrett *et al.*, 2004; Julou *et al.*, 2005), enquanto em micorriza arbuscular é avaliada a atividade micorrízica através da observação da presença de arbúsculos (Trouvelot *et al.*, 1986), pois são as estruturas responsáveis pelas trocas entre os simbiossitos (Peterson *et al.*, 2004).

A frequência colonização (F%) não variou com a época do ano (Tabela 3), contrastando com as informações observadas para *Lepanthes rupestris* em Porto Rico (Bayman *et al.*, 1997) e *Goodyera pubescens*, *Galearis spectabilis* e *Liparis lilifolia* nos Estados Unidos (Rasmussen & Whigham, 2002) onde a sazonalidade pode ter forte influência sobre a frequência de colonização. Entretanto, a característica da área onde as populações de orquídeas estão estabelecidas influenciou a F% (Tabela 3). Em *E. secundum* observou-se que a frequência de colonização foi maior quando as orquídeas estavam crescendo diretamente sobre as rochas, área 3, e também em *Zygopetalum mackaii*, que crescia sobre a rocha (área 4), em conjunto com crescimento rasteiro de monocotiledôneas. Em *E. secundum* crescendo entremeadas as Veloziaceae (área 1) e também na camada de substrato orgânico (área 2) foi menor, provavelmente em razão de o sistema radicular encontrar-se protegido permitindo uma maior retenção de água e nutrientes. Por esse resultado infere-se que o sistema radicular exposto às alterações climáticas, especialmente a radiação solar e em substrato com baixa capacidade de retenção de água e nutrientes, apresenta uma maior dependência pela associação.

Tabela 3 Percentagem de colonização de raízes de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* por fungos micorrízicos coletados de diferentes áreas e diferentes épocas do ano. Média a partir de 120 repetições.

Área*	Espécie	Época do ano				
		Ago - 2004	Nov - 2004	Jan - 2005	Abr - 2005	Jul - 2005
Frequência de colonização (F%)						
1	<i>E.secundum</i>	47,78 b	63,33 b	72,26 b	57,78 b	52,32 b
2	<i>E.secundum</i>	80,00 b	64,45 b	66,27 b	59,19 b	65,56 b
3	<i>E.secundum</i>	100,00 a	93,33 a	90,00 a	96,67 a	93,75 a
4	<i>Z.mackaii</i>	nc**	91,11 a	87,78 a	58,89 a	91,11 a
Intensidade global (M%)						
1	<i>E.secundum</i>	34,82 b A	24,70 b B	21,90 b C	19,52 b D	11,83 b E
2	<i>E.secundum</i>	3,66 b D	18,42 b B	17,73 b B	13,58 b C	21,82 b A
3	<i>E.secundum</i>	91,43 a A	21,23 a C	20,23 a D	20,07 a D	34,38 a B
4	<i>Z.mackaii</i>	nc	28,28 b B	10,07 b D	16,86 b C	37,64 b A
Intensidade de pelotons intactos nos fragmentos radiculares (p%)						
1	<i>E.secundum</i>	11,48 b	4,27 b	9,06 b	0,31 b	25,13 b
2	<i>E.secundum</i>	2,91 b	2,05 b	21,66 b	1,79 b	12,67 b
3	<i>E.secundum</i>	0,74 b	8,02 b	7,92 b	5,27 b	8,91 b
4	<i>Z.mackaii</i>	nc	18,32 a	34,16 a	56,81 a	23,79 a
Riqueza dos pelotons intactos no córtex (P%)						
1	<i>E.secundum</i>	2,84 b	2,12 b	5,26 b	0,90 b	0,32 b
2	<i>E.secundum</i>	0,13 b	0,32 b	3,95 b	0,16 b	1,15 b
3	<i>E.secundum</i>	0,68 b	1,70 b	1,60 b	1,06 b	3,06 b
4	<i>Z.mackaii</i>	nc	6,50 a	2,90 a	6,43 a	9,38 a

*Caracterização das áreas conforme Tabela 1. ** nc = não coletado. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes entre as linhas e letras maiúsculas diferentes entre as colunas, dentro da mesma característica avaliada, diferem entre si pelo teste Scott – Knott a 5% de significância.

As condições climáticas (Figura 1) influenciaram a intensidade global de colonização (M%) (Tabela 3). Assim, verifica-se que em períodos de menor precipitação (julho a agosto) esse valor foi maior, donde se infere que nesse período as plantas hospedeiras são mais dependentes dos fungos micorrízicos. Apesar de *Z. mackaii* estar também crescendo sobre as rochas, a presença de monocotiledôneas parece proteger o sistema radicular e, conseqüentemente a associação. Alguns autores sugerem que o micotrofismo seja um suplemento à fotossíntese uma vez que, além do suprimento de nitrogênio e fósforo, a planta também é suprida de carbono (Gebauer & Meyer, 2003; Peterson & Massicotte, 2004; Julou *et al.*, 2005). A presença colonização em células clorofiladas (Figura 4 C e D) é condizente com a informação de que os processos ocorrem simultaneamente e aparentemente são independentes (Rasmussen & Whigham, 2002).

Considerando a época de florescimento de *E. secundum* (janeiro a abril/2005) e de *Z. mackaii* (novembro/2005), períodos de maior precipitação (Figura 1), verificou-se que não houve uma maior freqüência de colonização, nem alteração na intensidade de *pelotons* degradados. Essa informação contrasta com o que foi observado em *Tipularia discolor*, onde a fase de florescimento e frutificação apresentou considerável influência na colonização micorrízica (Rasmussen & Whigham, 2002).

A associação com fungos micorrízicos permite as orquídeas persistirem em diversos habitats e é responsável por sua ocorrência por todo mundo (Arditti, 1992). Contudo, é importante obter informações sobre a dependência das diferentes espécies aos fungos micorrízicos e, assim, poder compreender melhor como algumas espécies são mais competitivas e persistentes, enquanto outras são tão raras e de ocorrência esporádica.

A compreensão do processo de colonização, a identificação dos fungos associados a orquídeas e o entendimento do papel desses fungos na natureza podem contribuir para futuros programas de micorrização controlada em projetos de reintrodução de orquídeas na natureza e horticultura.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- O gênero *Epulorhiza* predomina como fungo micorrízico de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* crescendo na sub-serra “Totem Deitado”;
- A morfologia das micorrizas de *Z. mackaii* e *E. secundum* é semelhante e é do tipo Tolipofágico;
- Células clorofiladas podem ser colonizadas por fungos micorrízicos;
- A colonização inicia-se pela entrada da hifa pelos pêlos radiculares ou células epidérmicas, passam pelas células do velame, entram via célula de passagem para colonizar o córtex.
- A condição climática influencia a colonização micorrízica em *E. secundum* e *Z. mackaii*;
- As micorrizas desempenham um papel crucial no estabelecimento e no desenvolvimento das orquídeas, nessas áreas de condições ambientais extremas, como a da sub-serra “Totem Deitado”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen, T.F. 1996. A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia sensu lato* employing morphological, ultrastructural and molecular methods. **Mycological Research**, v.100, p.1117-1128.

Andersen, T.F. & Rasmussen, H.N. 1996. The mycorrhizal species of *Rhizoctonia*. In: B. Sneh; S. Jabaji-Hare; S. Neate and G. Dijst (ed.). ***Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p.379-390.

Arditti, J. 1992. **Fundamentals of Orchid Biology**. New York: John Wiley. 691p.

Arditti, J. & Ghani, A.K.A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, v.145, p.367-421.

Barrow, J.R. & Aaltonen, R.E. 2001. Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and influence of host physiological activity. **Mycorrhiza**, v.11, p. 199-205.

Batty, A.L.; Dixon, K.W.; Brundrett, M. & Sivasithamparam, K. 2001. Long-term storage of mycorrhizal fungi and seed as a tool for the conservation of endangered Western Australian terrestrial orchids. **Australian Journal of Botany**, v.49, p.619-628.

Bayman, P.; González, E.J.; Fumero, J.J. & Tremblay, R.L. 2002. Are fungi necessary? How fungicides affect growth and survival of the orchid *Lepanthes rupestris* in the field. **Journal of Ecology**, v.90, p.1002-1008.

Bayman, P.; Lebrón, L.L.; Tremblay, R.L. & Lodge, D.J. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). **New Phytologist**, v.135, p.143-149.

Brundrett, M.C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. **New Phytologist**, v.154, p.275-304.

Brundrett, M.C.; Scade, A.; Batty, A.L.; Dixon, K.W. & Sivasithamparam, K. 2003. Development of *in situ* and *ex situ* seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats. **Mycological Research**, v.107, p.1210–1220.

Caiafa, A.N. 2002. **Composição florística e estrutura da vegetação sobre um afloramento rochoso no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, MG**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia Vegetal. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 55p.

Clay, K. 1993. The ecology and evolution of endophytes. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.44, p.39-64.

Costa, C.M.R.; Hermann, G.; Martins P.S.; Lins, L.V. & Lamas I.R. 1998. **Biodiversidade em Minas Gerais. Um atlas para sua conservação**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas. 94p.

Currah, R.S.; Smreciu, E.A. & Hambleton, S. 1989. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Platanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae). **Canadian Journal of Botany**, v.68, p.1171-1181.

Currah, R.S. & Zelmer, C.D. 1992. A key and notes for the genera of fungi with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. **Reports of the Tottori Mycological Institute**, v.30, p.43-59.

Currah, R.S.; Zettler, L.W. & McInnis, T.M. 1997. *Epulorhiza inquilina* sp. Nov. from *Platanthera* (Orchidaceae) and key to *Epulorhiza* species. **Mycotaxon**, v.61, p.338-342.

Davidson, R.W.; Campbell, W.A. & Blaisedell, D.J. 1938. Differentiation of wooddecay fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. **Journal of Agricultural Research**, v.57, p.683-695.

ENGEVIX. 1995. **Caracterização do meio físico da área autorizada para a criação do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro - Relatório Técnico Final dos Estudos - 8296-RE-H4-003/94 "VER.1"**. Instituto Estadual de Floresta, BIRD/PRÓ-FLORESTA/SEPLAN. 59p.

Gebauer, G. & Meyer, M. 2003. ^{15}N and ^{13}C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. **New Phytologist**, v.160, p.209-223.

Hadley, G. 1982. Orchid mycorrhiza. In: Arditti J. (Ed), **Orchid Biology – Reviews and Perspective II**. Ithaca: Cornell University Press. p.84-118.

Huynh, T.T.; McLean, C.B.; Coates, F. & Lawrie, A.C. 2004. Effects of developmental stage and peloton morphology on success in isolation of mycorrhizal fungi in *Caladenia formosa* (Orchidaceae). **Australian Journal of Botany**, v.52, p.231-241.

Johansen, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc. 523p.

Jonsson, L. & Nylund, J.E. 1979. *Favolaschia dybowskyana* Singer (Aphylllophorales), a new orchid mycorrhizal fungus from tropical Africa. **New Phytologist**, v.83, p.121-128.

Julou, T.; Burghardt, B.; Gebauer, G; Berveiller, D.; Damesin, C. & Selosse, M.A. 2005. Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. **New Phytologist**, v.166, p.639-653.

Kraus, J.E. & Arduin, M. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR (Editora universidade Rural). 107p.

Kristiansen, K.A; Rasmussen, F.N. & Rasmussen, H.N. 2001a. Seedlings of *Neuwiedia* (Orchidaceae subfamily Apostasioideae) have typical orchidaceous mycotrophic protocorms. **American Journal of Botany**, v.88, p.956-959.

Kristiansen, K.A; Taylor, D.L.; Kjoller, R.; Rasmussen, H.N. & Rosendahl, S. 2001b. Identification of mycorrhizal fungi from single pellets of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences. **Molecular Ecology**, v.10, p.2089-2093.

Leake, J. 1994. The biology of myco-heterotrophic (“saprophytic”) plants. **New Phytologist**, v.127, p.171-216.

Ma, M.; Tan, T.K. & Wong, S.M. 2003. Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids. **Mycological Research**, v.107, p.1041-1049.

McCormick, M.K.; Whigham, D.F. & O’Neill, D.F. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. **New Phytologist**, v.163, p.425-438.

McKendrick, S.L.; Leake, J.R. & Read, D.J. 2000a. Symbiotic germination plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. **New Phytologist**, v.145, p.539-548.

McKendrick, S.L.; Leake, J.R.; Taylor, D.L. & Read, D.J. 2000b. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic plants in nature ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.145, p.523-537.

McKendrick, S.L.; Leake, J.R.; Taylor, D.L. & Read, D.J. 2002. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. **New Phytologist**, v.154, p.223-247.

Meinhardt, L.W.; Bellato, C.M. & Tsai, S.M. 2001. SYBR® Green I used to evaluate nuclei number of fungal mycelia. **Biotechniques**, v.31, p.42-46.

Moore, R.T. 1987. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. **Mycotaxon**, v.29, p.91-99.

Moore, R.T. 1996. The pore dolipore/parenthesome septum in modern taxonomy. In: B. Sneh; S. Jabaji-Hare; S. Neate and G. Dijst (ed.). **Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, pathology and Disease Control**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p.13-34.

Nogueira, R. E. 2004. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de orquídeas**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Microbiologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.37p.

Otero, J.T.; Ackermen, J.D. & Bayman, P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. **American Journal of Botany**, v.89, p.1852-1858.

Otero, J.T.; Ackermen, J.D. & Bayman, P. 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. **Molecular Ecology**, v.13, p.2393-2404.

Pereira, M.C. 2004. **Indução *in vitro* da germinação de sementes de sementes de *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides**. Dissertação (Monografia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Pereira, O.L. 2001. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécies de orquídeas neotropicais**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Microbiologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 48p.

Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M. & Borges, A.C.; Araújo, E.F. 2005a. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. **Canadian Journal of Botany**, v.83, p.54–65.

Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Rollemberg C.L. & Borges, A.C. 2005b. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.199-206.

Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Rollemberg C.L. & Chaer G.M. 2005c. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p. 191-197.

Pereira, O.L.; Rollemberg, C.L; Borges, A.C.; Matsuoka, K. & Kasuya, M.C.M. 2003. *Epulorhiza* epiphytica sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. **Mycoscience**, v.44, p.153-155.

Peterson, R.L.; Bonfante, P.; Faccio, A. & Uetake, Y. 1996. The interface between fungal hyphae and orchid protocorms cells. **Canadian Journal of Botany**, v.74, p.1861-1870.

Peterson, R.L. & Currah, R.S., 1990. Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* and *Ceratobasidium cereale*. **Canadian Journal of Botany**, v.68, p.1117-1125.

Peterson, R.L. & Massicotte, H.B. 2004. Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. **Canadian Journal of Botany**, v.82, p.1074-1088.

- Peterson, R.L.; Massicotte, H.B. & Melville, L.H. 2004. **Mycorrhizas: Anatomy and cell biology**. NRC Research Press, Ottawa, Canada.
- Peterson, R.L.; Uetake, Y. & Zelmer, C., 1998. Fungal symbioses with orchid protocorms. **Symbiosis**, v.25, p.29-55.
- Rasmussen, H.N. 1995. **Terrestrial orchid: from seed to mycotrophic plant**. New York: Cambridge University Press. 444p.
- Rasmussen, H.N., 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. **Plant and Soil**, v.244, p.149-163.
- Rasmussen, H.N. & Whigham, D.F. 1993. Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchid. **American Journal of Botany**, v.80, p.1374-1378.
- Rasmussen, H.N. & Whigham, D.F., 2002. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. **New Phytologist**, v.154, p.797-807.
- Richardson, K.A. & Currah, R.S. 1995. The fungal community associated with the roots of some rainforest epiphytes of Costa Rica. **Selbyana**, v.16, p.49-73.
- Richardson, K.A.; Currah, R.S. & Hambleton, S. 1993. Basidiomycetes endophytes from the roots of neotropical epiphytic orchidaceae. **Lyndleyana**, v.8, p.127-137.
- Richardson, K.A.; Peterson, R.L. & Currah, R.S. 1992. Seed reserver and early symbiotic protocorm development of *Plantanther hyperborea* (Orchidaceae). **Canadian Journal of Botany**, v.70, p.291-300.
- Rivas, M.; Warner, J. & Bermudez, M. 1998. Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. **Revista biologia tropical**, v.46, p.211-216.
- Senthilkumar, S.; Britto, S.J.; Krishnamurthy, K.V. & Hariharan, C. 2000. Biochemical analysis of mycorrhizal roots of *Aeides maculosum*. **Phytomorphology**, v.50, p.273-279.
- Silva, I. V. 2005. **Anatomia foliar e radicular de espécies de Orchidaceae de um campo de altitude do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (MG)**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Botânica. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 132p.
- SIMGE – Sistema de Meteorologia e recursos Hídricos de Minas Gerais. Disponível em: < http://www.simge.mg.gov.br/base_dados/index.html > Acesso em: 01 fev. 2006.
- Smith S.E. and Read D.J., 1997. **Mycorrhizal symbiosis**. 2 ed. London, UK: Academic Press.
- Stalpers, J.A.; Andersen, T.F. & Gams, W. 1998. Two proposals to conserve the names *Rhizoctonia* and *R. solani* (Hyphomycetes). **Taxon**, v.47, p.725-726.
- Taiz, L. & Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Editora Artmed. 720p.

- Taylor, D.L. & Bruns, T.D. 1999. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza macula* and *C. mertensiana*. **Molecular Ecology**, v.8, p.1719-1732.
- Taylor, D.L.; Bruns, T.D.; Leake, J.R. & Read, D.J. 2002. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: M.G.A. van der Heijden; I. Sanders (ed.). **Mycorrhizal Ecology**. Berlin: Springer-Verlag. P. 375-413.
- Taylor, D.L.; Bruns, T.D.; Szaro, T.M. & Hodges, S.A. 2003. Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata*, a nonphotosynthetic desert orchid. **American Journal of Botany**, v.90, p.1168-1179.
- Tremblay, R.L.; Zimmerman, J.K.; Lebrón, L.; Bayman, P.; Satre, I., Axelrod, F. & Alers-Garcia, J., 1998. Host specificity and low reproductive success in the rare endemic Puerto Rican orchid *Lepanthes caritensis*. **Biological Conservation**, v.85, p.297-304.
- Trouvelot. A.; Kough, J.L. & Gianinazzi-Pearson, V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S. (ed.). **Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizaed**. Paris: INRA Press. p. 217-221.
- Uetake, Y.; Farquhar, M.L. & Peterson, R.L. 1997. Changes in microtubules arrays in symbiotic orchid protocorm during fungal colonization and senescence. **New Phytologist**, v.135, p.701-709.
- Uetake, Y. & Peterson, R.L. 1998. Association between microtubules and symbiotic fungal hyphae in protocorm cells of the orchid species, *Spiranthes sinensis*. **New Phytologist**, v.140, p.715-722.
- Vitarelli, N.C. 2006. **Morfo-anatomia e estratégias adaptativas de populações de *Croton migrans* Casar (Euphorbiaceae) ocorrentes no campo de altitude do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – MG**. Dissertação (Monografia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Warcup, J.H., 1981. The mycorrhizal relationships of Australian orchids. **New Phytologist**, v.87, p.371-381.
- Warcup, J.H., 1988. Mycorrhizal associations of isolates of *Sebacina vermifera*. **New Phytologist**, V.110, p.227-231.
- Yoder, J.A.; Zettler, L.W. & Stewart, S.L. 2000. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. **Plant Science**, v.156, p. 145-150.
- Zelmer, C.D. & Currah, R.S. 1994. Evidence for a fungal liaison between *Corallorhiza trifida* (Orchidaceae) and *Pinus contortai* (Pinaceae). **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.862-866.

- Zelmer, C.D. & Currah, R.S. 1995. *Ceratorhiza pernacatena* and *Epulorhiza calendulina* spp. Nov.: mycorrhizal fungi of terrestrial orchids. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.1981-1985.
- Zelmer, C.D. & Currah, R.S. 1997. Symbiotic germination of *Spiranthes lacera* with a naturally occurring endophyte. **Lindleyana**, v.12, p.142-148.
- Zelmer, C.D.; Cuthbertson, L. & Currah, R.S. 1996. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. **Mycoscience**, v.37, p.439-448.
- Zettler, L.W., Delaney, T.W. & Sunley, J.A. 1998. Seed propagation of the epiphytic green-fly orchid, *Epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus. **Selbyana**, v.19, p.249-253.
- Zettler, L.W. & Mcinnis, T.M.Jr. 1993. Symbiotic seed germination of *Spiranthes cernura* and *Goodyera pubescens* (Orchidaceae: Spiranthoideae). **Lindleyana**, v.8, p.155-162.
- Zettler, L.W.; Stewart, L.S.; Bowles, M.L. & Jacobs, K.A. 2001. 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.