

MELISSA FAUST BOCAYUVA CUNHA

**ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA E PROPAGAÇÃO SIMBIÓTICA DE
ESPÉCIES DE *Hadrolaelia* E *Hoffmannseggella* (ORCHIDACEAE)**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Botânica, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

MELISSA FAUST BOCAYUVA CUNHA

**ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA E PROPAGAÇÃO SIMBIÓTICA DE
ESPÉCIES DE *Hadrolaelia* E *Hoffmannseggella* (ORCHIDACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada em 10 dezembro de 2012.

Lydice Sant'Anna Meira Haddad

Marlon Corrêa Pereira

Maria Catarina Megumi Kasuya
(Coorientadora)

Olinto Liparini Pereira
(Coorientador)

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, CAPES, FAPEMIG e a American Orchid Society pelo apoio financeiro e bolsas de todos estudantes deste projeto.

À professora Maria Catarina Megumi Kasuya, por ser uma orientadora que zelou para que eu evoluísse com como pessoa e profissional.

Ao professor Wagner Campos Otoni, por me “abraçar” como aluna de doutorado no programa de Pós-graduação de Botânica.

Ao professor Olinto Liparini Pereira, por abrir as primeiras portas para o mundo das micorrizas de orquídeas.

Ao professor Marlon Correa Pereira, pela amizade e por se disponibilizar a me ensinar todos seus conhecimentos sobre as associações micorrízicas de orquídeas.

À Sabrina Feliciano Oliveira, minha grande amiga e companheira no desenvolvimento deste projeto.

Ao Tomás Gomes Reis Veloso, pela imensa amizade, companheirismo e prestatividade.

A Emiliane F. Freitas e Juliana A. Silva, pelo grande auxílio e disponibilidade na execução dos experimentos.

Ao Merinha, grande escalador de árvores, pela amizade e auxílio nos trabalhos de campo.

Aos todos colegas do Laboratório de Associações Micorrízicas, em especial André, Bruno, Cintia, Gilberto, Marliane, Mateus D., Mateus L., Lydice, Zé Maria pela grande atenção e agradável convivência.

A Bioma Meio Ambiente pelo apoio nos trabalhos de campo nas áreas de canga da Cia. da Vale.

A todos os funcionários do IEF (Parques Estaduais, Serra do Brigadeiro e Serra Negra), pelo auxílio nos trabalhos de campo.

Ao Projeto Cores (JBRJ), pelo apoio no primeiro ano de doutorado.

À Dona Rosilda e aos companheiros do grupo de almoço, por providenciarem os agradáveis e deliciosos almoços de cada dia.

A todos meus amigos e amigas, estejam eles em Belo Horizonte, Viçosa, Rio de Janeiro, ou até mesmo em outros países, pela força e carinho em todos os momentos.

As minhas famílias do “coração”, Gaio, Gonzaga, Mendonça, em especial ao Bruno Araújo Furtado de Mendonça e Julia Gaio de Mendonça pelo grande apoio na execução da tese Viçosa.

As minhas famílias, Bergman, Bocayuva, Faust, Simões por sempre me apoiarem com amor em todos meus desafios.

À minha filha Betina Faust Bocayuva Gonzaga, luz da minha vida que me abençoa todos os dias!

ORCHIDACEAE..... “It is not the strongest of the species that survive, not the most intelligent but the one most responsive to change” C. Darwin

BIOGRAFIA

Melissa Faust Bocayuva Cunha, filha de Luiz Quintino Cernes Simões Bocayuva Cunha e Patricia Faust Bocayuva Cunha, nasceu no Rio de Janeiro, no dia 27 de outubro de 1978. Em maio de 1998 ingressou na Universidade Santa Úrsula, Rio de Janeiro, graduando-se, julho de 2001, em Ciências Biológicas. Em março de 2005, defendeu a dissertação de mestrado em Botânica Diversidade Vegetal: Conhecer e Conservar, na Escola Nacional de Botânica Tropical, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Em agosto de 2006 finalizou o MBE, a pós-graduação executiva em Meio Ambiente na COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Trabalhou no Orquidário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2002/2006 e posteriormente no Projeto Cores, Conservação das Orquídeas em Risco de Extinção Petrobrás (CENPES) & Fundação Educacional Charles Darwin & JBRJ 2006/2009. Em março de 2008, iniciou o curso de doutorado em Botânica no Departamento de Biologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERENCIAS	7
2. <i>Epulorhiza</i> sp. IS THE MAIN <i>Rhizoctonia</i> -LIKE FUNGI ASSOCIATED TO <i>Hadrolaelia jongheana</i> , <i>Hoffmannseggella caulescens</i> AND <i>H. cinnabarina</i> (ORCHIDACEAE), THE THREATENED SPECIES FROM ATLANTIC FORESTS, BRAZIL (formatação de acordo com guia do autor da revista Mycorrhiza)	13
Abstract.....	14
Introduction	15
Materials and methods.....	17
Orchid species and study sites	17
Root sampling and <i>Rhizoctonia</i> -like fungal isolation.....	20
Morphological characterization.....	20
Molecular characterization	21
Sequencing and phylogenetic analyses.....	21
Results	22
Root sampling and <i>Rhizoctonia</i> -like fungal isolation.....	22
Morphological characterization.....	22
Molecular characterization	27
Discussion.....	29
References	33
3 EFFICIENCY OF <i>Epulorhiza</i> spp. ON SEED GERMINATION OF <i>Hadrolaelia</i> AND <i>Hoffmannseggella</i> SPECIES (ORCHIDACEAE) (formatação de acordo com guia do autor da revista da Plant Cell, Tissue and Organ Culture)	40
Abstract.....	41
Introduction	42
Materials and methods.....	43
Seed source and sterilization	43
Molecular fungi identification	43
DNA extraction and PCR amplification.....	43
Sequencing and phylogenetic analyses.....	44
Symbiotic fungi survey.....	45
Germination scoring and statistical analysis	45
Nutritional supply	46

Results	47
Fungal mycobionts	47
Symbiotic seed germination and GI	49
Nutritional analysis.....	53
Discussion.....	54
References	58
4 ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS MICORRIZADAS DE <i>Hadrolaelia</i> E <i>Hoffmannseggella</i> (ORCHIDACEAE) EM SUBSTRATOS ALTERNATIVOS (formatação de acordo com guia do autor da revista Acta Scientiarum Agronomy)	
Resumo	63
Abstract.....	64
Introdução	65
Material e Métodos	66
Resultados e Discussão.....	68
Avaliação do crescimento.....	68
Avaliação da micorrização	71
Conclusões.....	74
Referências	74
5.CONSIDERAÇÕES FINAIS	79

RESUMO

CUNHA, Melissa Faust Bocayuva, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro 2012. **Associação micorrízica e propagação simbiótica de espécies de *Hadrolaelia* e *Hoffmannseggella* (Orchidaceae).** Orientador: Wagner Campo Otoni, Coorientadores: Maria Catarina Megumi Kasuya e Olinto Liparini Pereira.

Três espécies de orquídeas em risco de extinção *Hoffmannseggella caulescens*, *H. cinnabarina* e *Hadrolaelia jongheana* foram selecionadas para o presente trabalho por serem ícones da situação atual de um dos mais importantes hotspot do mundo, a Floresta Atlântica. A fim de criar as bases de um modelo de conservação integrada para orquídeas em risco de extinção, os objetivos propostos neste trabalho são realizar a caracterização morfológica e molecular de isolados de *Rhizoctonia*-like associados a estas orquídeas, para desta forma elaborar protocolos de propagação *in vitro* com *Epulorhiza* spp. e de aclimatização de plântulas micorrizadas em casa-de-vegetação, testando substratos alternativos. Através da caracterização morfológica e molecular, 30 *Rhizoctonia*-like foram identificados como *Epulorhiza* spp. Isolados das espécies rupícolas *Hoffmannseggella* representam dois clados muito próximos a *Tulasnella calospora*. Isolados *H. jongheana* são filogeneticamente distantes entre eles e próximos a quatro espécies de *Tulasnella* sp. Nossos resultados desmontaram que as orquídeas tropicais, epífitas e rupícolas, são provavelmente generalistas em suas associações com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza* sp. As ferramentas moleculares proporcionaram uma abordagem mais precisa do que a identificação morfológica. Quatro isolados de *Epulorhiza* promoveram a germinação de sementes, um deles (M65) proporcionou taxas de germinação e índice de crescimento significativamente mais elevados que os demais. Também houve germinação das sementes nos tratamentos não inoculados (B&G, Knudson e OMA) para todas as espécies, mas no OMA foi observado apenas a Estágio 2. O GI para *Hoffmannseggella* foi significativamente maior no tratamento de M65 e para o *H. jongheana* não diferiu em dois tratamentos, HJ21B e Knudson. A epífita *H. jongheana* mostrou ser menos dependente de micorrizas para a germinação e desenvolvimento de protocormos de que as rupícolas. Enfim, a metodologia de aclimação proposta também se demonstra eficaz, comprovando o desenvolvimento das plântulas em todos os tratamentos com elevadas porcentagens de sobrevivência para todas as espécies, assim como a permanência da micorrização ao longo de 7 meses de aclimatização das três espécies de orquídeas estudadas.

ABSTRACT

CUNHA, Melissa Faust Bocayuva, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2012. **Mycorrhizal association and symbiotic propagation of *Hadrolaelia* e *Hoffmannseggella* species (Orchidaceae).** Adviser: Wagner Campo Otoni, Co-advisers: Maria Catarina Megumi Kasuya e Olinto Liparini Pereira.

Three species of endangered orchids, *Hoffmannseggella caulescens*, *H. cinnabarina* and *Hadrolaelia jongheana* were selected for this study because they are key species of the current situation one of the most important hotspot in the world, the Atlantic Forest. To start an integrated conservation model of for endangered orchids, the objectives proposed in this work are to characterize morphological and molecular *Rhizoctonia*-like isolates associated with these orchids, then protocols for propagation *in vitro* *Epulorhiza* spp. and acclimatization of inoculated plants in a green house, testing alternative substrates. Through molecular and morphological characterization, 30 *Rizoctonia*-like were identified as *Epulorhiza* spp. Isolates of rupicolous *Hoffmannseggella* species represent two clades very near *Tulasnella calospora*. Isolates of *H. jongheana* are phylogenetically distant between them and to four species close to *Tulasnella* sp. Our results revealed that tropical orchids, epiphytes and rupicolous are probably generalists in their associations with mycorrhizal fungi of the genus *Epulorhiza* sp. The molecular tools have provided a more accurate identification than morphological characterization. Four *Epulorhiza* isolates promoted the germination of seeds, one (M65) promoted germination and growth rates significantly higher than the others. The seeds of all species also germinated in not inoculated treatments (B & G, Knudson and OMA), but for OMA treatment was observed only Stage 2. The GI of *Hoffmannseggella* species was significantly higher in the M65 treatment, but for *H. jongheana* in two treatments, HJ21B and Knudson, presented similar results. The epiphyte *H. jongheana* proved to be less dependent on mycorrhiza for germination and development of protocorms than rupicolous species. Finally, the proposed acclimatization methodology also demonstrates to be effective, obtaining the development of seedlings in all treatments with high percentages of survival for all species, as well as the root colonization still observed over 7 months of acclimatization of the three orchid studied.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A família Orchidaceae apresenta cerca de 25.000 espécies (Dressler, 2006) e a classificação filogenética de Angiospermas (APG III para Angiosperm Phylogeny Group III) a reconhece como monofilética na Ordem Asparagales (Chase et al., 2003).

As orquídeas ocorrem em todos continentes em ampla faixa de altitudes, no entanto, a maioria das espécies é encontrada nas regiões tropicais (Dressler, 1981; Cribb et al., 2003), o que está relacionado a biodiversidade dos hotspots (Myers, 2000). Orchidaceae é particularmente abundante em florestas tropicais aonde diversos grupos taxonômicos apresentam adaptações específicas as condições ecológicas do habitat, assim como as orquídeas epífitas (Dressler, 1981; Benzing, 1990) e intensas diversificações (Gravendeel et al., 2004).

Além disso, as orquídeas apresentam características específicas que podem resultar da sua simbiose com fungos micorrízicos (Smith & Read, 1997). Durante a frutificação apresentam grande quantidade de sementes minúsculas, “dust seed”, deficientes de recursos nutricionais para germinar (Arditti & Ghani, 2000). Portanto elas dependem da sua simbiose com os fungos para germinar e para se estabelecer no ambiente (Bernard, 1899; Leake, 1994). Os fungos simbiontes permanecem presentes nas raízes das plantas adultas, formando *pelotons* nas células corticais (Rasmussen, 1995) e, desta forma suprem as plantas com N e P em troca de carbono (Cameron et al., 2006, 2007).

Os primeiros estudos de identificação de simbiontes fúngicos se concentram nas orquídeas temperadas terrestres (Rasmussen, 1995; McCormick et al., 2004; Shefferson et al., 2005). Grande parte das espécies temperadas revela associações com os fungos *Rhizoctonia*-like (Dearnaley, 2007), um grupo polifilético de fungos composto por três grupos de basidiomicetos, a saber: Ceratobasidiaceae, Tulasnellaceae and Sebaciniales (Smith & Read, 1997; Taylor et al., 2002). Porém, poucos estudos foram realizados em regiões tropicais aonde as orquídeas, provavelmente, apresentam uma gama maior de associações com fungos devido a riqueza de espécies e à diversidade de habitat, ampliada pelo epifitismo (Zettler et al., 2003). Já se sabe que algumas orquídeas tropicais também apresentam associações com *Rhizoctonia*-like. Até o presente momento já foram identificados Ceratobasidiaceae nas raízes de nove epífitas de Porto Rico (Otero et al., 2002, 2004); além disso, Suárez et al. (2006, 2008) relata a

ocorrência de Tulasnellaceae e Sebaciniales em espécies epífitas também das floresta dos Andes do Equador. Fungos micorrízicos do grupo de ferrugem (*Attractiellales*) foram identificados em raízes de algumas espécies terrestres e epífitas na região dos Andes (Kottke et al., 2008), o que pode sugerir mais uma vez que os fungos podem ser mais diversos do que se esperava e do que se sabe para as regiões tropicais. A gama de fungos associados a orquídeas tropicais incluiu também fungos saprófitos, não *Rhizoctonia*-like, que se associam a espécies do Japão (Yamato et al., 2005; Ogura-Tsujita et al., 2009), Índia e Ilha da Réunion (Martos et al., 2009).

As teorias sobre a especificidade das associações micorríza-orquídea ainda precisam ser explorados, pois os resultados atuais sobre o assunto são controversos e as orquídeas estudadas, até então estão muito distantes geograficamente e filogeneticamente. Numa perspectiva mais ampla, as orquídeas podem se associar com fungos micorrízicos e estes, por sua vez, podem se associar com outras espécies de orquídeas, tornando a simbiose micorríza-orquídea cada vez mais complexa. Os graus de especificidade relatados entre orquídeas tropicais, autotróficas ou micoheterotróficas, podem variar muito (Mc Cormick et al., 2004; Otero et al., 2004, 2007; Suárez et al., 2006, 2008) (Martos et al., 2009; Roy et al., 2009). Todavia, o conhecimento sobre a gama de fungos micorrízicos em regiões tropicais ainda é pequeno, principalmente sobre as orquídeas africanas. Mas já está claro de acordo com dados já publicados que a simbiose permite entender um pouco mais sobre a evolução e a ecologia de uma família hiperdiversa como Orchidaceae.

Neste contexto, depara-se com grande desafio: qual é o grau de conhecimento sobre a diversidade de fungos micorrízicos de orquídeas brasileiras? já que o Brasil é um dos países mais ricos da família Orchidaceae, representada por espécies epífitas, terrestres, rupícolas, hemiepífitas e ocorre em diferentes biomas tais como florestas pluviais, estacionais e de encosta, restingas, campos rupestres, campos de altitudes, cerrados, etc (Coutinho, 2006), considerando que a falta de conhecimento da flora brasileira é especialmente preocupante frente à atual crise ambiental e estima-se que cerca de metade das espécies de plantas pode estar ameaçada de extinção (Pitman & Jorgensen, 2002; Giulietti et al., 2009).

O bioma Floresta Atlântica representa um dos 25 *hotspots* reconhecidos no planeta (Myers et al., 2000). Desta forma, mesmo sendo uma das vegetações mais ricas em orquídeas, já apresenta as maiores taxas de extinção documentadas (Cribb et al., 2003). No conceito mais abrangente, privilegiando o enfoque conservacionista, a

Floresta Atlântica é caracterizada não somente como floresta pluvial tropical, mas também como floresta pluvial mista com araucárias composta de formações associadas como as restingas, manguezais e campos de altitude (Câmara, 1991). No entanto atualmente diversas delimitações geográficas são propostas para Floresta Atlântica, como aquelas observadas em Oliveira-Filho & Fontes (2000) que consideram as florestas semidecíduais e decíduais interioranas como parte da Floresta Atlântica.

A Floresta Atlântica caracteriza-se principalmente pela riqueza em epífitos, pertencentes a táxons vasculares e avasculares (Peixoto et al., 2002). Numa escala mundial, dentre os epífitos vasculares, 80% estão concentrados em apenas quatro famílias: Orchidaceae, Bromeliaceae, Polypodiaceae e Araceae (Gentry & Dodson, 1987). Na região neotropical, Orchidaceae e Bromeliaceae constituem grupos dominantes na fisionomia do componente epifítico (Gonçalves & Waechter, 2003), sendo Orchidaceae constantemente citada como a família mais diversa da flora epifítica vascular (Waechter, 1998).

Dentre as 25.000 espécies naturais distribuídas em todo o mundo 1.779 encontram-se incluídas em algum *status* de ameaça (IUCN, 1998), o que representa aproximadamente 14 % de suas espécies ameaçadas. No Brasil são reconhecidas cerca de 2.400 espécies de Orchidaceae (Barros, 1996; Barros et al., 2012), representando quase 10 % de todas as espécies do globo, com poucos dados relacionados ao *status* de conservação de populações naturais. A destruição do *habitat* constitui um fator muito importante na extinção de espécies de Orchidaceae, mas por serem, em sua maioria, plantas ornamentais, a pressão de coleta também é um fator constante de ameaça.

O conhecimento atual para espécies ameaçadas no Brasil ainda é muito incipiente, em virtude da carência de estudos e também em função da megadiversidade brasileira. As listagens de espécies ameaçadas como instrumentos de gerenciamento e proteção da biodiversidade tiveram impulso a partir da década de 90 em todo o mundo. A Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção inclui 37 espécies de orquídeas (MMA, 2008).

A associação entre as orquídeas e os fungos micorrízicos é essencial à sobrevivência das orquídeas na natureza, auxiliando diretamente na germinação das sementes, no desenvolvimento dos embriões e na manutenção da planta adulta (Rasmussen, 1995; Dearnaley, 2007). Deste modo, é importante o desenvolvimento de estudos sobre biologia e ecologia desta associação e dos fungos micorrízicos e sobre a

aplicação destes fungos na produção simbiótica de mudas, conhecimentos estes fundamentais para desenvolver estratégias de conservação das orquídeas, dos fungos e de seus ambientes naturais (Cribb et al., 2003; Zettler et al., 2003).

Sem dúvida, o meio mais eficiente de conservar as orquídeas é pela preservação do seu habitat, mas programas de reintrodução, cientificamente embasados, podem auxiliar no restabelecimento de populações em declínio (Cribb et al., 2003). Vários estudos têm sido realizados no Brasil com intuito de conhecer a diversidade de fungos micorrízicos (Pereira et al., 2002; Pereira et al., 2003; Nogueira et al., 2005; Pereira et al., 2005^{a, b}; Pereira, 2006; Linhares, 2006; Guimarães et al., 2008; Torres et al., 2008; Pereira et al., 2009; Pereira et al., 2011; Valadares et al., 2011; Oliveira, 2012; Veloso et al., 2012) (Tabela 1). Além disso, protocolos de propagação simbiótica *in vitro* e de aclimatização de orquídeas precisam ser elaborados também para concretizar projetos de reintrodução e para auxiliar no conhecimento da especificidade dos diversos estágios desta interação fungo-planta. Recentes publicações sobre propagação simbiótica revelam que os fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza* sp. são eficientes na germinação e no desenvolvimento de plântulas de orquídeas brasileiras (Pereira et al., 2005;^c Torres et al., 2008; Pereira et al., 2011; Veloso et al., 2011; Freitas et al., 2012).

Três espécies de orquídeas em risco de extinção da Floresta Atlântica, *Hoffmannseggella caulescens* (Lindl.) H.G. Jones, *Hoffmannseggella cinnabarina* (Bateman ex Lindl.) H.G. Jones e *Hadrolaelia jongheana* (Rchb. f.) Chiron & V.P. Castro foram selecionadas para o presente trabalho por serem ícones (pois poderiam ser consideradas “espécies bandeira”) do cenário apresentado anteriormente. A fim de criar as bases de um modelo de conservação integrada para orquídeas em risco de extinção (Swarts & Dixon, 2011) (Figura 1), os objetivos propostos aqui são: fazer um levantamento prévio da riqueza e obter culturas puras de fungos micorrízicos *Rhizoctonia*-like associados a estas orquídeas; e desenvolver protocolos de propagação *in vitro* com *Epulorhiza* spp. e de aclimatização em casa de vegetação, testando substratos alternativos de plântulas micorrizadas de *Hadrolaelia jongheana*, *Hoffmannseggella caulescens* e *Hoffmannseggella cinnabarina*.

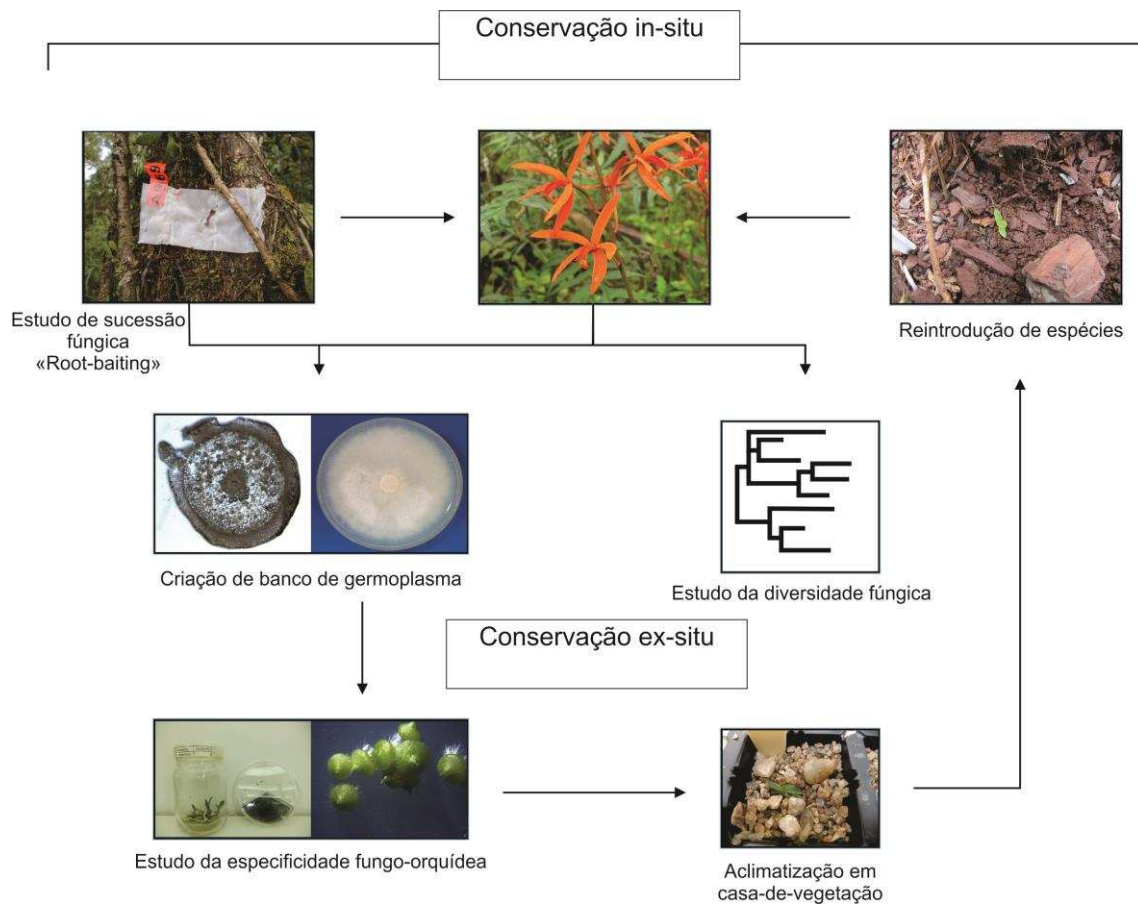


Figura1: Modelo de conversão integrada sugerido para as espécies em risco de extinção, *Hoffmannseggella caulescens*, *H. cinnabarina* e *Hadrolaelia jongheana* (Modificado a partir de Swarts 2009).

Tabela1: Levantamento de fungos micorrízcos de orquídeas brasileiras, seu respectivos hospedeiros, localidade, hábito e referências (modificado a partir de Pereira et al., 2010).

Fungos micorrízicos	Hospedeiro	Localidade	Hábito	Referência
<i>Ceratorhiza</i> sp.	<i>Prosthechea vespa</i> (Vell.) W.E. Higgins	Ouro Preto, MG	Rupícola	
<i>Ceratorhiza</i> sp.	<i>Bifrenaria tyrianthina</i> (Loudon) Rchb.f.	Nova Lima, MG	Rupícola	Nogueira (2004)
<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Epidendrum secundum</i> Jacq.	Nova Lima, MG	Rupícola	Nogueira (2004)
<i>Ceratorhiza</i> sp.	<i>Oncidium blanchetti</i> Rchb.f.	Ouro Preto, MG	Rupícola	Nogueira (2004)
<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Pleurothallis limae</i> Porto & Brade	Ouro Preto, MG	Rupícola	Nogueira (2004)
<i>Ceratorhiza</i> sp.	<i>Gomesa crispa</i> (Lindl.) Klotzsch ex Rchb.f.	Carangola, MG	Epífita	Pereira <i>et al.</i> (2005 ^b)
<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Campylocentrum organense</i> (Rchb.f.) Rolfe	Viçosa, MG	Epífita	Pereira <i>et al.</i> (2005 ^b)
<i>Ceratorhiza</i> sp.	<i>Bubophyllum</i> sp.	Viçosa, MG	Epífita	Pereira <i>et al.</i> (2005 ^b)
<i>Epulorhiza epiphytica</i>	<i>Epidendrum rigidum</i> Jacq.	Pedra do Anta, MG	Epífita	Pereira <i>et al.</i> (2005 ^c)
<i>Ceratorhiza</i> sp.	<i>Oncidium flexuosum</i> (Kunth) Lindl.	Viçosa, MG	Epífita	Pereira <i>et al.</i> (2005 ^c)
<i>Ceratorhiza</i> sp.	<i>Isochilus lineares</i> (Jacq.) R. Br.	Carangola, MG	Epífita	Pereira <i>et al.</i> (2005 ^c)
<i>Ceratorhiza</i> sp.	<i>Maxillaria marginata</i> Fenzl	Carangola, MG	Epífita	Pereira <i>et al.</i> (2005 ^c)
<i>Epulorhiza repens</i>	<i>Oeceoclades maculata</i> (Lindl.) Lindl.	Viçosa, MG	Terrestre	Pereira <i>et al.</i> (2005 ^c)
<i>E. epiphytica</i>	<i>Polystachya concreta</i> (Jacq.) Garay & H.R. Sweet	Pedra do Anta, MG	Epífita	Pereira <i>et al.</i> (2005 ^c)
<i>Ceratorhiza</i> sp.	<i>Oncidium varicosum</i> Lindl. and Paxton	Viçosa, MG	Epífita	Pereira <i>et al.</i> (2005 ^c)
<i>Ceratorhiza</i> sp.	<i>Bulbophyllum weddellii</i> (Lindl.) Rchb.f.	Nova Lima, MG	Rupícola	Nogueira <i>et al.</i> (2005)
<i>Ceratorhiza</i> sp.	<i>Oncidium gracile</i> Lindl.	Nova Lima, MG	Rupícola	Nogueira <i>et al.</i> (2005)
<i>Ceratorhiza</i> sp.	<i>Pleurothallis teres</i> Lindl.	Ouro Preto, MG	Rupícola	Nogueira <i>et al.</i> (2005)
<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Epidendrum dendrobioides</i> Thunb.	Ouro Preto, MG	Rupícola	Nogueira <i>et al.</i> (2005)
<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Sarcoglottis</i> sp.	Nova Lima, MG	Rupícola	Nogueira <i>et al.</i> (2005)
<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Sophranitis milleri</i> (Blumensch. Ex Pabst) C. Berg & M.V	Belo Vale, MG	Rupícola	Nogueira <i>et al.</i> (2005)
<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Maxillaria acicularis</i> Herb. Ex Lindl.	Ouro Preto, MG	Rupícola	Nogueira <i>et al.</i> (2005)
<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Zygopetalum makaii</i> Hook.	Araponga, MG	Rupícola	Linhares (2006)
<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Epidendrum secundum</i> Jacq.	Araponga, MG	Rupícola	Pereira (2006)
<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Oncidium</i> sp.	Araponga, MG	Rupícola	Kasuya <i>et al.</i> (2007)
<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Pleurothallis prolifera</i> Lindl.	Araponga, MG	Rupícola	Kasuya <i>et al.</i> (2007)
<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Pleurothallis teres</i> Lindl.	Araponga, MG	Rupícola	Kasuya <i>et al.</i> (2007)
<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Oncidium pirarense</i> Rchb.f.	Araponga, MG	Rupícola	Oliveira <i>et al.</i> (2008)
<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Hadrolaelia jongheana</i> (Rchb. f.) Chiron & V.P. Castro	Araponga, Itamarandiba, BA	Epífita	Torres <i>et al.</i> (2008)
<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Cattleya schilleriana</i> Rchb. f.	Camacan, BA	Epífita	Guimarães <i>et al.</i> (2008)
<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Hadrolaelia grandis</i> (Lindl. & Paxton) Chiron & V.P. Castro	Itapebi, BA	Epífita	Guimarães <i>et al.</i> (2008)
<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Hadrolaelia perrinii</i> (Lindl.) Chiron & V.P. Castro	Cantagalo, RJ	Rupícola/epífita	Guimarães <i>et al.</i> (2008)
<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Hadrolaelia tenebrosa</i> (Rolfe) Chiron & V.P. Castro	Divino São Lourenço, ES	Rupícola	Guimarães <i>et al.</i> (2008)
<i>Epulorhiza</i> sp.; <i>Opadorhiza</i> sp.	<i>Epidendrum secundum</i> Jacq.	Araponga, MG	Rupícola	Pereira (2009)
<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Hoffmannseggella cinnabarina</i> (Bateman ex Lindl.) H.G. Jones	Mariana, MG	Rupícola	Bocayuva <i>et al.</i> (2011)
<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Hoffmannseggella caulescens</i> (Lindl.) H.G. Jones	Mariana, MG	Rupícola	Veloso <i>et al.</i> (2012)

A saber: *Epulorhiza epiphytica* Pereira, Rollemberg et Kasuya; *Epulorhiza repens* (N Bernard) RT Moore.

REFERÊNCIAS

- Arditti, J. & Ghani, A.K.A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, 145(3), 367-421, 2000.
- Barros, F. Notas taxonômicas para espécies brasileiras dos gêneros *Epidendrum*, *Platystele*, *Pleurothallis* e *Scaphyglottis* (Orchidaceae). **Acta Botânica Brasilica**, 10 (1): 139-151, 1996.
- Barros, F.; Vinhos, F.; Rodrigues, V.T.; Barberena, F.F.V.A.; Fraga, C.N.; Pessoa, E.M.Orchidaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, Jardim Botânico do Rio de Janeiro (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>), 2012.
- Benzing, D.H. **Vascular epiphytes: general biology and related biota**.Cambridge: Cambridge University Press,1990.
- Bernard, N. Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. **Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances de l'Académie Des Sciences**, 128, 1253-1255, 1899.
- Câmara, I.G. **Plano de Ação para a Mata Atlântica**. São Paulo, Fundação SOS Mata Atlântica, Ed. Interação Ltda, 1991.
- Cameron, D.D.; Johnson, I.; Leake, J.R.; Read, D.J. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **Annals of Botany**, 99:831 – 834, 2007.
- 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** 171(2), 405-416, 2006.
- Chase, M.; Cameron, K.; Barrett, R.; Freudenstein, J. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barret, R.L.; Cribb, P.J. (Eds). **Orchid Conservation**, pp.69-89. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah, 2003
- Coutinho, L M. O conceito de bioma. **Acta Botanica Brasilica**, 20(1): 13-23, 2006.
- Cribb, P.J.; Kell, S.P.; Dixon, K.W.; Barret, R.L. Orchid conservation: a global perspective. In: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barret, R.L.; Cribb, P.J. (Eds). **Orchid Conservation**. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah, 2003.
- Dearnaley, J.D.W. Further advances in orchid mycorrhizal research. **Mycorrhiza**, 17:475-486, 2007.

Dressler, R.L. The orchids: natural history and classification. Cambridge: Harvar, University Press, 1981.

Dressler, R. L. How many orchid species? **Selbyana**, 26, 155-158, 2006.

Freitas, E.F.; Bocayuva, F.B.; Veloso, T.G.R.; Silva, J.A.; Oliveira, S.F.; Otoni, W. C.; Kasuya, M.C.M. **A eficiência de fungos micorrízicos de *Epulorhiza* sp. na propagação de *Hoffmannseggella caulescens* (Lindl.) H.G. Jones (ORCHIDACEAE).** In: Fertbio, Maceió A Responsabilidade Socio ambiental da Pesquisa Agrícola. 1 ed. Viçosa MG : SBCS, 2012

Gentry, A. & Dodson, C.H. Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. **Annals of Missouri Botanical Garden** 74: 205-233, 1987.

Giulietti, A.M.; Rapini, A.; Andrade, M.J.G.; Queiroz, L.P.; Silva, J.M.C. **Plantas Raras do Brasil.** Belo Horizonte: Conservação Internacional. 496 p., 2009.

Gonçalves, C.N. & Waechter, J.L. Aspectos florísticos e ecológicos de epífitos vasculares sobre figueiras isoladas no Norte da planície costeira do Rio Grande do Sul. **Acta Botânica Brasilica**, 17(1): 89-100, 2003.

Gravendeel, B.; Smithson, A.; Slik, F.J.W.; Schuitman, A. epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London.** Series B: Biological Sciences, 359, 1523-1535, 2004.

Guimarães, F.A.R.; Bocayuva, M.; Oliveira, S.F.; Torres, D.P.; Veloso, T.G.R.; Pereira, M.C.; Pereira, O.C.; Fontana, A.P.; Constantino, P.A.; Saddi, E.M.; Fraga, C.N.; Kasuya, M.C.M. Isolamento e caracterização de fungos micorrízicos de orquídeas da Mata Atlântica: *Cattleya* e *Hadrolaelia* (Orchidaceae). **Anais.** FertBio, Londrina, 2008.

IUCN. Orchidaceae. In: WALTER K.S.; H.J. GILLET (Eds.) 1997 **IUCN Red List of Threatened Plants.** IUCN- The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, 1998.

Kottke, I.; Haug, I.; Setaro S.; Suárez, J.P.; Weiß M.; Preußing, M.; Nebel, M.; Oberwinkler, F. Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest. **Applied Ecology**, 9:13-23, 2008.

Leake, J.R. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. **New Phytologist**, 127(2), 171-216, 1994.

- Linhares, D.O. **Caracterização morfológica de micorrizas de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* nativas do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro.** Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2006. 36p. (Mestrado em Microbiologia Agrícola).
- Martos, F.; Dulormne, M.; Pailler, T.; Bonfante, P.; Faccio, A.; Fournel, J.; Dubois, M.P.; Selosse, M.A. Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. **New Phytologist**, 184, 668-681, 2009
- McCormick, M.K.; Whigham, D.F.; O'Neill, J. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. **New Phytologist**, 163(2), 425-438, 2004.
- MMA. Instrução Normativa Nº 06, de 23 de Setembro de 2008. Ministério de Meio Ambiente. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/recursosflorestais/documentos/lista-oficial-de-especies-brasileirasameacadas-de-extincao/>; acesso em 4 de julho de 2012.
- Myers, N. R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B.; Kent, J. Biodiversity hot spots for conservation priorities. **Nature**, 403: 853-858, 2000.
- Nogueira, R.E. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de orquídeas.** Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2004, 36 p. (Dissertação de Mestrado).
- 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 Botanica Brasilica**, 3:417-424, 2005
- Ogura-Tsujita, Y.; Gebauer, G.; Hashimoto, T.; Umata, H.; Yukawa, T. Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 276, 761-767, 2009.
- Oliveira, S. F.; Pereira, M. C.; Guimarães, F.R.; Torres, D. P.; Bocayuva, M.; Veloso, T. G.; Pereira, O. L.; Kasuya, M.C.M. Fungos micorrízicos associados à *Oncidium pirarense* Rchb.J. que ocorrem no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, MG. Anais. FertBio, Londrina, 2008.
- Oliveira, S. F. **Diversidade de fungos micorrízicos e endofíticos associados à orquídeas ameaçadas do bioma Mata Atlântica.** Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2012, 63p. (Dissertação de Mestrado).

Oliveira-Filho, A.T. & Fontes, M.A.L.F. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, 23(4b): 793-810, 2000.

Otero, J.; Ackerman, J.; Bayman, P. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. **Molecular Ecology**, 13(8), 2393-2404, 2004.

Otero, J., Ackerman, J.; Bayman, P. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. **American Journal of Botany**, 89(11), 1852-1858, 2002.

Otero, J.; Flanagan, N.; Herre, E.; Ackerman, J.; Bayman, P. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, 94(12), 1944-1950. 451, 2007.

Peixoto, A.L.; Teixeira da Rosa, M.M.; Silva, I.M. Caracterização da Mata Atlântica. In: Sylvestre, L. da S.; Teixeira da Rosa, M.N. **Manual metodológico para estudos botânicos na Mata Atlântica**, 2002.

Pereira, M.C. 2009. **Diversidade e especificidade micorrízica em orquídeas do gênero *Epidendrum***. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2009, 151p. (Tese de Doutorado).

Pereira, M.C. **Diversidade e especificidade de fungos micorrízicos associados a *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-MG**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2006. 59 p. (Dissertação de Mestrado)

Pereira, M.C.; Torres, D.P.; Guimarães, F.A.R.; Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M. Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*. **Acta Botanica Brasilica**, 25(3): 534-541, 2011.

Pereira, O. L.; Kasuya, M.C.M. Micorrizas em orquídeas. In: Siqueira, J.O; De Souza, F. A.; Cardoso, E. J.B.N.; Tsai, S. M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Universidade Federal de Lavras. p. 583-613, 2010.

Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Borges, A.C.; Araujo, E.F. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. **Canadian Journal of Botany**, 83: 54-65, 2005^a.

Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Rollemberg, C.L.; Borges, G.M. Isolamento e identificação de fungos micorrizicos rizoctonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 29: 191-197, 2005^b.

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

Pereira, O. L.; Rollemberg, C. L.; Borges, A. C.; Matsuoka, K.; Kasuya, M.C.M. *Epulorhiza epiphytic* asp. Nov, isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. **Mycoscience**, 44:153-155, 2003.

Pereira, O.L.; Rollemberg, C.L.; Kasuya, M.C.M. Associações micorrízicas em orquídeas: perspectivas e utilização em programas de propagação simbiótica. **Orquidario**, 16:40-44, 2002.

Pitman, N.C. & Jorgensen, P. Estimating the size of the world's threatened flora. **Science** 298: 989, 2002.

Rasmussen, H.N. **Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

Roy, M.; Watthana, S.; Stier, A.; Richard, F.; Vessabutr, S.; Selosse, M.A. Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. **BMC biology**, 7, 51-68, 2009.

Shefferson, R.P.; Weiß, M.; Kull, T.; Taylor, D.L. High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. **Molecular Ecology**, 14(2), 613-626, 2005.

Smith, S.E. & Read, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**, 2nd edition. San Diego: Academic Press, 1997.

Suárez, J.; Weiß, M.; Abele, A.; Garnica, S.; Oberwinkler, F.; Kottke, I. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. **Mycological Research**, 110(11), 1257-1270, 2006

Suárez, J.; Weiß, M.; Abele, A.; Oberwinkler, F.; Kottke, I. Members of Sebaciniales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. **Mycological Progress**, 7(2), 75-85, 2008.

Swarts N.D. & Dixon K.W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Ann Bot-London**, 104: 543–559, 2009.

Taylor, D.L., Bruns, T.D., Leake, J.R. and Read, D.J. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: **Mycorrhizal Ecology**, pp.375-414. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2002

Torres, D.P.; Bocayuva, M.; Guimarães, F.A.R.; Oliveira, S.F.; Veloso, T.G.R.; Pereira, M.C.; Pereira, O.L.; Fontana, A.P.; Fraga, C.N.; Kasuya, M.C.M. Propagação simbiótica de *Hadrolaelia jongheana*. In: Anais do FertBio, Londrina, 2008.

Valadares, R.B.; Pereira, M.C.; Otero, J.T.; Cardoso, E.J. Narrow Fungal Mycorrhizal Diversity in a Population of the Orchid *Coppensia doniana*. **Biotropica**, 44: 114-122, 2012.

Veloso, T.G.R.; Bocayuva, F.B.; Oliveira, S.F.; Freitas, E.F.; Silva, J.A.; Leite, G.O.; Pereira, M.C.; Otoni, W. C.; Kasuya, M.C.M. Fungos micorrízicos de *Epulorhiza* associados à *Hoffmannseggella caulescens* (Lindl.) H.G. Jones (ORCHIDACEAE) In: Fertbio, Maceió. A Responsabilidade Sócio ambiental da Pesquisa Agrícola. 1 ed. Viçosa MG : SBCS, 2012

Waechter, J. L. Orquídeas epífitas nos Subtrópicos Orientais da América do Sul. Atas da 15ª Conferência Mundial das Orquídeas. p: 332-341, 1998..

Yamato, M.; Yagame, T.; Suzuki, A.; Iwase, K. 2005 Isolation and identification of mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum* (Orchidaceae). **Mycoscience** 46(2), 73-77; 506

Zettler, L.W.; Sharma, J.; Rasmussen, F.N. Mycorrhizal diversity. In: Dixon, K.W.; Kell, S.P.; Barrett, R.L; Cribb, P.J. (Eds). **Orchid conservation**. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah, p.205-226 , 2003.

**2. *EPULORHIZA* SP. IS THE MAIN *RHIZOCTONIA*-LIKE FUNGI
ASSOCIATED TO *HADROLAELIA JONGHEANA*, *HOFFMANNSEGGELLA*
CAULESCENS AND *H. CINNABARINA* (ORCHIDACEAE), THE
THREATENED SPECIES FROM ATLANTIC FORESTS, BRAZIL (formatação
de acordo com guia do autor da revista Mycorrhiza)**

Melissa Faust Bocayuva¹, Sabrina Feliciano Oliveira², Tomás Gomes Reis Veloso²,
Marlon Correa Pereira³, Wagner Campos Otoni¹, Maria Catarina Megumi Kasuya^{2*}

Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, Campus UFV, Viçosa, Minas
Gerais 36570-000, Brazil. ¹Departamento de Biologia Vegetal, ²Departamento de
Microbiologia e ³Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde.

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3899 2970; fax: +55 31 3899 2573. E-mail
address: mkasuya@ufv.br

Abstract

Main threats to ornamental and endangered orchids *Hadrolaelia jongheana*, *Hoffmannseggella caulescens* and *H. cinnabarina* appear to be illegal harvesting and clearing habitat. For orchid propagation and conservation we isolated some culturable mycorrhizal fungi colonized in adult roots in different habitat, *campo rupestre*, *campos de altitude*, seasonal semideciduous forests of five orchid sites. Through morphological and molecular characterization, 30 *Rizocthonia*-like isolates from the tree studied orchid were identified as *Epulorhiza* sp. Based in cultural and morphological characteristics, the 30 *Epulorhiza* isolates were binucleate and present creamy white colony, submerged growth and formed , global or ellipsoidal monilioid cells. Isolates from both rupicolous *Hoffmannseggella* species represent two clades very close to *Tulaneslla calospora*. *H. jongheana* isolates are phylogenetically different among them and close to four *Tulasnella* species from epiphytes and terrestrial orchids. In this study, molecular identification has been shown to be more accurate than morphological approaches, and we obtain mycorrhizal fungus isolates for futures symbiotic propagation essays. Our results show that tropical orchids, epiphytes and rupicolous, can be considered generalists in their associations with mycorrhizal fungi of the genus *Epulorhiza*.

Keywords: Epiphytic and rupicolous orchids, phylogeny, specificity, reintroduction, conservation.

Introduction

The current knowledge of threatened orchid species in Brazil is still scarce not only due to the lack of specific studies, but also to the mega biodiversity of orchid species. The official *red list* of Brazilian flora considers around 356 vascular plant species, which includes 34 representatives of Orchidaceae (Brasil 2008). Among 25.000 natural species distributed throughout the world, 1779 are included in some conservation status, which means that 14% of them are among endangered species (IUCN 1998). Brazil has 2.400 species of orchids (Barros 1996; Barros et al 2012), with few data related to the conservation status of natural populations. Because the distribution of these species concentrates on the Atlantic forests, especially on the Southeast region, a hotspot with less than 10% of its original range, it becomes essential to study the natural populations as well as *ex situ* conservation techniques.

The orchid species selected for this study are mentioned in two *redlist* of Brazilian flora (Brasil 2008; Drummond et al, 2008) and occur mainly in Atlantic forests of the States of Minas Gerais. *Hadrolaelia jongheana* (Rchb.f.) Van den Berg is epiphytic specie with high ornamental value and with is found in restrict geographic range. This specie was studied in two different formations of Atlantic forests: *campos rupestres* and seasonal semi-deciduous forest. In the first mentioned habitat, *H. jongheana* is mainly epiphyte in *Vellozia auriculata* Mello-Silva and Menezes, but in the seasonal semi-deciduous forest formations that specie occurs in several phorophytes. *Hoffmannseggella caulescens* (Lindl.) Van den Berg, a *campos rupestres* (*canga*) orchid, is found in large populations in private iron mining areas in Minas Gerais States. *Hoffmannseggella cinnabarina* (Bateman ex Lindl.) Van den Berg is rupicolous too, and is occurring in two *habitats*: *canga* and highland granitic rock outcrop, at the moment.

Photosynthetic mycorrhizal plants are associated with a wider range of mycorrhizal fungi than mycoheterorrophic plants (Simth and Read 2008), but some photosynthetic orchids are associated with only a single dominant mycorrhizal fungus (Shefferson et al. 2005). Three anamorphic genera of fungi, *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* and *Rhizoctonia* were described to be associated to Brazilian orchids, and *Epulorhiza* is one of more frequently cited (Pereira et al. 2003, 2005, 2009; Nogueira et al. 2005). The first report related to *Rhizoctonia*-like fungi associated to orchid occurring in the *campos rupestres* in Brazil was done by Nogueira et al. (2005) where all three anamorphic genera were isolated. *Epulorhiza* and *Ceratochiza* have been also isolated from Brazilian epiphytic orchids (Pereira et al. 2005).

Isolation and identification of mycorrhizal fungi associated to orchids are essential for conservation of species of Orchidaceae, since these data are important for the success of the symbiotic propagation and the choosing of the potential area for reintroduction of endangered species (Graham and Dearnaley 2012). Our previous work related to these three orchid species revealed through molecular identification, by direct DNA isolated from the orchid's roots, that our mycorrhizal diversity is represented by genera of Basidiomycota, like for example, *Tulasnella* and *Sebacina* (Oliveira et al. 2012).

We expect that molecular tools will be useful to revealed the richness and the specificity of mycorrhizal with rupicolous and epiphyte Brazilian orchids, through molecular characterization of pure fungal cultures. The aims of this study was to assess the biodiversity of *Rhizoctonia*-like fungi associated with *H. jongheana*, *H. caulescens* and *H. cinnabarina* and to obtain some culturable fungi that may be useful for orchid propagation and conservation.

Materials and methods

Orchid species and study sites

The three selected orchid species were two rupicolous, *Hoffmannseggella caulescens* (Lindl.) Van den Berg and *Hoffmannseggella cinnabarina* (Bateman ex Lindl.) Van den Berg, and one epiphyte, *Hadrolaelia jongheana* (Rchb.f.) Van den Berg. The nomenclature names are based on Barros et al (2012).

The root samples of orchids were sampled from five localities of Minas Gerais State, Brazil (Figure 1 and Table 1). The Serra do Brigadeiro State Park (SBSP) presents fragments of the seasonal semi-deciduous forest (Veloso et al 1991, Oliveira-Filho and Fontes 2000), the upper mountain formation (Oliveira-Filho and Ratter 1995) and highland granitic rock outcrop (*campos de altitude*) that encompass variable extensions of rock outcrops, mainly granite and gneiss rocks (Benites et al 2003). In the SBSP, *H. jongheana* root samples were collected from tree trunks in seasonal semideciduous forest of several plant species (Table 2), while *H. cinnabarina* root samples were collected from the highland granitic rock outcrop (Caiafa and Silva, 2005, 2007).

The other sampling area encompassed *campos rupestres* in the region of Ferriferous Quadrilater, which is located in Central-Southern Minas Gerais State, occupying an area of 7.000 km², of which 14.2% are iron formations. The Minas Gerais Ferriferous Quadrilater is composed of complex gneisses metamorphic rocks that form exposed ferruginous rock blocks, denominated *canga* (Viana and Lombardi 2007). *Hoffmannseggella caulescens* and *H. cinnabarina* root system samples were also collected in *campos rupestres* on *canga* in an area severely affected by mining belonging to the company Vale S.A. The third study site is the Serra Negra State Park

of Cadeia do Espinhaço of Minas Gerais (SNSP) represented by *campos rupestres* and semi-deciduous forests (transition with Cerrado).

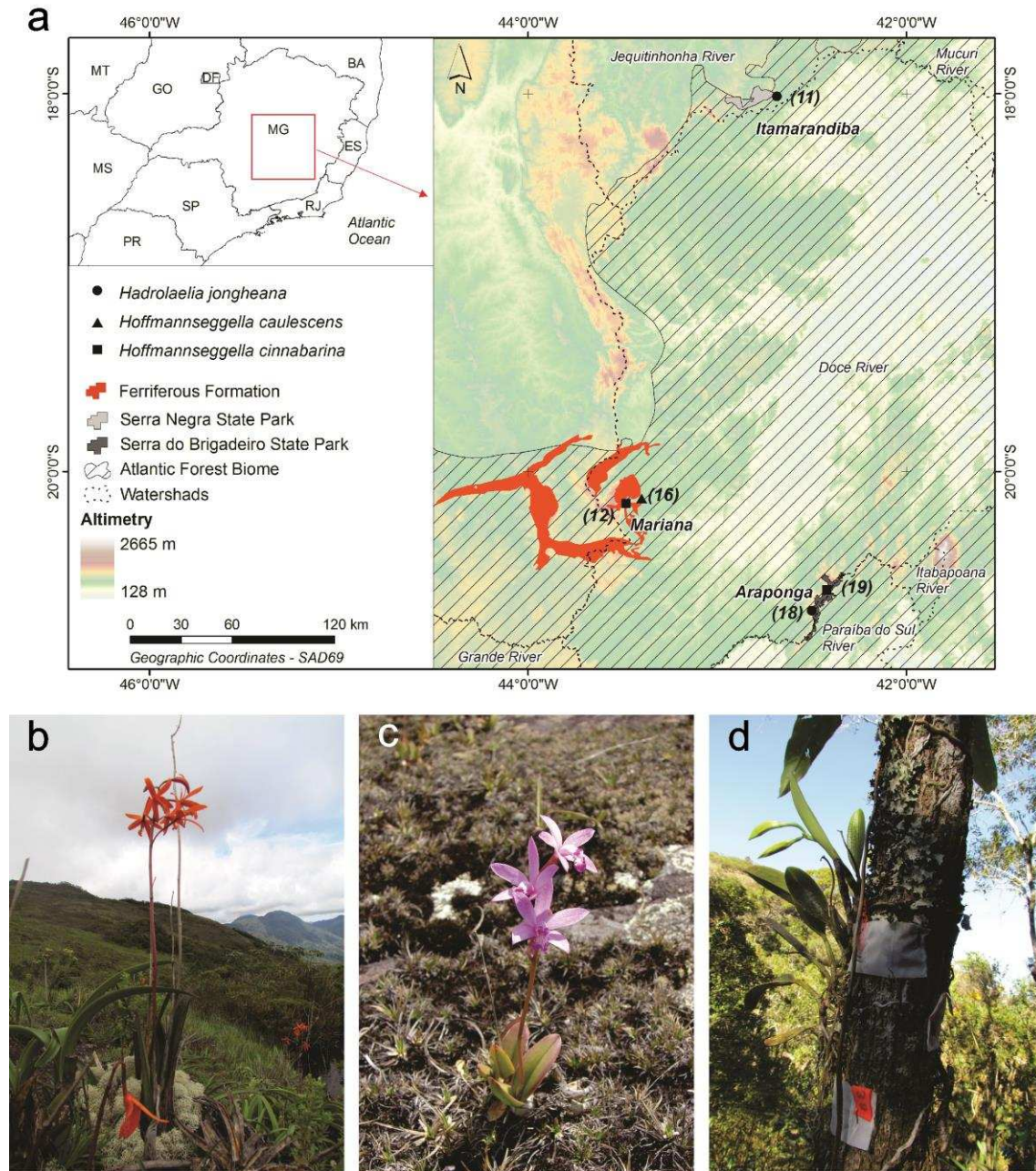


Figure 1: (a) Map showing the relative locations of the orchid populations selected for the study in Minas Gerais State, Brazil. (b) *Hoffmannseggella cinnabarina* (c) *H. caulescens* and (d) *Hadrolaelia jongheana*.

Table 1: Orchid species, habitat, location, habit, and altitude of the region, as well as the number of the isolates obtained from the samples of orchid roots were collected in the Minas Gerais state, Brazil.

Host Orchid	Habit	Location	Habitat	Altitude range	Nº of isolates
<i>H. jongheana</i>	Epiphyte	Serra do Brigadeiro State Park	Seasonal Semideciduous Forest	1200-1400	5(1*)
<i>H. jongheana</i>	Epiphyte	Serra Negra State Park	<i>Campos rupestres</i>	1400-1600	4
<i>H. caulescens</i>	Rupicolous	Minas Gerais Ferriferous Quadrilater	<i>Campos rupestres (canga)</i>	800-1200	9(1*)
<i>H. cinnabarina</i>	Rupicolous	Serra do Brigadeiro State Park	Highland granitic rock outcrop	1600-1700	(1*)
<i>H. cinnabarina</i>	Rupicolous	Minas Gerais Ferriferous Quadrilater	<i>Campos rupestres</i>	800-1200	12

* Ascomycota or ectomycorrhizal fungi isolates.

Table 2: *Hadrolaelia jongheana* phorophytes in two studied localities, Minas Gerais state, Brazil.

Locality	Phorophyte	
	Family	Specie
Serra do Brigadeiro State Park	Sapotaceae	<i>Chrysophyllum</i> sp.
Serra do Brigadeiro State Park	Cunoniaceae	<i>Lamanonia ternata</i> Vell.
Serra do Brigadeiro State Park	Asteraceae	<i>Piptocarfa</i> sp.
Serra do Brigadeiro State Park	Bignoniaceae	<i>Handroanthus</i> sp. / <i>Tabebuia</i> sp.
Serra do Brigadeiro State Park	Euphorbiaceae	<i>Sapium glandulatum</i> (Vell.) Pax
Serra do Brigadeiro State Park	Euphorbiaceae	<i>Croton floribundus</i> Spreng.
Serra do Brigadeiro State Park	Myrtaceae	<i>Calypttranthes</i> sp.
Serra do Brigadeiro State Park	Myrtaceae	<i>Myrcia</i> sp.
Serra Negra State Park	Myrtaceae	<i>Myrceugenia alpigena</i> (DC.) Landrum
Serra Negra State Park	Velloziaceae	<i>Vellozia auriculata</i> Mello-Silva & N.L. Menezes

Root sampling and Rhizoctonia-like fungal isolation

Root system samples were collected from September 2010 to January 2012. The samples were brought to the laboratory and stored under refrigeration conditions. At the laboratory the roots were surface disinfected (Stewart and Zettler 2002), hand-cut into transversal fragments. Then, under stereomicroscope, fragments containing pelotons were selected and transferred to Potato Dextrose Agar (PDA) and Corn Meal Agar (CMA) to induce monilioid cell formation at 28 °C in the dark, that characterize *Rhizoctonia*-like fungi.

Morphological characterization

The following characteristics were recorded: color (white or cream), abundance of aerial mycelia (abundant or scarce), margin, texture (cottony, smooth or velvety) and nuclear condition in colonies grow in PDA at 28 °C in the dark (Pereira et al 2005; Pereira et al 2009). Radial growth rate was estimate in CMA and PDA according to

Pereira et al (2009), each treatment was replicated three times. Cluster analyses of the quantitative data was performed by the unweighed pair-groups method algorithm (UPGMA), using GENE (Pereira et al 2009). The morphologic identification for genera was done using a dichotomous key described by Currah and Zelmer (1992).

Molecular characterization

DNA extraction and PCR amplification- The *Rhizoctonia*-like fungi isolates obtained were lyophilized for further molecular analysis. The total DNA extraction was performed using Spin Kit ® Plant Mini Invisorb (Invetec) according to manufacturer's instructions. The DNA integrity was evaluated on agarose gel 0.8% (w / v) and the measurement carried out by spectrophotometry. In order to identify, all isolates were subjected to PCR amplification using the universal primers ITS1F (Gardes and Bruns 1993) and ITS4 primers (White et al 1990) for amplify the ITS rDNA region of the fungi. The reactions were prepared according to the manufacturer's recommendations (Go Taq™, Promega, Madison, USA) and used 25 ng of DNA in each reaction. The cycling scheme was 95 °C for 2 min, followed by 39 cycles at 95 °C for 1 min, 50°C for 1 min, 72° C for 1 min and final extension step at 72 °C for 10 min. In every PCR a control including PCR mix without DNA template was include. Success of the PCR amplifications was tested in 1.5% agarose, stained in a solution of ethidium bromide 0.5µg ml⁻¹.

Sequencing and phylogenetic analyses

The positive PCR products were sequenced by Macrogen Inc., South Korea, using BigDye™ and a 3730xl Automatic 6 Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). ITS sequences were queried against GenBank, using BLASTn

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Phylogenetic analysis was performed with ITS sequences obtained and with closely related sequences that were recovered from the GenBank database. Bayesian likelihood was used to estimate the phylogenetic relationships. For the Bayesian approach, we used MrBayers 3.0 (Huelsenbeck and Ronquist 2001). MrModeltest (Nylander 2004) was used to estimate the DNA substitution models using the akaike information criterion (AIC). In this analysis, five independent runs with four Markovian Monte Carlo (MCMC) chains were turned by 10 million generations, and the trees were sampled and held at the end of the process. The first 1 million samples of trees were discarded in the burning phase, and the trees that remained were summarized to generate a consensus tree.

Results

Root sampling and Rhizoctonia-like fungal isolation

All fragments of roots of all species collected for isolation presented 5-100% of mycorrhizal colonization. The rupicolous orchid species (*H. cinnabarina* and *H. caulescens*) have a higher percentage of colonization in most cases, but it was not possible to isolate symbionts from all collected samples (Figure 3 a, b). A total of 29 samples of *H. jongheana*, 18 from PESB and 11 from PESN were analyzed. For *H. cinnabarina* a total samples were 31, being 12 from *canga* and 10 from *campos de altitude* of PESB. To *H. caulescens*, collected only in *canga*, a total of samples were 16.

Morphological characterization

The detailed morphological characteristics of the isolated fungi are presented in the Table 3. A total of 10 isolates were obtained from *H. jongheana* roots, from both sampled area, being nine *Rhizoctonia*-like fungi and only one do not present moniliod cells. From *H. cinnabarina* roots, 12 isolates of *Rhizoctonia*-like fungi were obtained

from *canga* and only one isolates of non-*Rhizoctonia*-like fungus from the *campos de altitude* of SPSB. To *H. caulescens*, sampled only in *canga*, 10 isolates, being nine *Rhizoctonia*-like and one was not.

Interestingly, all isolates belong to the genera *Epulorhiza*, which main characteristics was in this case creamy white colony and submerged growth in PDA and CMA (Ma et al 2003). Based in cultural and morphological characteristics, the 30 *Epulorhiza* isolates were binucleate (Figure 2c) and formed global or ellipsoidal monilioid cells (Figure 2d,e), but couldn't be divided in groups.

Using the quantitative characteristics distinct groups were performed among the fungi isolates from rupicolous, *H. caulescens* and *H. cinnabarina*, then from the epiphytic orchid *H. jongheana* (Figure 3), otherwise all those presented low growth rates almost significantly different (Table 3).

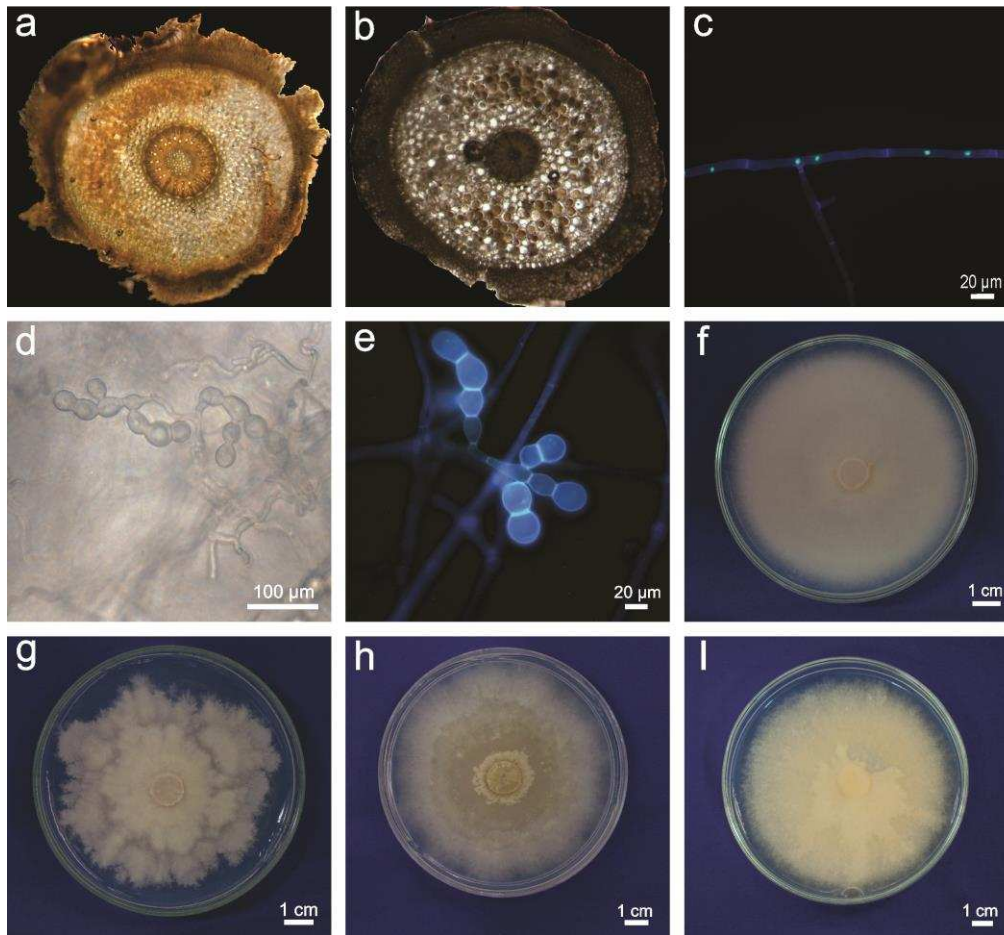


Figure 2: Orchids species mycorrhizal root colonization, cultural and morphological characteristics of *Rhizoctonia*-like isolates. **a.** Pelotons in the epiphyte adult plant root of *Hadrolaelia jongheana*. **b.** Pelotons in the rupicolous adult plant root of *Hoffmannseggella caulescens*. **c.** Binucleate nuclear condition of HB6A. **d.** Monilioid cells of young hyphae of HB1L **e.** Monilioid cells of HB2E. **f.** Colony of HB7N. **g.** Colony of HB1L. **h.** Colony of HJ15A. **i.** Colony of HC3M.

Table 3: The orchid species and *Rhizoctonia*-like fungi isolate codes, along with their qualitative and quantitative characteristic.

Orchid species	Qualitative characteristics						Quantitative characteristics		
	Isolate	Colony color	Aerial mycelia	Margin	Texture	Nuclear condition	TBDA cm/h*	TCMA cm/h*	
<i>Hoffmannseggella cinnabarina</i>	HB1B	cream	Moderated	submerged	velvety	binucleate	0,0141	e	0,0333 c
	HB1L	cream	Absent	submerged	smooth	binucleate	0,0185	i	0,0367 j
	HB2C	white	Moderated	submerged	cottony	binucleate	0,0149	i	0,0307 l
	HB2E	white	Moderated	submerged	cottony	binucleate	0,0302	e	0,0170 d
	HB6A	white	Moderated	submerged	cottony	binucleate	0,0170	c	0,0280 d
	HB6B	white	Moderated	submerged	velvety	binucleate	0,1389	i	0,0328 j
	HB6H	white	Moderated	submerged	velvety	binucleate	0,3194	b	0,2025 c
	HB7B	cream	Absent	submerged	smooth	binucleate	0,0205	b	0,0377 a
	HB7G	white	Moderated	submerged	velvety	binucleate	0,0222	a	0,0316 c
	HB7N	white	Moderated	submerged	smooth	binucleate	0,0146	d	0,0345 b
	HB7P	white	Moderated	submerged	velvety	binucleate	0,0127	e	0,0332 c
<i>Hoffmannseggella caulescens</i>	HB8A	white	Moderated	submerged	velvety	binucleate	0,0209	i	0,0330 j
	HC13D	white	Moderated	submerged	smooth	binucleate	0,0125	e	0,0263 d
	HC13E	white	Moderated	submerged	smooth	binucleate	0,0113	f	0,0289 d
	HC3B	white	Moderated	submerged	smooth	binucleate	0,0133	e	0,0133 b
	HC3E	white	Moderated	submerged	smooth	binucleate	0,0113	e	0,0289 c
	HC3H	white	Moderated	submerged	smooth	binucleate	0,0141	e	0,0326 c
	HC3I	white	Moderated	submerged	smooth	binucleate	0,0154	d	0,0344 b
	HC3M	white	Absent	submerged	smooth	binucleate	0,0189	c	0,0286 d
	HC3R	cream	Moderated	submerged	smooth	binucleate	0,0190	c	0,0321 c
<i>Hadrolaelia jongheana</i>	HC3U	white	Moderated	submerged	smooth	binucleate	0,0094	e	0,0234 b
	HJ15A	white	Moderated	submerged	velvety	binucleate	0,0205	g	0,0083 i
	HJ16AA	white	Moderated	submerged	cottony	binucleate	0,0083	g	0,0207 e
	HJ16JG	white	Moderated	submerged	velvety	binucleate	0,0125	g	0,0197 e
	HJ20B	white	Moderated	submerged	velvety	binucleate	0,0158	f	0,0220 g
	HJ20C	cream	Absent	submerged	smooth	binucleate	0,0038	h	0,0072 i
	HJ21B	white	Moderated	submerged	velvety	binucleate	0,0067	g	0,0174 f
	HJ24AC	white	Moderated	submerged	velvety	binucleate	0,0223	d	0,0115 h
	HJ24D	white	Moderated	submerged	velvety	binucleate	0,0072	f	0,0104 g
	HJ24T	white	Moderated	submerged	velvety	binucleate	0,0100	f	0,0140 g

*TBDA, growth rate determined on PDA medium; TCMA, growth rate determined on CMA medium**Means followed by same letter, in the same column, are statistically equal by Scott Knott test at 5% significance.

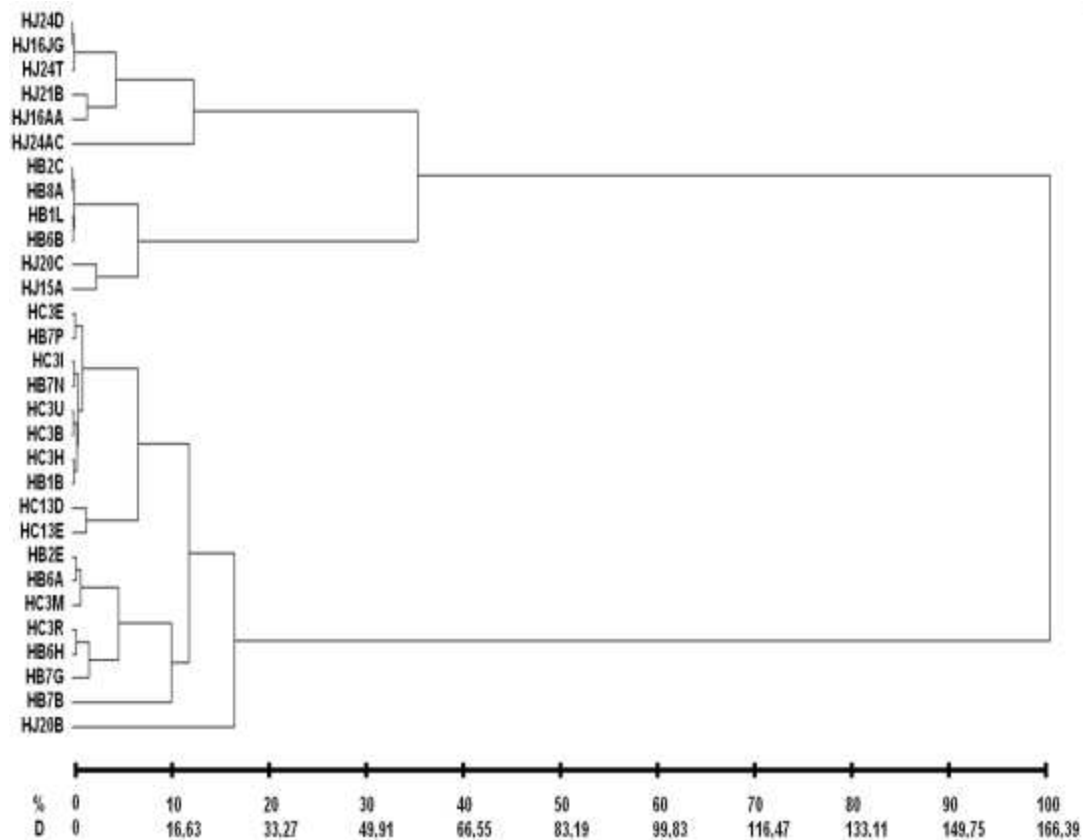


Figure 3: Cluster analysis of *Rhizoctonia*-like fungal isolates based on quantitative characteristics. Quantitative data were converted to a matrix of Mahalanobis distance and the grouping was generated using the UPGMA method. Identification of the isolates was according to Table 3.

Molecular characterization Thirty three ITS sequences related to the fungi isolates were sequenced and compared with the sequences deposited in the GenBank. The BLAST analyses showed that only three isolates were not belong to *Rhizoctonia*-like fungi. The HJ15H isolate, from *H. jongheana* was identified as an Ascomycota. The isolate HC4B, obtained for *H. cinnabarina* collected in *campos de altitude* do SBSP, was also an Ascomycota. However, the isolate HB28E, obtained from *H. caulescens* was identified as a Basidiomycota, related to a potential ectomycorrhizal fungus. So, these isolates were not used to further analyses, and were not included in to build phylogenetic trees. The other thirty isolates were identified as belong to *Epulorhiza* genus. Phylogenetic analysis of 5.8S-ITS sequences showed consistent results with distinct sequences distributed in tree clades, represented by the letter A to C that showed high support values (Figure 4). In Clades B, C there is sequences of isolates from *H. caulescens* and *H. cinnabarina*, which were collected in the same region, *canga* of Ferriferous Quadrilater. The isolates obtained from *H. jongheana* are present in the Clade A, that is distinct phylogenetically from the others. Furthermore, most of the isolates obtained are closely related with the rupicolous *Epidendrum secundum*`s fungi isolates (Figure 4), an widespread orchid specie of Brazilian Atlantic forests.

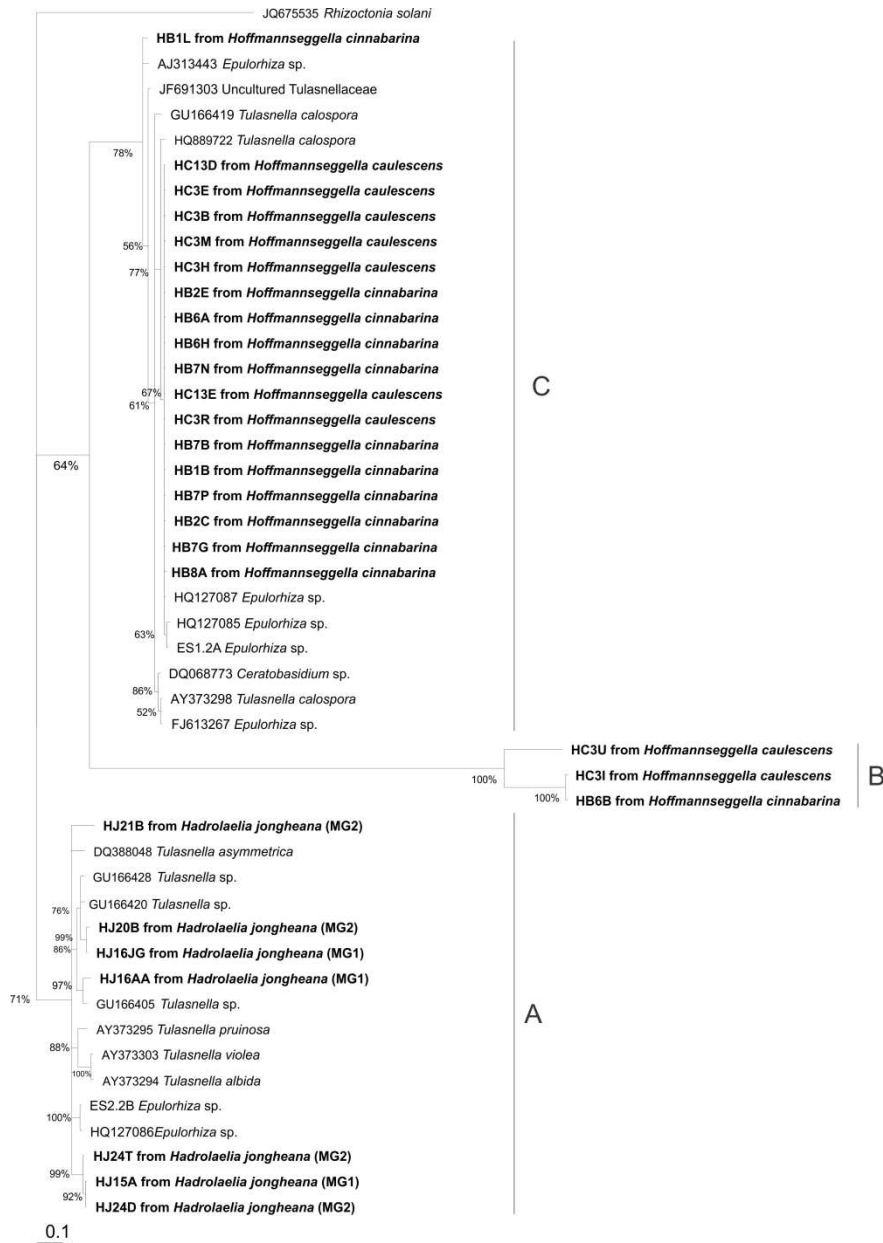


Figure 4: Phylogenetic placement of *Rhizoctonia*-like fungal isolates sequences from orchid species *Hadrolaelia jongheana*, *Hoffmannseggella caulescens*, and *Hoffmannseggella cinnabarina* by Bayesian likelihood analysis from an alignment of 5.8S-ITS. Above each branch are shown the *a posteriori* probability obtained by the method of Bayesian likelihood (only values exceeding 50% are shown). The tree was rooted with *Rhizoctonia solani*. The letters A to D refer to clades. Sample provenances: MG1 Serra do Brigadeiro State Park, MG2 Serra Negra State Park.

Discussion

In general, the molecular characterization corroborated to morphological characteristics (Figure 3), confirming that almost all fungi isolates obtained from the tree studied orchids species were identified, as belonging to the genus *Epulorhiza*, which corresponding to the teleomorph *Tulasnella*, a *Rhizoctonia*-like fungi, that are frequently isolated from mycorrhizal orchids tissues (Shimura et al 2009). Besides, our results revealed that isolates morphologically distinct (Table 1) are related to an important diversity of *Tulasnella* species (Figura 4).

It is known that orchids are able to growth in adverse environmental conditions and they might be associated to mycorrhizal fungi that tolerate these adverse conditions too. So, our data suggest that *Epulorhiza* isolates found in our work can be adapted to these stressed conditions, as observed by Bonnardeaux et al (2007), whom observed that the main mycorrhizal fungi isolates associated to *Disa bracteata* Lindl., growing in the mining region of Australia were also belonging to genus *Epulorhiza*.

Although only *Epulorhiza* have been isolated in this work, genera of *Ceratorhiza* e *Rhizoctonia* have been also isolated from orchids growing in *campos rupestres* (Nogueira et al 2005). Furthermore, in epiphytic orchids, all these three genera of *Rhizoctonia*-like fungi have been found associated (Ma et al 2003; Chen at al 2012; Graham and Dearnaley 2012; Otero et al 2002; 2004; 2007; Suárez et al 2006, 2008; Pereira et al 2003; Pereira et al 2005; Kottke at al 2008).

The qualitative and quantitative characteristics revealed an important variability of mycorrhizal fungi associated to the tree studied orchid species (Table 3; Figure 2,3). These clades includes isolates from *H. jongheana*, from two different localities, habitats (Table 1) and phorophytes of different botanic families (Table 2), showing that the mycorrhizal fungi of these orchids can be considered a widespread species. In contrast,

the fungi isolate from *H. caulescens* and *H. cinnabarina* formed other distinct clades, showing that these isolates are less specific than those associated to *H. jongheana* (Figure 3).

The first study of fungi community diversity associated to *H. jongheana*, *H. caulescens* and *H. cinnabarina*, reported not only *Rhizoctonia*-like fungi, such as *Rhizoctonia* e *Opadorhiza*, but also showed the high diversity of endophytic community of Ascomycota and Basidiomycota associated to orchids root system (Oliveira 2012). This fact corroborates with the information of three non-*Rhizoctonia*-like fungi obtained in this work.

Molecular identification has been shown to be more accurate and reliable than morphological approaches (Taylor and Bruns 1997; Bidartondo et al 2004, McCormick et al 2004; Shefferson et al 2007). The phylogenetic tree (Figure 4) revealed that the fungi isolated from *H. cinnabarina* and *H. caulescens*, collected in *canga*, are very close with the specie *Tulasnella calospora* (Clade C). This specie was proposed by Hadley (1970) to be a universal orchid symbiont due to its ability to establish *in vitro* symbiotic associations with a wide variety of orchid species. However, three isolates presented a far relative distance from others forming Clade B. These results suggested that those orchids' species are generalists in relation to their mycorrhizal fungi, being very strongly influenced by the local environmental factors, i.e., the concurrency of the genus *Epulorhiza* in region of ferriferous formations favored those orchid species to associate with fungi symbiont available in this region. In the other hand, the Clade B suggested that *H. cinnabarina* e *H. caulescens* can also be associated with other variety *Epulorhiza* fungi group that were present in those regions.

The Clade A join all isolates from *H. jongheana*, but there are phylogenetically different among them, and close to four *Tulasnella* species from epiphytes and

terrestrial orchids (Suárez et al 2006; McCormick 2004). Which may be related to the fact that epiphytic species have adapted to forests formations and *campos rupestres* with very different altitudes (Table 1), growing in phorophytes of distinct families such as Myrtaceae and Velloziaceae for example (Table 3). Besides suggesting that *H. jongheana* is generalist in relation to mycorrhizal fungi association, it can be seen that some isolates very close are from different regions suggesting that these *Rhizoctonia*-like fungi present a large geographic distribution.

Terrestrial orchids are notable for their obligate, often specific relationship with mycorrhizal fungi (Phillips et al 2011). In epiphytic orchids, fungal specificity has also been recorded by Otero et al (2002) and Graham and Deanarley (2011) who showed that in *Ionopsis utricularioides* (Swartz) Reinchenbach f. and in *Sarcochilus weinthalii* (F.M. Bailey) Dockrill were restricted to a single *Ceratobasidium* clade and to a single species of the genus, respectively. But our results show that tropical orchids can be considered generalists in their associations with mycorrhizal fungi of the genus *Epulorhiza*. It is also evident a distinct group between those isolated from rupicolous (Clade B and C) and epiphytic ones (Clade A) (Figure 4), which is also observed by morphological characteristics (Figure 3). The diversity of this association seems to be influenced by the factors inherent to the sites that these plants inhabit. The isolates obtained in this study, such as the isolates closely related to *Tulasnella calospora*, may be useful for *H. cinnabarina* and *H. caulescens* symbiotic propagation and conservation from *canga*. In addition, the fungal symbionts analyzed showed a wide distribution, being present in disturbed and undisturbed areas, establishing associations with epiphytic, rupicolous and terrestrial orchids.

In summary, molecular studies of orchids endophytic fungi have typically focused on terrestrial orchid species (Bougoure et al 2005; Irwin et al 2007; Roy et al

2009). Recently, molecular studies from some epiphytic orchids have been carried out in Australia (Gowland et al 2007), Brazil (Pereira et al 2003; 2005; Guimarães et al 2008; Torres et al 2008), Ecuador (Suárez et al 2006; 2008), Puerto Rico (Otero et al 2002, 2004) and Singapore (Ma et al 2003). But there are three main growth form for orchids (Graham and Dearnaley 2011), terrestrials, lithophytes or rupicolous and epiphytes, but the interaction mycorrhiza - rupicolous orchid is still underexplored. However, it is noteworthy that a large diversity of fungi species, *Cerathoriza*, *Epulorhiza*, *Opadorhiza* and *Rhizoctonia*, has been revealed to rupicolous Brazilian orchids (Oliveira 2012; Nogueira et al 2005, Pereira et al 2009), represented here by gender *Hoffmannseggella* that is endemic to southeastern Brazil, enriching the discussion on the symbiotic association of the Orchidaceae family. Then we can consider that the rupicolous species follow a similar pattern symbiosis of epiphytic species as they are associated with more than one *Rhizoctonia*-like species in different rock formations (campos rupestres), *canga*, granite and quartzite.

Finally we have examined the mycorrhizal associations of tree endangered Atlantic Forests orchids at five sites in Minas Gerais state, Brazil. Analysis of DNA *in planta* (Oliveira 2012) and from isolated fungal cultures revealed how important are both techniques for biodiversity evaluation of orchid symbionts. This *Epulorhiza* isolates can be used in future *ex situ* and *in situ* conservation procedures for these orchids.

Acknowledgments

We thank to CORES Project, BIOMA Meio Ambiente and IEF for field trips support. To Dr. Bruno Araujo Furtado de Mendonça for mapping samples. This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and American Orchid Society (AOS).

References

- Barros F, de Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN, Pessoa EM (2012). Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000179>.
- Barros F (1996) Notas taxonômicas para as espécies brasileiras dos gêneros *Epidendrum*, *Platystele*, *Pleurothallis* e *Scaphyglottis* (Orchidaceae). Acta Bot Bras 10:139-151. doi:10.1590/S0102-33061996000100011
- Benites VM, Caiafa AN, Mendonça ES, Schaefer CE, Ker JC (2003) Solos e vegetação nos complexos rupestres de altitude da Mantiqueira e do Espinhaço. R Flor Amb 10:76-85. doi:10.1590/S0100-84042011000200012
- Bidartondo MI, Burghardt B, Gebauer G, Bruns TD, Read DJ (2004) Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaison between forest orchids and trees. Proc R Soc Lond B 271:1799-1806. doi: 10.1098/rspb.2004.2807
- Bonnardeaux Y, Brundrett M, Batty AL, Dixon KW, Koch J, Sivasithamparam K (2007) Diversity of mycorrhizal fungi of Western Australian terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships, and alien invasions. Mycol Res 111: 51-61. doi:10.1016/j.mycres.2006.11.006,

Bougoure JJ, Bougoure DS, Cairney JWG, Dearnaley JDW (2005). ITS RFLP and sequence analysis of endophytes from *Acianthus*, *Caladenia* and *Pterostylis* (Orchidaceae) in southeastern Queensland. Mycol Res 109, 452-460. doi:10.1017/S095375620500225X

Brasil (2008) Instrução Normativa Nº 06, de 23 de Setembro de 2008. Ministério de Meio Ambiente. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/recursosflorestais/documentos/lista-oficial-de-especies-brasileirasameacadas-de-extincao>; acesso em 4 de outubro de 2012.

Caiafa AN, Silva AF (2005) Composição florística e espectro biológico de um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais – Brasil. Rodriguésia 56:163-173.

Caiafa AN, Silva AF.(2007) Structural analysis of the vegetation on a highland granitic rock outcrop in southeast Brazil. Rev Bras Bot 30:657-664. doi.org/10.1590/S0100-84042007000400010

Chen J, Wang H. Guo, SX (2012) Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae). Mycorrhiza 22: 297-307. doi:10.1007/s00572-011-0404-0

Currah RS, Zelmer CD (1992) A key and notes for the genera of fungi mycorrhizal with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. Rep Tottori Mycol Inst 30:43-59.

Drummond GM, Machado CS, Martins MP, Stehmann JR (2008) Listas vermelhas das espécies da fauna e da flora ameaçadas de extinção em Minas Gerais. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas. CD-Rom.

Gowland KM, Mathesius U, Clements MA, Nicotra AB (2007) Understanding the distribution of three species of epiphytic orchids in temperate Australian rainforest by investigation of their host and fungal associates. Lankesteriana 7:44-46

Graham RR, Deanarley JDW. (2012) The rare Australian epiphytic orchid *Sarcochilus weinthalii* associates with a single species of *Ceratobasidium*. Fungal Divers 54:31-37. doi:10.1007/s13225-011-0106-0

Hadley G (1970) Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. New Phytol 69: 1015-1023. doi:10.1111/j.1469-8137.1970.tb02481.x

Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics 17:754–755. doi: 10.1093/bioinformatics/17.8.754

Irwin MJ, Bougoure JJ, Dearnaley JDW (2007). *Pterostylis nutans* (Orchidaceae) has a specific association with two *Ceratobasidium* root associated fungi across its range in Eastern Australia. Mycoscience 48: 231-239. doi: 10.1007/s10267-007-0360-x

IUCN. Orchidaceae. In: WALTER KS, GILLET HJ (Eds.) (1997). IUCN Red List of Threatened Plants. IUCN- The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, 1998.

Kottke I, Haug I, Setaro S, Suárez JP, Weiß M, Preußing M, Nebel M, Oberwinkler F (2008) Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest. Basic Appl Ecol 9:13-23.

Ma M, Tan TK, Wong SM (2003) Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids. Mycol Res 107: 1041-1049. doi.org/10.1017/S0953756203008281

McCormick MK, Whigham DF, O'Neill J (2004). Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. New Phytol 163: 425-438. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01114.x

Nogueira RE, Pereira OC, Kasuya MCM, Lanna MC, Mendonça M (2005) Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na Região do Quadrilátero

Ferrífero, Minas Gerais, Brasil. Acta Bot Bras 3: 417-424. doi.org/10.1590/S0102-33062005000300001.

Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Oliveira-Filho AT, Ratter JA (1995) A study of the origin of Central Brazilian Forests by the analysis of plant species distribution patterns. Edinburg J Bot 52: 141-194

Oliveira Filho AT, Fontes MAL (2000) Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. Biotropica 32:793-810. doi:10.1111/j.1744-7429.2000.tb00619.x

Oliveira SF (2012) Diversidade genética de fungos micorrízicos associados às orquídeas. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2012, 63p. (Dissertação de Mestrado).

Otero JT, Ackerman JD, Bayman P (2002) Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. Am J Bot 89:1852-1858. doi:10.3732/ajb.89.11.1852

Otero JT, Ackerman JD, Bayman P (2004). Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. Mol Ecol 13: 2393-2404. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02223.x

Otero JT, Flanagan NS, Herre EA, Ackerman JD, Bayman P (2007). Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). Am J Bot 94: 1944-1950. doi:10.3732/ajb.94.12.1944

Pereira MC, Pereira OL, Costa MD, Rocha RB, Kasuya MCM (2009) Diversity of mycorrhizal fungi *Epulorhiza* spp. Isolated from *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Rev Bras Cienc Solo 33: 1187–1197. doi.org/10.1590/S0100-06832009000500012

- Pereira MC, Torres DP, Guimarães FAR, Pereira OL, Kasuya MCM (2011) Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*. Acta Bot Bras 25(3): 534-541.
- Pereira OL, Rollemberg CL, Kasuya MCM (2002) Associações micorrízicas em orquídeas: perspectivas e utilização em programas de propagação simbiótica. Orquidario 6:40-44.
- Pereira OL, Rollemberg CL, Borges AC, Matsuoka K, Kasuya MCM (2003) *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. Mycoscience 44:153–155. doi:10.1007/s10267-002-0087-7
- Pereira OL, Kasuya MCM, Borges AC, Araújo EF (2005a) Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. Can. J. Bot. 83:54-65. doi: 10.1139/b04-151
- Pereira OL, Kasuya MCM, Rollemberg CL, Borges GM (2005b) Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. Rev Bras Cienc Solo 29:191-197. doi.org/10.1590/S0100-06832005000200004
- Phillips RD, Barrett MD, Dixon KW, Hopper SD (2011) Do mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids? J Ecol 99:858–869. doi:10.1111/j.1365-2745.2011.01797.x
- Roy M, Watthana S, Stier A, Richard F, Vessabutr S, Selosse MA (2009) Mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. BMC Biology 7: 51. doi:10.1186/1741-7007-7-51
- Shefferson R P, Taylor DL, Weiss M, Garnica S, McCormick MK, Adams S, Gray HM, McFarland JW, Kull T, Tali K, Yukawa T, Kawahara T, Miyoshi K, Lee YL (2007) The

evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. *Evolution* 61: 1380-1390

Shefferson RP, Weiß M, Kull T, Taylor DL (2005) High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Mol Ecol* 14: 613–626. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02424.x

Shimura H, Sadamoto M, Matsuura M, Kawahara T, Naito S, Koda Y (2009) Characterization of mycorrhizal fungi isolated from the threatened *Cypripedium macranthos* in a northern island of Japan: two phylogenetic distinct fungi associated with the orchid. *Mycorrhiza* 19:525-534. doi.org/10.1007/s00572-009-0269-7

Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London.

Stewart SL, Zettler LW (2002) Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratilis*) from Florida. *Aquatic Bot.* 72:25-35.

Suárez JP, Weiss M, Abele A, Garnica S, Oberwinkler F, Kottke I (2006) Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycol Res* 110: 1257-1270. doi.org/10.1016/j.mycres.2006.08.004

Suárez JP, Weiss M, Abele A, Oberwinkler F, Kottke I (2008) Members of Sebaciniales subgroup B form mycorrhizas with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycol Prog* 7: 75-85. doi:10.1007/s11557-008-0554-4

Taylor DL, Bruns TD (1997) Independent, specialized invasion of ectomycorrhizal mutualism by two non- photosynthetic orchids. *Proc Nat Acad Sci USA* 94: 4510-4515.

Torres DP, Bocayuva M, Guimarães FAR, Oliveira SF, Veloso TGR, Pereira MC, Pereira OL, Fontana AP, Fraga CN, Kasuya MCM (2008) Propagação simbiótica de *Hadrolaelia jongheana*. In: FertBio, 2008, Londrina. Anais do FertBio 2008.

Veloso HP, Rangel Filho AL, Lima JCA (1991) Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro.

Viana PL, Lombardi JA (2007) Florística e caracterização dos campos rupestres sobre canga na Serra da calçada, minas gerais, Brasil. *Rodriguésia* 58:159-177.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (eds). Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ Academic Press, Inc., New York, pp. 315-322.

3 EFFICIENCY OF *Epulorhiza* SPP. ON *IN VITRO* SEED GERMINATION OF *Hadrolaelia* AND *Hoffmannseggella* SPECIES (ORCHIDACEAE) (formatação de acordo com guia do autor da revista da Plant Cell, Tissue and Organ Culture)

Melissa Faust Bocayuva¹, Tomás Gomes Reis Veloso², Emiliane Fernanda Freitas²
Sabrina Feliciano Oliveira², Wagner Campos Otoni¹, Maria Catarina Megumi Kasuya^{2*}

Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, Campus UFV, Viçosa, Minas Gerais 36570-000, Brazil. ¹Departamento Biologia Vegetal and ²Departamento de Microbiologia.

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3899 2970; fax: +55 31 3899 2573. E-mail address: mkasuya@ufv.br

Abstract

Brazilian orchid's symbiotic propagation essays using *Epulorhiza* isolates have been developed, confirming the efficiency of *Rhizoctonia*-like during germination and seedlings development. The aim of the present work is to clarify the specificity of mycorrhizal association and to develop an efficient *in vitro* seed germination protocol, with four *Epulorhiza* isolates, of *Hadrolaelia jongheana*, *Hoffmannseggella caulescens* and *Hoffmannseggella cinnabarina*. HC3E, M65 and HB2E are phylogenetically related, but they are not similarly efficient. The *Epulorhiza* isolates tested supported seed germination, but only one (M65) supported an important further protocorm development. The seeds non inoculated treatments (B&G, Knudson and OMA) also germinated, but in OMA medium reached only Stage 2 for the tree orchid species. *H. jongheana* seeds were observed in Stage 5 in Knudson treatment, and *H. cinnabarina* in B&G treatment reached Stage 5. The seedlings growing in inoculated treatments presented higher macronutrients content, then those nutrients media, Knudson and B&G Orchidées, confirming the crucial role of mycorrhizal. Differences among the tree studied orchids in the GI of seedlings were similar to differences in percent seed germination. The GI for the *Hoffmannseggella* species was significantly higher in M65 treatment and the GI for the *H. jongheana* did not differ significantly between M65 and HJ21B treatments and Knudson. The epiphyte *H. jongheana* showed to be less dependent on mycorrhiza for germination and protocorm development than the rupicolous orchids *H. caulescens* and *H. cinnabarina*, since the performance of germination and development seems similar in all culture media, independent of the presence of the mycorrhizal fungi.

Keywords: Atlantic forests, threatened orchids, specificity, filogeny, reintroduction, conservation.

Introduction

In nature, most orchids seeds cannot germinate, or can imbibe, but will not develop unless they are colonized with the compatible mycorrhizal fungi, which supply young plants with carbon and inorganic nutrients (Brundrett et al. 2003; McKendrick et al. 2000, 2002; Swarts and Dixon 2009; Wright et al. 2009). Some orchid is also dependent on the mycorrhizal association even as in the adult phase, showing the importance to consider mycorrhizal association during orchid seedlings production, mainly when they were used in reintroduction program.

The orchid propagation is necessary and important to increase the population of plant species before transferal to natural habitats (Chutima et al. 2011), considering, mainly, the rare status of some orchids in the wild and the threatened status of its natural habitat, it is necessary to development the efficient protocols of symbiotic seed germination, otherwise the species may not exist as an independent entity in its natural habitat for long.

Recently, some symbiotic propagation works using *Epulorhiza* spp. mycorrhizal fungi have been developed, which have confirmed how efficient are the *Rhizoctonia*-like fungi during germination and seedlings development for Brazilian orchids species (Pereira et al. 2005, 2011; Veloso et al. 2011; Torres et al. 2008).

The use of molecular techniques for fungal identification associated to symbiotic germination studies provides a powerful tool for investigate the concept of ecological specialization in the orchid mycorrhizal association (Swarts et al. 2010).

In the current study, these tools was used to clarify the specificity of mycorrhizal association and an efficient *in vitro* seed germination protocol for *Hadrolaelia jongheana*, *Hoffmannseggella caulescens* and *Hoffmannseggella cinnabarina* using *Epulorhiza* isolates as fungal mycobionts is described.

Materials and methods

Seed source and sterilization

Mature capsules of *Hoffmannseggella caulescens* (Lindl.) Van den Berg and *Hoffmannseggella cinnabarina* (Bateman ex Lindl.) Van den Berg were collected in the nursery Mina da Alegria, belong to Vale S.A. (Mariana, MG) and *Hadrolaelia jongheana* (Rchb.f.) Van den Berg in Serra Negra State Park (Itamarandiba, MG). They were kept in a desiccator with silica gel in the Laboratory of Mycorrhizal Associations/Department of Microbiology - BIOAGRO/UFV. The seeds were taken from the mature capsules and placed in Becker flask containing a sodium hypochlorite (NaClO) solution 2% of active chloride for 10 min, for surface disinfection. A sieve, 64 mesh, was used to perform tree washes with autoclaved distilled water.

Molecular fungi identification

Four *Epulorhiza* isolates, belongs to the culture collection of Laboratory of Mycorrhizal Associations/Department of Microbiology - BIOAGRO/UFV (Table 1) were selected to seed germination experiments. The isolates maintained in rice grains at -80 °C were reactivated in Potato Dextrose Agar (PDA), in Petri dish and incubated at 28 °C for seven days. The fungal isolates were grown in PDB or obtaining mycelium for later molecular analysis. After growth, the mycelium was collected and lyophilized and stored under refrigeration.

DNA extraction and PCR amplification

The total DNA extraction of four isolates was performed using Spin Kit ® Plant Mini Invisorb (Invetec) according to manufacturer's instructions. The DNA integrity was evaluated on agarose gel 0.8% (w / v) and the measurement carried out by

spectrophotometry. In order to identify, the isolates were subjected to PCR amplification using the universal primers ITS1(Gardes and Bruns 1993) and ITS4 primers (White et al. 1990) for amplify the ITS rDNA region of the fungi. The reactions were prepared according to the manufacturer's recommendations (Go Taq™, Promega, Madison, USA) and used 25 ng of DNA in each reaction. The cycling scheme was 95 °C for 2 min, followed by 39 cycles at 95 °C for 1 min, 50°C for 1 min, 72° C for 1 min and final extension step at 72 °C for 10 min. In every PCR a control including PCR mix without DNA template was include. Success of the PCR amplifications was tested in 1.5% agarose, stained in a solution of ethidium bromide 0.5µg ml⁻¹.

Sequencing and phylogenetic analyses

The positive PCR products were sequenced by MacroGen Inc., South Korea, using BigDye™ and a 3730xl Automatic 6 Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). ITS sequences were queried against GenBank, using BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Phylogenetic analysis was performed with four ITS sequences obtained and with closely related sequences that were recovered from the GenBank database. Bayesian likelihood was used to estimate the phylogenetic relationships. For the Bayesian approach, we used MrBayes 3.0 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). MrModeltest (Nylander, 2004) was used to estimate the DNA substitution models using the akaike information criterion (AIC). In this analysis, five independent runs with four Markovian Monte Carlo (MCMC) chains were turned by 10 million generations, and the trees were sampled and held at the end of the process. The first 1 million samples of trees were discarded in the burning phase, and the trees that remained were summarized to generate a consensus tree. The ITS region sequences obtained in the present study were submitted to GenBank under accession numbers.

Table 1: *Epulorhiza* fungi isolated from orchids mature plants and used in symbiotic seed germination.

Isolate	Host	Habit	Locality	Habitat
M65*	<i>Epidendrum secundum</i> Jacq.	Rupicolous	Araponga, Serra do Brigadeiro State Park	<i>campos de altitude</i>
HJ21B**	<i>Hadrolaelia jongheana</i> (Rchb. f.) Chiron	Epiphyte	Araponga, Serra do Brigadeiro State Park	Seasonal Semideciduous Forest
HC3E**	<i>Hoffmannseggella caulescens</i> (Lindl.) H.G. Jones	Rupicolous	Mariana, Mina de Alegria	<i>campo rupestre</i> (canga)
HB2E**	<i>Hoffmannseggella cinnabarina</i> (Bateman ex Lindl.) H.G. Jones	Rupicolous	Mariana, Mina de Alegria	<i>campo rupestre</i> (canga)

*Pereira et al. 2011 and ** Bocayuva et al unpublished.

Symbiotic fungi survey

After seed disinfection, they were kept in aqueous suspension, under stirring, and 1000 mL aliquots of the suspension of seeds, containing c.a. 100 seeds, were distributed on the surface of 25 mL of OMA (Oat meal agar). After that, one block of 1 cm² agar containing fungal mycelium were removed from the PDA cultures and inoculated in the center of these Petri dish. It was also performed three control treatments (uninoculated) with the following media: Knudson (Sigma), B&G Orchidées (Brazil) and OMA. The experiment was performed in five replicates, considering each Petri dish as on replication. All treatments were kept in a growth chamber at the Laboratory of Tissue Culture/Department of Microbiology - BIOAGRO/UFV at 26 ± 2 °C and a photoperiod adjusted 16h/8h (light/dark).

Germination scoring and statistical analysis

The evaluation of the different Stage s of development was done at 3, 5 and 8 weeks bringing the Petri dishes under stereomicroscope (Olympus SZ40). Germination and developmental Stage s were rated on a scale of 0–5: Stage 0 = no germination

(testa intact); Stage 1 = embryo swollen, rhizoids presents (=germination); Stage 2 = rupture of testa by enlarging embryo; Stage 3 = appearance of protomeristem; Stage 4 = emergence of first leaf; Stage 5 = elongation of first leaf and further development (Stewart and Zettler 2002). The percentages of each development Stage were calculated by dividing the number of observations in each Stage by the total number of viable seeds in the sample. A standardized growth index (GI), modified by Otero et al (2004), was calculated by the following formula:

$$GI = \frac{N0 + N1 \times 1 + N2 \times 2 + N3 \times 3 + N4 \times 4 + N5 \times 5}{N0 + N1 + N2 + N3 + N4 + N5}$$

Where N0 is the number of seeds at Stage 0, N1 is the number of seeds at Stage 1, etc.

The average seed germination into each Stage and the GI were used as dependent variable for comparison using Duncan's test, considering a significance level of 5%. All statistical analysis of data was realized in program SAEG 9.0.

Seedlings at Stage 5 were transferred into a culture vessel containing OMA. To verify that the mycorrhizal association, a random sample of seedling roots was removed at end of the experiment, sectioned and examined for the presence of the pelotons (intracellular coils of fungal hyphae, typical of orchid mycorrhizae).

Nutritional supply

This procedure was carried out in Soil and Plant Analysis Laboratory / Department of Soils-UFV. For understanding the nutritional role of mycorrhizal fungi associated with orchid seedlings of *H. jongheana* from three asymbiotic treatments (OMA, B&G and Knudson), and one symbiotic treatment (OMA + fungi M65), and incubated at 26 ± 2 °C and photoperiod set at 16h light / 8h dark, for 80 days, were used.

The role seedlings were air dried, and the nutrients contents in the tissues of seedlings were determined after nitric-perchloric digestion (3:1). The Ca, Mg and S were analyzed by optical emission spectrometry coupled to plasma. Phosphorus was analyzed by colorimetry, using the modified method of Vitamin C (Braga & Defilipo, 1974) and K by flame photometry. The analysis was performed with one sample consisting of 20 single samples for each treatment.

Results

Fungal mycobionts

The four *Epulorhiza* spp. isolates used in the experiments of germination of three studied orchid species were isolated from themselves and from *E. secundum*, rupicolous specie. HC3E and HB2E isolates species of rupicolous *Hoffmannseggella* species are very close and in turn highly related to M65 (Figure 1). However the HJ21B isolate of the epiphytic specie *H. jongheana* was too far from those and presenting a greater resemblance to an isolated Cantharellales, só HJ21B is close to *Rhizoctonia*. Even though HC3E, M65 and HB2E are phylogenetically related, they are not similarly efficient in germination and seedling development of orchids.

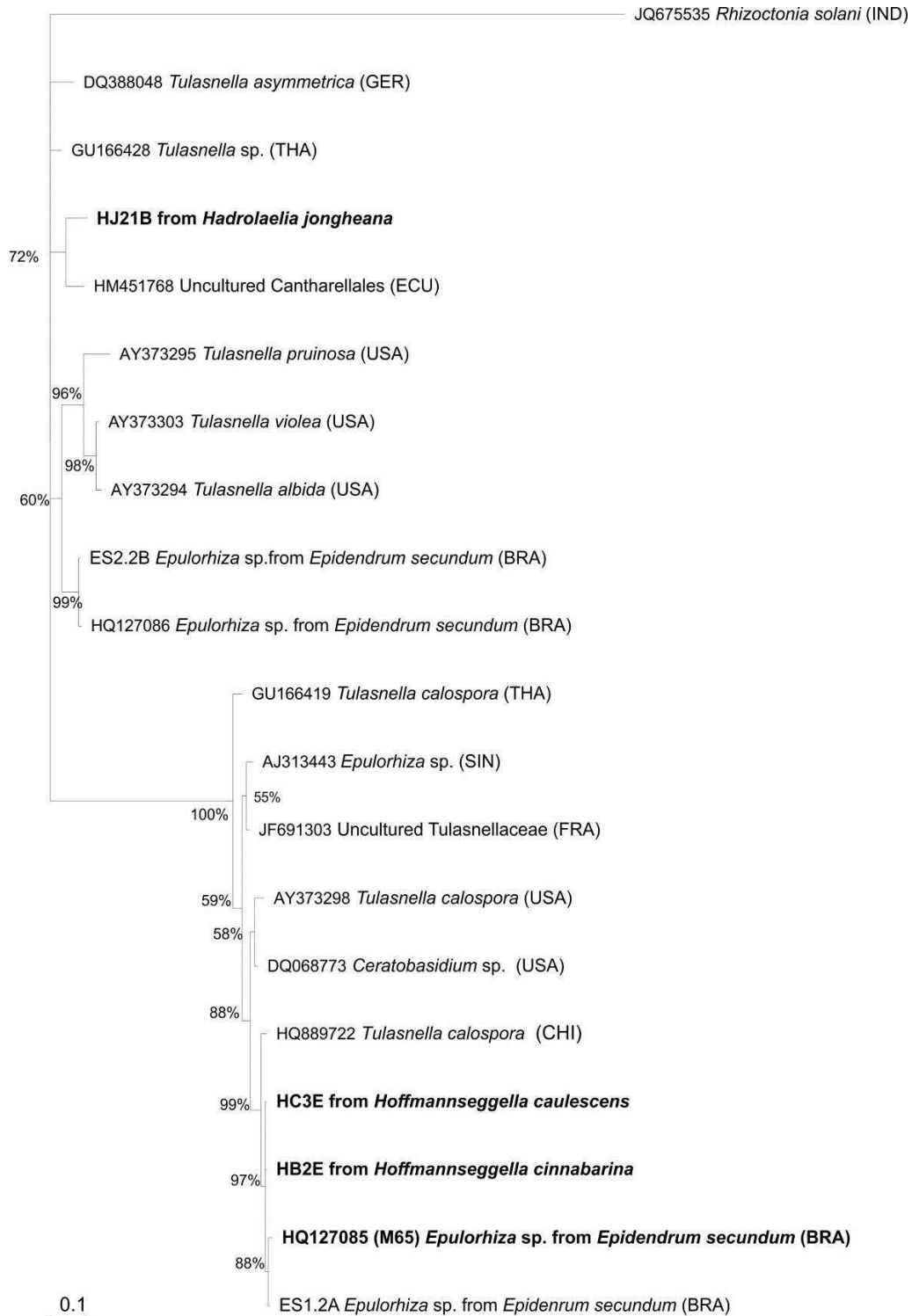


Figure 1: Phylogenetic placement of *Tulasnella* sequences from orchid species by Bayesian likelihood analysis from an alignment of 5.8S-ITS/LSU. Above each branch are shown bootstrap values generated by Maximum Likelihood and branch support Bayesian Markov chain Monte Carlo analysis (only values exceeding 50% are shown).

Symbiotic seed germination and GI

Seeds began to swell within 20 days after sowing, and germination commenced within 3 weeks. Visual contamination rate of cultures was 20%. The four *Epulorhiza* isolates tested (HC3E, HB2E, HJ21B, M65) supported seed germination (Stage 2), but only M65 supported an important further protocorm development. The seeds without fungi (control treatments) also germinated, but in OMA medium reached only Stage 2 for the tree orchid species. *H. jongheana* seeds were observed in Stage 5 in Knudson treatment, and *H. cinnabarina* in B&G treatment reached Stage 5.

At 30th days, all symbiotic treatments, in the tree orchid's species supported Stage 2 and when inoculated with M65, they reach the Stage 3 (Figure 2). In the non-inoculated controls, for *H. jongheana* the Stage 4 was observed for Knudson and the Stage 3 for B&G. The cultures of *H. caulescens* presented only the Stage 2 and for *H. cinnabarina* the protomeristem had developed in Knudson and B&G media. After 50 days *H. caulescens* symbiotic culture, the Stage 3 was observed only in HC3E and M65 treatments, but the last one reached already the Stage 4 (Figure 2d, e; Figure 3b). At the same time, for *H. cinnabarina* all symbiotic treatments reached Stage 5, except with the isolate HJ21B (Figure 3c). Seeds co-cultured with M65 after 80 days reached the highest rates for Stage 5 for all studied orchids (Figure 4). For *H. jongheana*, symbiotic treatments reached Stage 5, M65 and HJ21B had a better seedling development performance (Figure 4a). The Stage 5 for *H. caulescens* was observed only with the isolates M65 and HC3E (Figure 4b). And for *H. cinnabarina* the Stage 5 was observed for M65, HB2E and HC3E treatments (Figure 4c). At 80th day, in Knudson medium, the Stage 5 was only observed for *H. jongheana* and *H. cinnabarina* (Figure 4a,c). At this same time, the non-inoculated treatments, Knudson and B&G for *H. caulescens* reached only the Stage 4 (Figure 4b).

At 50th Stage 5 percentages rates are significantly different in M65 treatment for *H. caulescens* and *H. cinnabarina*, otherwise for *H. jongheana* M65 and HJ21B treatments are equals (Figure 3). The same can be observed after 80 days (Figure 4).

Differences among the tree studied orchids in the growth index (GI) of seedlings were similar to differences in percent seed germination. The GI for the rupicolous *Hoffmannseggella* species at 50 days and 80 days was significantly higher in M65 treatment (Figure 3, 4b,c). In contrast, the GI for the epiphyte *H. jongheana* did not differ significantly between M65 and HJ21B symbiotic treatments and Knudson (Figure 3, 4 b,c).

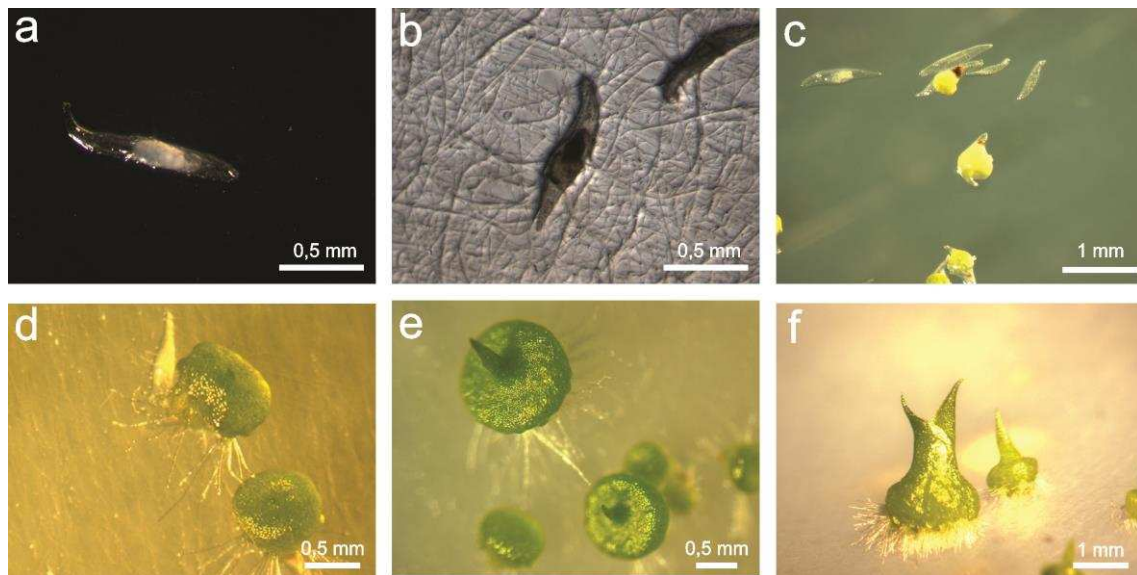


Figure 2: Symbiotic seed germination and protocorm developmental Stage s of *H. caulescens* M65 treatment cultured on OMA 30 days after sowing: **a.** Stage 0; **b.** Stage 1; **c.** Stage 2; 50 days after sowing: **d.** Stage 3; **e.** Stage 4; **f.** Stage 5, protocorm with two leaves.

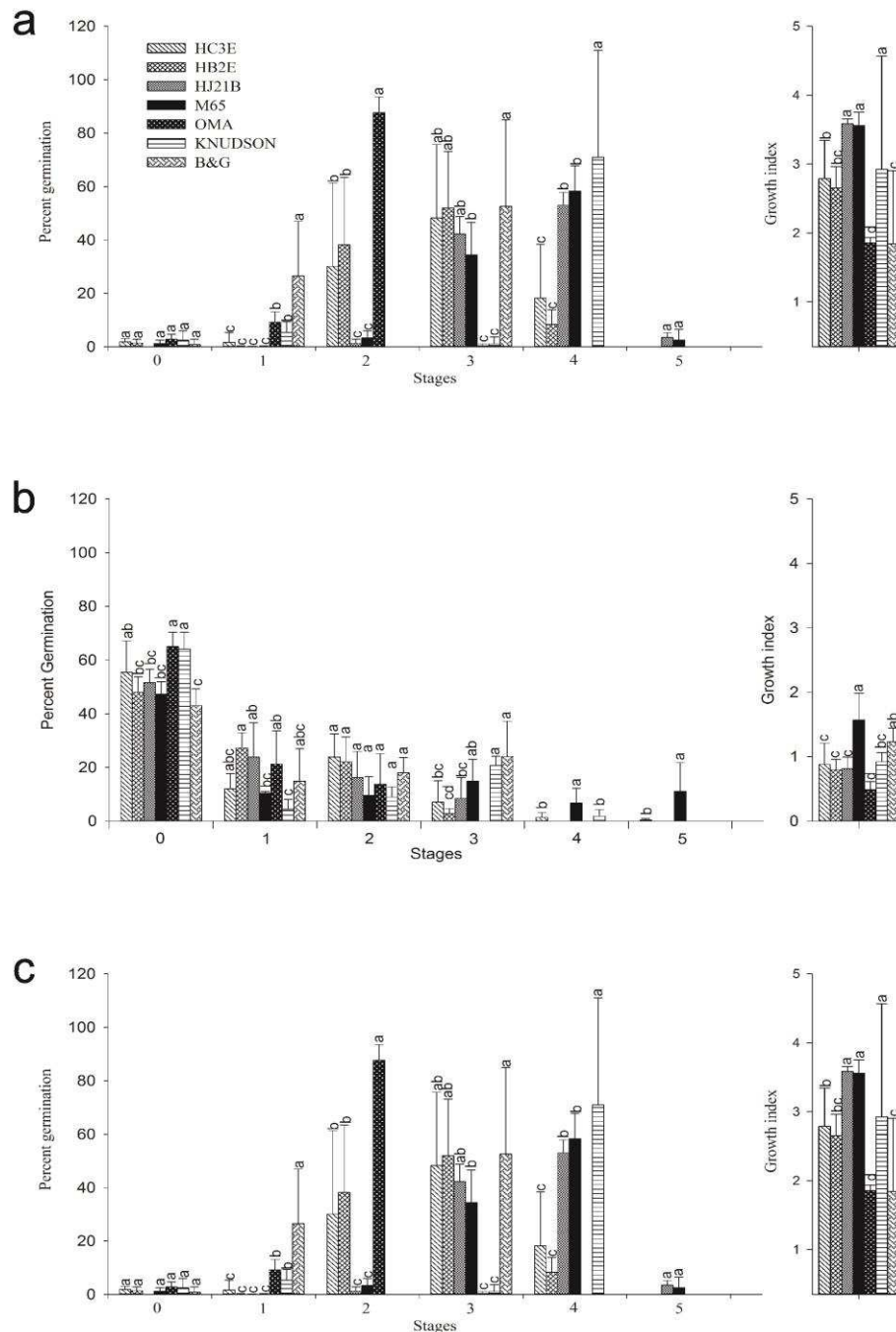


Figure 3: Effects of four *Epulorhiza* isolates (HC3E, HB2E, HJ21B, M65) and tree none inoculated treatments on seed germination, protocorm development and seedling grow index (GI) 50 days after sowing of studied orchids species: **a.** *H.jongheana*; **b.** *H.caulescens*; **c.** *H. cinnabarina*.(ANOVA and means were compared by Duncan’s Multiple Range test; $P \geq 0.05$).

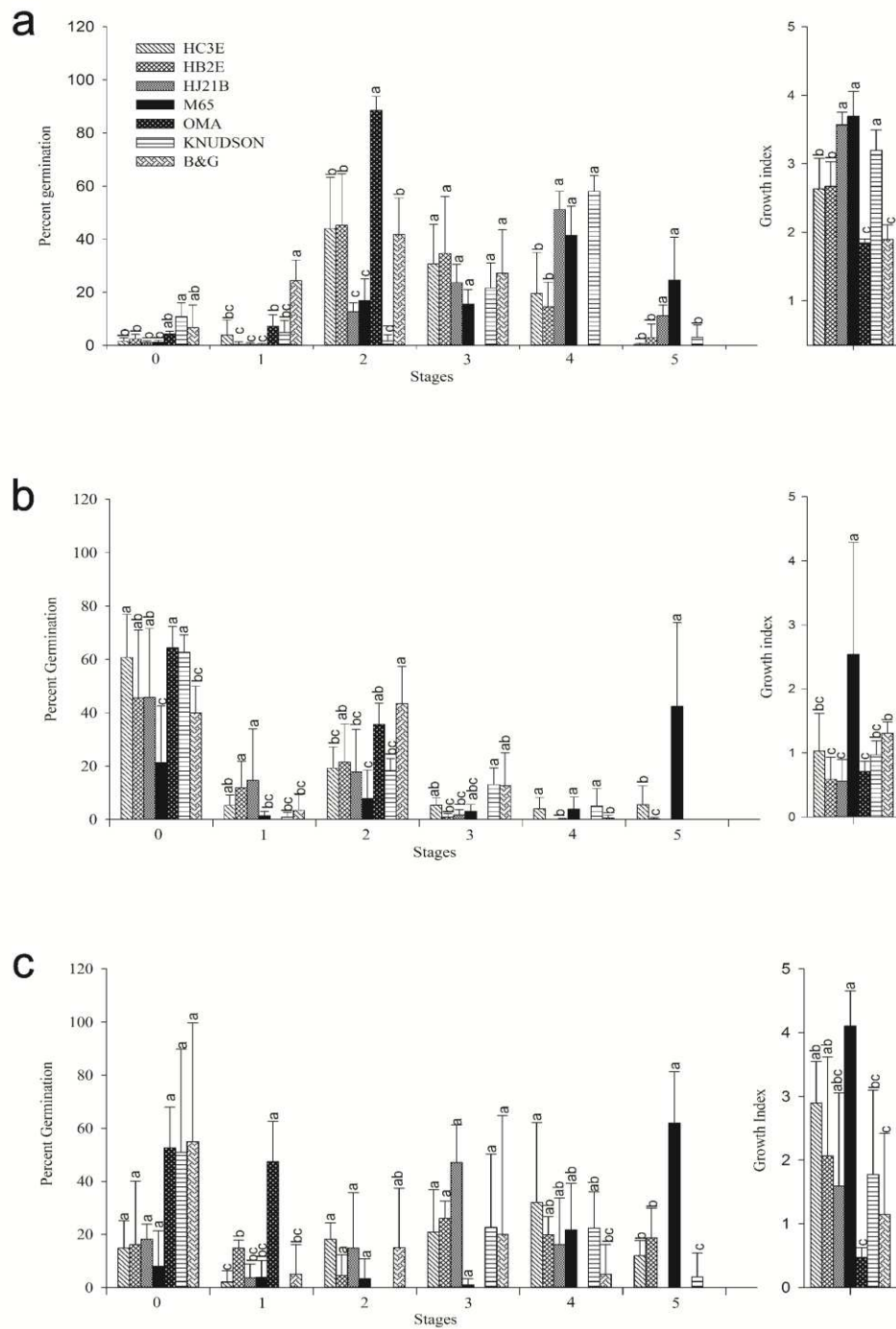


Figure 4: Effects of four *Epulorhiza* isolates (HC3E, HB2E, HJ21B, M65) and tree none inoculated treatments on seed germination, protocorm development and seedling grow index (GI) 80 days after sowing of studied orchids species: **a.** *H.jongheana*; **b.** *H.caulescens*; **c.** *H. cinnabarina*.(ANOVA and means were compared by Duncan's Multiple Range test; $P \geq 0.05$).

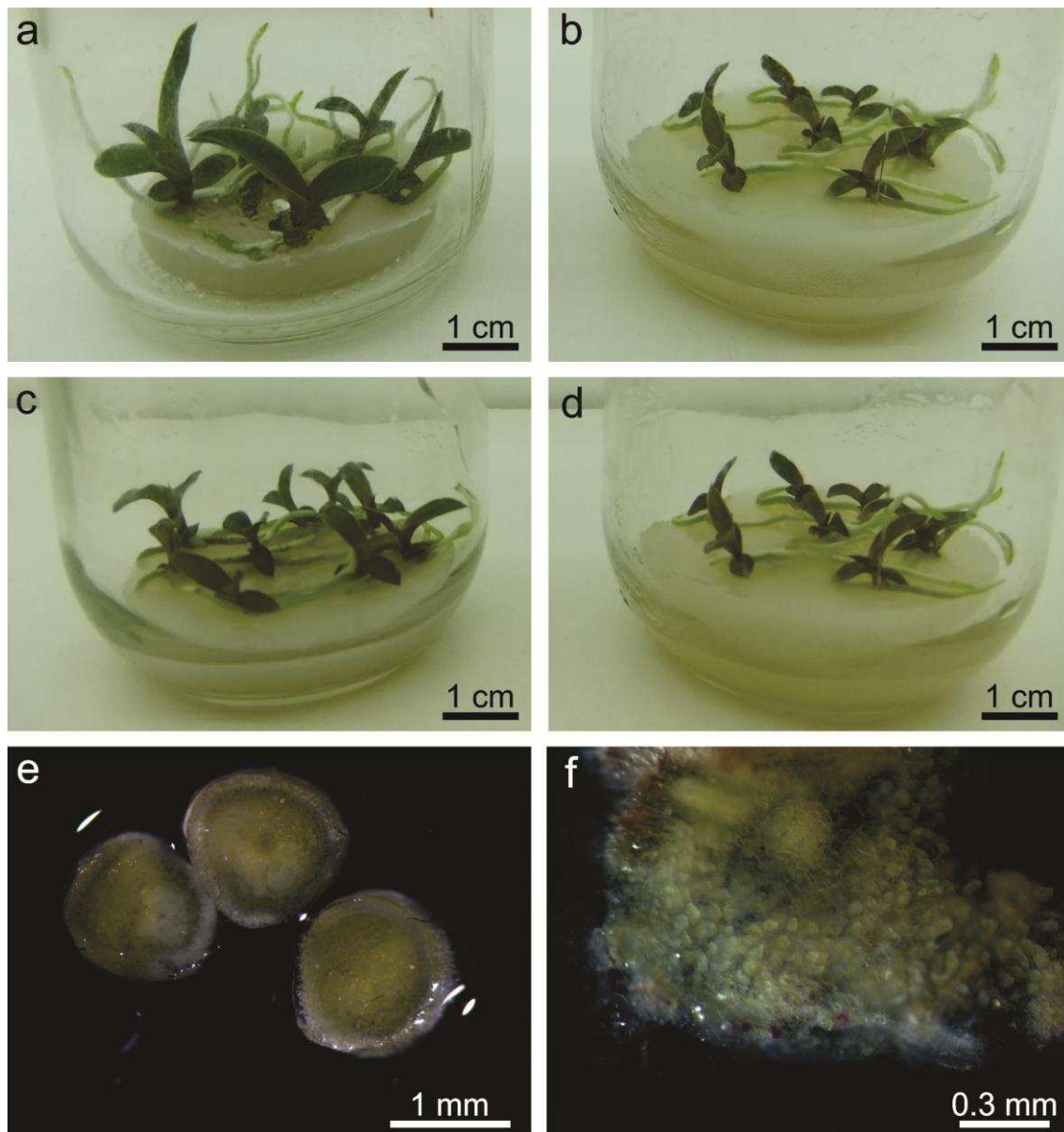


Figure 5: *H. cinnabarina* cultured on OMA 180 days after germination in: **a.** M65 treatment; **b.** HC3E; **c.** HB2E; **d.** HC3E; Species mycorrhizal root colonization 210 after germination: **e.** *H. jongheana* in HJ21B treatment; **f.** *H. caulescens* in M65 treatment.

Nutritional analysis

The seedlings growing in association with mycorrhizal fungi presented higher macronutrients content (Table 2) than those nutrients media, Knudson and B&G

Orchidées ($P < 0.05$), confirming the crucial role of mycorrhizal in the orchid nutrition, favoring the absorption and translocation of the nutrients from a very poor culture media as OMA is.

Table 2: Macronutrients contends in seedlings of *H. jongheana*, growth in Knudson, B&G Orchidées, OMA and in OMA inoculated with *Epulorhiza* isolate (M65) 80 days after sowing at $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Culture media	P	K	S	Ca	Mg
	-----µg/petri dish -----				
Knudson	24,19	81,14	8,78	16,88	11,78
OMA	3,04	16,31	4,63	2,72	1,41
B&G	13,73	52,06	5,38	5,99	6,07
OMA+ M65	34,59	246,19	54,17	36,36	25,35

Discussion

The test of *in vitro* symbiotic seed germination is a powerful tool for both, the production of mycobiont-colonized seedlings, and to study the fungal specificity within the Orchidaceae (Stewart and Kane 2006). Few reports exist concerning the *in vitro* symbiotic seed germination of Brazilian endangered orchids. This is the first report describing the successful symbiotic seed germination of *Hadrolaelia* and *Hoffmannseggella* species. This trend may result from a growing concern among conservationists about land clearance of the main habitat, Atlantic Forests and increasing vulnerable *status* of conservation of the studied orchid species, until now still over collecting.

Interestingly, for all tested orchids species, maximum protocorm development (Stage 5) was reported in seeds that were cultivated in association with a mycobiont

isolated from *E.secundum* (M65). In Pereira et al (2011), M65 had also induced the highest rates of germination percentage and GI in symbiotic experiments of *E. secundum*.

The seeds of three orchid species germinated even as in the absence of the mycobiont, although reaching at least Stage 2 in OMA medium, and in lower degree in the Knudson e o B&G (Figure 4). However previous study of Brazilian orchid seed germination, using similar methodology, have reported that *Oncidium flexuosum* Sims (Pereira et al 2005) and *Epidendrum secundum* (Pereira et al 2011) did not germinated in the absence of the fungi, showing that the dependence to mycorrhizal symbiont on the seed orchids species. So, we can consider that *Hoffmannseggella* and *Hadrolaelia*, have their development accelerated, but the dependence is lower. The growth index (GI) of the protocorms, at 80 days was also higher when seedlings were inoculated with M65, for all tested species (Figure 4). However *H. caulescens* showed a good GI even as in Knudson and B&G culture media (Figure 4b).

Suzuki et al (2012) tested the following nutritional media: Knudson C (KC), Murashige and Skoog (MS), and Vacin and Went (VW), with or without benzyladenin, to *H. cinnabarina*, and the development of seedlings were observed after 120 days of incubation. In the present work, when inoculated, protocorms were obtained in all symbiotic treatments in less than 50 days for all orchids (Figure 2d; 3). Confirming the efficiency of mycorrhizal fungi in germinating and development of orchid seedlings.

The epiphytic species are less dependent on mycobiont taxa when compared with terrestrial species and can be found in association with fungi only at the Stage of seeds germination, while adults may be independent of mycorrhiza for nutrition (Roberts and Dixon 2008; Swarts and Dixon 2009). Considering that all fungi formed mycorrhiza and promoted seed germination with all orchid species tested, it is suggested

that there is no incompatibility between those fungi and orchids.

Like terrestrials orchids, epiphytic species retain mycorrhizal partners throughout the life cycle (Pereira et al. 2005; Suárez et al. 2008). Given that epiphytic orchids grow under drought conditions for a period of time (Zotz and Schmidt 2006), mycorrhizal fungi would increase the surface area for water and nutrients uptake, and such dependency is not surprising. In addition, since the roots of epiphytic orchids have little or no direct contact with soil, mycorrhizal fungi may increase access to mineral nutrients (Osorio-Gil et al. 2008).

The epiphytic species *H. jongheana* showed to be less dependent on mycorrhiza for germination and protocorm development than the rupicolous orchids *H. caulescens* and *H. cinnabarina*, since the performance of germination and development seems similar in all culture media, independent of the presence of the mycorrhizal fungi (Figure 3;4). We suppose that our rupicolous orchids cannot be compared to terrestrial orchids mycorrhizal partners related in others works, since this species grow where there is a good layer of soil, whereas *H. caulescens* and *H. cinnabarina* have been found in *campos de altitude* and *campos rupestres*, where generally they grow directly on the rocks or a thin layer of soil.

The efficiency of the fungus *Epulorhiza* in the seed germination of others orchids species has been reported (Zettler et al. 1998; Zettler et al. 1999; Ovando et al. 2005; Stewart et al. 2006; Johnson et al. 2007; Chutima et al. 2011; Biao et al. 2012), and it can be noted that many of them promoted the development until Stage 3, but not always reach Stage 4 or 5, where the seedlings present one to two leaves. In the symbiotic Brazilian orchid propagation, *Epulorhiza* has been shown very efficient, reaching seedlings until Stage 4 in less than 5 weeks (Torres et al. 2008; Pereira et al. 2011).

It is not clear whether the mycorrhizal fungi present in germinating stage of seeds (a stage when all orchids need fungi) are the same as those isolated from adults orchids (when some need fungi and others are facultatives) (Porrás-Alfaro and Bayman 2007). So, the *in vitro* symbiotic germination experiments with fungi isolated from adult plants can help us to address this question.

Some studies have suggested that there are specific fungi for different stage of the life cycle of the orchids (Dearnaley 2007; Tao et al. 2008; Shimura et al. 2009). In our case as the fungi used in this study were isolated from adults orchid root system, from the same species of orchid tested, we can conclude that these mycorrhizal fungi play an important role in all life cycle of these orchids. However, the mycobiont that promoted greater percentage of germination and growth index was the fungus M65 (Figure 3,4), isolated from roots of *E. secundum*, that also occurs at *campos rupestres* and *campos de altitude* as *Hoffmannseggella* species. Furthermore, the HB2E isolate, from *H.cinnabarina* present the same growth index of M65 *H.jongheana* experiments, after 80 days. These results confirm the low specificity of our orchids, but the efficiency of M65 proven here during *in vitro* seedlings production is very important to achieve some conservation goals. According Pereira et al (2011), the isolate M65 seems to be a mycobionte with high potential to be used in the programs of symbiotic propagation of orchids. M65 was isolated from *E. secundum*, a widely spread orchid species, in different formations of Atlantic forests biome, so probably presenting association with a geographically widespread mycorrhizal fungi.

However, when Pereira et al (2005) tested different isolates of *Epulorhiza* spp. And *Ceratorhiza* spp. in seed germination of *Oncidium flexuosum* Sims, that grow as epiphyte and rupicolous, they observed germination induction in all treatments, but the development of protocorms were reached only with one *Cerathoriza* isolate from *O.*

flexuosum, showing the high specificity of this orchid specie to promote protocorms, compared to *Hadrolaelia* and *Hoffmannseggella*.

In summary, all species were highly compatibles with their own mycorrhizal fungi and with *Epulorhiza* from *E. secundum*, such all treatments promote the green leaf stage under *in vitro* conditions. Our results corroborates to Oliveira (2012), who using molecular tools, verified how *Hadrolaelia* and *Hoffmannseggella* present a diverse community of mycorrhizal and endophytic fungi (Basidiomycetes and Ascomycetes), reinforcing the lower specificity of the studied orchids based in the present data.

Study of orchid mycorrhizal fungi presents several challenges and some questions still remain, so is indispensable to increase the number of reports of successful *in vitro* production of Brazilian orchid. This information will be critical to future plant production and reintroduction efforts aimed at the conservation of *H. jongheana*, *H. caulescens* and *H. cinnabarina*.

References

- Braga JM, Defelipo BV (1974) Determinação espectrofotométrica de P em extratos de solo e material vegetal. Rev Ceres, 21:73-85.
- Brundrett MC, Scade A, Batty AL, Dixon KW, Sivasithamparam K (2003) Development of in situ and ex situ seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats. Mycol. Res. 107(10):1210–1220. doi.org/10.1017/S0953756203008463
- Chutima R, Dell B, Vessabutr S, Bussaban B, Lumyong S (2011) Endophytic fungi from *Pecteilis susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid in Thailand. Mycorrhiza 21:221-229. doi:10.1007/s00572-010-0327-1

- Dearnaley JDW (2007) Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17: 475-486. doi: 10.1007/s00572-007-0138-1
- Graham RR, Dearnaley JDW. (2012) The rare Australian epiphytic orchid *Sarcophilus weinthalii* associates with a single species of *Ceratobasidium*. *Fungal Divers* 54:31-37. doi:10.1007/s13225-011-0106-0
- Jackson ML (1979) Soil chemical analysis. Advanced course. 2.ed. Madison, 895 p.
- Johnson TR, Stewart SL, Dutra D, Kane ME, Richardson L (2007) Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)—preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell Tiss Org Cult* 90:313–323. doi:10.1007/s11240-007-9270-z
- Li B, Tang M, Tang K, Zhao L, Guo S (2012) Screening for differentially expressed genes in *Anoetochilus roxburghii* (Orchidaceae) during symbiosis with the mycorrhizal fungus *Epulorhiza* sp. *Sci China Life Sci*, 55: 164-171. doi:10.1007/s11427-012-4284-0
- McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL, Read DJ (2000) Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. *New Phytol* 145:523–537.
- McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL, Read DJ (2002) Symbiotic germination and development of the mycoheterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. *New Phytol* 154:233–247. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00372.x
- Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oliveira SF (2012) Diversidade de fungos micorrízicos e endofíticos associados à orquídeas ameaçadas do bioma Mata Atlântica. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) 63 f. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

- Osorio-Gil EM, Forero-Montano J, Otero JT (2008) Variation in mycorrhizal infection of the epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Caribbean J Sci* 44:130-132.
- Otero JT, Ackerman JD, Bayman P (2004). Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Mol Ecol* 13: 2393-2404. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02223.x
- Ovando I, Damon A, Bello R, Ambrosio D, Albores V, Adriano L, Salvador M (2005) Isolation of endophytic fungi and their mycorrhizal potential for the tropical epiphytic orchids *Cattleya skinneri*, *C. aurantiaca* and *Brassavola nodosa*. *Asian J Plant Sci* 4(3): 309-315.
- Pereira MC, Torres DP, Guimarães FAR, Pereira OL, Kasuya MCM (2011) Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*. *Acta Bot Bras* 25(3): 534-541.
- Pereira OL, Kasuya MCM, Rollemberg CL, Borges GM (2005b). Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. *Rev Bras Cienc Solo* 29:191-197. doi.org/10.1590/S0100-06832005000200004
- Roberts DL, Dixon KW (2008) Orchids. *Curr Biol* 18:325-329. doi.org/10.1016/j.cub.2008.02.026
- Shimura H, Sadamoto M, Matsuura M, Kawahara T, Naito S, Koda Y (2009) Characterization of mycorrhizal fungi isolated from the threatened *Cypripedium macranthos* in a northern island of Japan: two phylogenetic distinct fungi associated with the orchid. *Mycorrhiza* 19:525-534. doi:10.1007/s00572-009-0251-4

- Stewart SL, Kane ME (2006) Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tiss Org* 86:159–167. doi:10.1007/s11240-006-9104-4
- Suárez JP, Weiss M, Abele A, Oberwinkler F, Kottke I (2008) Members of Sebaciniales subgroup B form mycorrhizas with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycol Prog* 7: 75-85. doi:10.1007/s11557-008-0554-4
- Suzuki RM & Moreira VC & Pescador R & Ferreira W. de M. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. *In vitro Cell Dev Biol-Pl* (2012) 48:500 – 511. doi:10.1007/s11627-012-9460-1
- Swarts N, Sinclair E, Francis A, Kingsley D (2010) Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. *Mol Ecol* 19, 3226–3242. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04736.x
- Swarts ND, Dixon KW (2009) Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Ann Bot London* 104: 543–556. doi: 10.1093/aob/mcp025
- Tao G, Liu ZY, Hyde KD, Liu XZ, Yu ZN (2008) Analysis reveals novels and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). *Fungal Divers* 33:101–122.
- Torres DP, Bocayuva M, Guimarães FAR, Oliveira SF, Veloso TGR, Pereira MC, Pereira OL, Fontana AP, Fraga CN, Kasuya MCM (2008) Propagação simbiótica de *Hadrolaelia jongheana*. In: FertBio, 2008, Londrina. Anais do FertBio 2008.
- Veloso HP, Rangel Filho AL, Lima JCA (1991) Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods

and Applications (eds). Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ Academic Press, Inc., New York, pp. 315-322.

Wright M, Cross R, Dixon K, Huynh T, Lawrie A, Nesbitt L, Prichard A, Swarts N, Thomson R (2009) Propagation and reintroduction of *Caladenia*. Aust J Bot 57:373–387. doi.org/10.1071/BT08137

Zettler LW, Burkhead, JC, Marshall JA 1999 Use of a mycorrhizal fungus from *Epidendrum conopseum* to germinate seed of *Encyclia tampensis* *in vitro*. Lindleyana 14:102-105.

Zettler LW, Delaney TW, Sunley JA (1998) Seed propagation of epiphytic green-fly orchid, *Epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus. Selbyana, 19:249-253.

Zotz G, Schmidt G (2006) Population decline in the epiphytic orchid *Aspasia principissa*. Biol Conserv 129:82 – 90. doi.org/10.1016/j.biocon.2005.07.022.

**4 ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS MICORRIZADAS DE *HADROLAELIA* E
HOFFMANNSEGGELLA (ORCHIDACEAE) EM SUBSTRATOS
ALTERNATIVOS (formatação de acordo com guia do autor da revista *Acta
Scientiarum Agronomy*)**

**Melissa Faust Bocayuva; Tomás Gomes Reis Veloso; Juliana Aparecida Silva;
Wagner Campos Otoni; Maria Catarina Megumi Kasuya.**

Resumo

Este trabalho teve como objetivo testar substratos alternativos na aclimatização de plântulas micorrizadas das espécies de *Hadrolaelia jongheana*, *Hoffmannseggella caulescens* e *Hoffmannseggella cinnabarina* obtidas a partir de semeadura simbiótica *in vitro*, inoculado com o fungo *Epulorrhiza* spp., isolado M65. Os substratos testados foram cascalho, casca de *Pinus* e de eucalipto. Foram avaliadas a sobrevivência das mudas e durante 5 meses após o transplântio, foram avaliados o número de folhas (NF), o comprimento da maior folha (CMF) e a micorrização do sistema radicular das plântulas. Verificaram-se grandes porcentagens de sobrevivência para todas as espécies nos diferentes tratamentos, variando de 40% a 100%. Houve incrementos para o NF e CMF para *H. jongheana* e *H. caulescens* em todos os substratos. Para *H. cinnabarina* os resultados para estas características não apresentaram diferença pelo fato das mudas aclimatizadas já apresentarem medidas iniciais maiores que as demais (CMF > 0,5 cm, NF > 2). Foram observados *pelotons* intactos e degradados no sistema radicular das três espécies de orquídeas, sendo assim a inoculação inicial continua presente no pós-aclimatização. A metodologia de aclimatização proposta neste trabalho demonstra-se eficaz, comprovando o desenvolvimento das plântulas sem a aplicação de fertilizantes e com elevadas porcentagens de sobrevivência.

Palavras-chave: *Pinus*, eucalipto, *Epulorrhiza*, propagação simbiótica, espécies em risco de extinção, reintrodução.

Acclimatation of mycorrhizal plants of *Hadrolaelia* and *Hoffmannseggella* (ORCHIDACEAE) in alternative substrates

Abstract

This study aimed to test alternative substrates in the acclimatization of mycorrhizal species *Hadrolaelia jongheana*, *Hoffmannseggella caulescens* and *Hoffmannseggella cinnabarina* obtained from seedling *in vitro* symbiotic inoculated with the fungus *Epulorrhiza* spp., Isolate M65. The substrates were tested with gravel, pine bark and eucalyptus bark. We evaluated the survival of seedlings and for 5 months after transplantation, we assessed the number of leaves (NL), the length of the longest leaf (CMF) and the seedling mycorrhizal root system. There were large percentages of survival for all species in the different treatments, ranging from 40% to 100%. There were increments for NL and CMF for *H. jongheana* and *H. caulescens* on all substrates. In *H. cinnabarina*, results for these characteristics did not differ, probably because acclimatized seedlings already present initial measures larger than the others (CMF > 0.5 cm, NL > 2). Were observed intact and degraded pelotons in the root system of the three species of orchids, showing that the initial inoculation is still present even after this long period of acclimatization. The high values of coefficient of variation show that these characteristics presents a high variability. The methodology proposed in this paper demonstrates acclimatization to be effective, proving seedling development without the application of fertilizers and high percentages of survival, showing himself to be an efficient method to be used in symbiotic propagation of these orchids on a large scale.

Key words: *Pinus*, eucalyptus, *Epulorrhiza*, symbiotic propagation, endangered species, reintroduction.

Introdução

A associação entre as orquídeas e os fungos micorrízicos é essencial à sobrevivência das orquídeas na natureza, auxiliando diretamente na germinação das sementes, no desenvolvimento dos embriões e na manutenção da planta adulta (RASMUSSEN, 1995; DEARNALEY, 2007). A abordagem da interação simbiótica é ainda pouco explorada por programas de conservação de orquídeas, mas tem se revelado como de importância crucial, pois prevendo a necessidade de reintrodução de indivíduos na natureza, as plantas cultivadas em associação com seu fungo simbiote são mais resistentes e suportam melhor a adaptação ao ambiente do que plantas germinadas assimbioticamente (CRIBB *et al.*, 2003; ZETTLER, 2001; ZETTLER *et al.*, 2003). Além disso, ao mesmo tempo em que se conserva e reintroduzem indivíduos de orquídeas, a população do fungo é restabelecida (PEREIRA *et al.*, 2002). Programas de conservação visando reintrodução para orquídeas em risco de extinção no Brasil ainda não foram realizados, em virtude da carência de estudos multidisciplinares, como a aclimatização de mudas micorrizadas em larga escala. Não foi tomada nenhuma iniciativa de conservação *ex situ* para as espécies citadas na última lista oficial de espécies ameaçadas da Flora Brasileira (BRASIL, 2008).

Um dos fatores que afeta o sucesso da produção de orquídea é a utilização de um substrato adequado os quais devem possuir uma boa consistência para suporte, capacidade de retenção de água, retenção e disponibilidade de nutrientes, permeabilidade, aeração, poder de tamponamento para valor de pH (SILVA; SILVA, 1997; KÄMPF, 2000), entre outros. Assim, vários substratos vêm sendo testado nesse sentido para produção de orquídeas, tais como casca de arroz, casca de café, casca de *Pinus*, coco em pó, isopor moído, sementes de amendoeira e *Sphagnum* (MORAES *et al.*, 2002; ASSIS *et al.* 2005; YAMAKAMI *et al.* 2006; LONE *et al.*, 2008; STEFANELLO *et al.* 2009; AMARAL *et al.*, 2010; SANTOS; TEIXEIRA, 2010; SCHNITZER *et al.* 2010; ASSIS *et al.*, 2010; 2011; DORNELES; TREVELIN, 2011). Para que essas orquídeas consigam retornar ao seu habitat natural e se desenvolver, após serem cultivadas em laboratório, onde as condições são extremamente favoráveis para seu desenvolvimento, é necessário um período de aclimatização. Essa passagem crítica, da fase *in vitro* para *ex vitro* (casa-de-vegetação) deve-se, basicamente, aos estresses bióticos e abióticos, além da passagem das plantas da fase heterotrófica para autotrófica (LONE *et al.*, 2008). A transferência da plântula de um ambiente ótimo para um onde as

condições não são controladas, principalmente, capacidade hídrica, clima e temperaturas ideais, podem ser amenizadas pelo uso de substratos com textura grossa, boa drenagem, acidez controlada e areação livre para as raízes, bem como mantendo-se a umidade relativa do ar relativamente elevada. Nestas condições, torna-se possível o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Além disso, é bem conhecida a importância da associação micorrízica na germinação e formação de protocormos de orquídeas, mas em plantas adultas clorofiladas ainda precisa ser mais investigada e compreendida (SHEFFERSON *et al.*, 2005; GIRLANDA, 2006), pois a espécie de fungo micorrízico pode ter diferentes influências funcionais sobre a orquídea hospedeira na fase adulta (ZETTLER e HOFER, 1998; CLEMENTS, 1988). Ensaios de germinação simbiótica *in vitro* podem esclarecer estes questionamentos (OTERO *et al* 2004, 2005). Da mesma forma, os experimentos de aclimatização também, pois assim poderemos supor os fungos micorrízicos eficientes em duas etapas importantes: a germinação e o desenvolvimento de plantas *ex vitro*.

A produção de mudas de orquídeas a partir da semente leva, no mínimo, dois anos, o que torna o processo de multiplicação de grandes quantidades de mudas para comercialização muito lento e oneroso (MORAES *et al* 2002). No entanto, o método de semeadura *in vitro* de orquídeas em associação com fungos micorrízicos pode tornar possível, em pouco tempo, a propagação de espécies em risco de extinção, como *Hadrolaelia jongheana* (Rchb.f.) Van den Berg, *Hoffmannseggella caulescens* (Lindl.) Van den Berg e *H. cinnabarina* (Lindl.) H.G. Jones (BRASIL, 2008; DRUMMOND *et al.*, 2008), uma vez que estimula a germinação de grande parte das sementes, além de promover o desenvolvimento do protocormo em menos de três meses (PEREIRA *et al.*, 2011; VELOSO *et al.*, 2011; TORRES *et al* 2008). O objetivo do presente trabalho foi testar substratos alternativos na aclimatização de plântulas micorrizadas das espécies de *Hadrolaelia jongheana*, *Hoffmannseggella caulescens* e *Hoffmannseggella cinnabarina* a partir de semeadura *in vitro*.

Material e Métodos

Plântulas das três espécies estudadas *H. jongheana*, *H. cinnabarina* e *H. caulescens* foram obtidas por semeadura simbiótica *in vitro* em OMA (4 g de aveia, 10 g de ágar e 1L de água, pH=5,6) com um isolado de gênero *Epulorhiza* sp. (código M65) da coleção de fungos micorrízicos de orquídeas do Laboratório de Associações

Micorrízicas (BIOAGRO/UFV). Cerca de três meses após a semeadura, as plântulas micorrizadas foram transferidas para frascos mantidos em câmara de crescimento no Laboratório de Cultura de tecidos (BIOAGRO/UFV) à temperatura de 26 ± 2 °C e fotoperíodo regulado a 16/8h luz claro/16h escuro. Seis a sete meses após a semeadura e confirmada a micorrização, as plântulas de *H. jongheana*, *H. cinnabarina* e *H. caulescens* com comprimento de parte aérea de cerca de 1 a 2 cm e com raízes com cerca de 2 cm foram transferidas para tubetes em casa-de-vegetação sob dois tipos de cobertura: tela de polipropileno de coloração preta (sombrite) e tela termo-refletora Aluminet® ambas com retenção de 50% do fluxo de radiação solar. Os substratos utilizados inicialmente foram: casca de *Pinus* e de eucalipto. A fim de utilizar um substrato menos suscetível a contaminação por fungos, foi adotado também o cascalho como substrato na aclimatização em bandejas de plástico com trinta células. As irrigações foram feitas manualmente no início da manhã ou no fim de tarde, diariamente no verão e em dias alternados no inverno. Não foi feita adubação em nenhum período após o transplantio.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, (3 x 3) 12, correspondendo a três substratos e três espécies de orquídea, todas inoculadas com o isolado M65 e com 12 repetições por tratamento.

Após o transplantio foram avaliados mensalmente, durante 5 meses, o número de folhas (NF) e o comprimento da maior folha (CMF).

Para a confirmação de colonização micorrízica foram coletadas amostras de raízes das plântulas antes da aclimatização e cerca de sete meses após a aclimatização, para observação de cortes transversais sob microscópio estereoscópico (Olympus SZ61). Para observação dos *pelotons*, amostras aleatórias do sistema radicular de cada espécie de orquídea foram fixadas em FAA 50 (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 50% 5:5:90 v/v), mantidas sob vácuo por 48h e estocadas em etanol 70 % a temperatura ambiente (JOHANSEN, 1940). Cortes longitudinais seriados, das amostras fragmentos de raízes foram obtidos com auxílio de um micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bheling). Os cortes foram 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 glicerizada (KRAUS e ARDUIN, 1997). As observações e documentações fotográficas foram realizadas com auxílio de fotomicroscópio (Olympus BX50).

Foram coletados cinco fragmentos de raízes por espécie de orquídea, para cada substrato, dos quais foram 100 cortes transversais, priorizando a região basal do sistema radicular, para se quantificar a frequência de colonização (F%) e a intensidade global da colonização (M%), sob microscópio estereoscópico (Olympus SZ61). Para a avaliação da M% foram adotadas 5 notas correspondendo a classes de colonização do córtex: (0) ausência de colonização; (1) > 0 a 10%; (2) ≥ 0 a 50%; (3) ≥50 a <90%; (4) ≥90 a 100%, modificado de Trouvelot *et al.* (1986) e Tisserant *et al.* (1998). As características foram quantificadas utilizando as seguintes fórmulas:

$$M\% = \frac{95 \times n4 + 70 \times n3 + 30 \times n2 + 10 \times n1}{n0 + n1 + n2 + n3 + n4}$$

$$A\% = \frac{n1 + n2 + n3 + n4}{n0 + n1 + n2 + n3 + n4}$$

Onde n0 representa o número de cortes com nota 0, n1 (nota 1), n2 (nota 2), n3 (nota 3) e n4 (nota 4).

Para verificar se havia diferença significativa entre as médias inicial e final dos parâmetros NF e CMF, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5% de significância. Para os parâmetros %M e %A além da ANOVA foi realizado o teste de médias através do procedimento de Tukey a 5% de probabilidade. Para a análise estatística dos dados utilizou-se o programa SAEG 9.0.

Resultados e Discussão

Avaliação do crescimento

No cascalho observaram-se incrementos no NF e CMF ($P < 0,05$) para *H. caulescens* e *H. jongheana*, cinco meses após a aclimatização (Figura 1a). Para *H. cinnabarina* os resultados para estas características não apresentaram diferença, provavelmente pelo fato das mudas aclimatizadas já apresentarem medidas iniciais maiores (CMF > 1cm, NF > 4) que as demais (CMF > 0,5 cm, NF > 2). Nos substratos de casca de eucalipto e *Pinus* novamente não foi observado incremento ($P < 0,05$) para as características avaliadas para *H. cinnabarina* (Figura 1b,c). Entretanto, as plântulas de *H. jongheana* apresentaram um desenvolvimento positivo em casca de eucalipto como de *Pinus*, no entanto não houve diferença para o NF em eucalipto ($P = 0,07561$) de *H. jongheana* (Figura 1b), e para o CMF em eucalipto ($P = 0,18278$) e o NF em *Pinus* ($P = 0,19502$) de *H. caulescens* (Figura 1c). Em experimentos desenvolvidos com plantas de orquídeas não micorrizadas e com aplicação de fertilizantes, Assakawa *et al.* (2008)

não observaram diferença nas características NF para plântulas de *Laelia tenebrosa* (Rolfe) Rolfe durante um período de aclimatização semelhante. No entanto, Valencia (2009) observou diferença desta característica durante um período de aclimatização maior.

Neste trabalho verificaram-se grandes porcentagens de sobrevivência para todas as espécies nos diferentes tratamentos, a saber, plântulas de *H. caulescens* aclimatizadas em cascalho (88%), seguido dos tratamentos com *Pinus* (75%) e eucalipto (40%), respectivamente. *H. cinnabarina* apresentou 89% de sobrevivência no tratamento de cascalho e 100% nos demais tratamentos. Por fim, *H. jongheana* apresentou 63% no cascalho e 82% em eucalipto e *Pinus*. As maiores taxas de mortalidade no tratamento com cascalho podem estar relacionadas ao estresse hídrico, uma vez que no pós-cultivo *in vitro* este é um dos fatores preponderantes na sobrevivência das plantas aclimatizadas. Os valores de sobrevivência foram elevados quando comparados com outros trabalhos de aclimatização de plântulas de orquídeas não micorrizadas, a saber, 27% em substrato de *Pinus* (DORNELES & TREVELIN, 2011). Outro fator importante na aclimatização foi à textura do substrato, pois as plantas aclimatizadas em *Pinus* podem ter sofrido danos maiores em suas raízes. SEENI & LATHA (2000) mencionaram que plantas que sofrem danos no sistema radicular apresentam uma baixa capacidade de aclimatização.

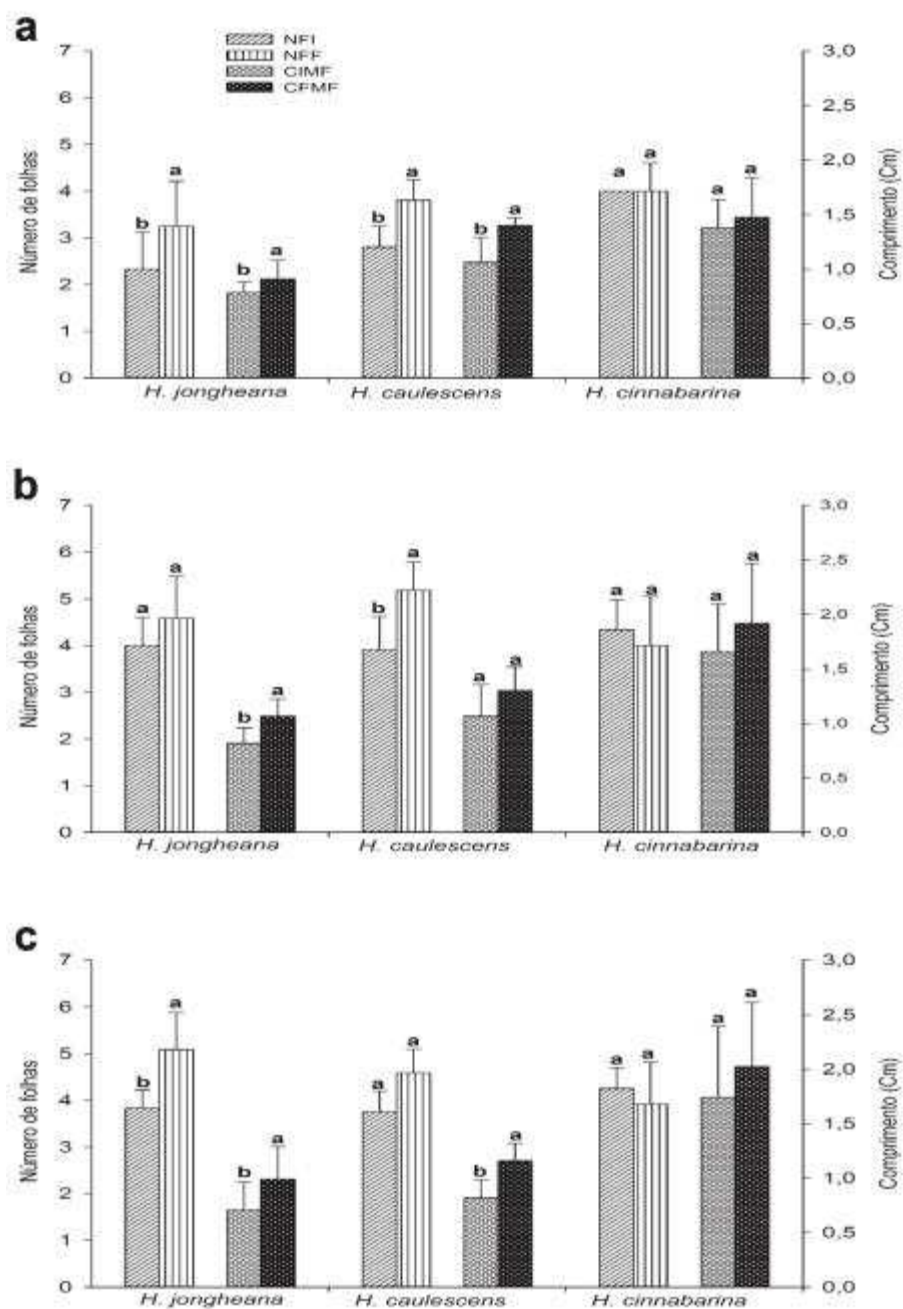


Figura 1: Médias do número de folhas (NF) e comprimento maior folha (CM) de plantas micorrizadas de *Hadrolaelia jongheana*, *Hoffmannseggella caulescens* e *Hoffmannseggella cinnabarina* nos três tratamentos de substratos: **a.** cascalho; **b.** casca de *Pinus* e **c.** eucalipto (NFI: número de folhas inicial; NFF: número de folhas final; CMI: comprimento maior folha inicial; CMF: comprimento maior folha final). *Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A maioria dos trabalhos de aclimatização de plântulas de orquídeas brasileiras obtidas a partir de propagação assimbiótica *in vitro* inclui a aplicação de uma solução nutritiva (MORAES *et al.*, 2002; ASSIS *et al.* 2005; YAMAKAMI *et al.* 2006; LONE *et al.*, 2008; STEFANELLO *et al.* 2009; AMARAL *et al.*, 2010; SANTOS; TEIXEIRA, 2010; SCHNITZER *et al.* 2010; ASSIS *et al.*, 2010; 2011; DORNELES e TREVELIN, 2011). Assim, testes utilizando a aclimatização de plântulas produzidas simbioticamente, acrescentado da aplicação de solução nutritiva deve ser testada para avaliar a eficiência da associação micorrízica e o efeito dos fertilizantes sobre o crescimento e o desenvolvimento da plântula, bem como da manutenção da associação micorrízica.

A metodologia de aclimatização proposta neste trabalho é eficaz já que foi comprovado o desenvolvimento das plântulas sem a aplicação de fertilizantes e com elevadas porcentagens de sobrevivência. O que pode ser explicado pelo fato de as plantas micorrizadas serem mais resistentes ao estresse e a patógenos que causam doenças do que plântulas assimbióticas (TANG *et al.*, 2009, além disso, a presença de simbiontes favorecem o crescimento e o estabelecimento da planta (BRUNDRETT *et al.*, 2003).

Avaliação da micorrização

Foram observados *pelotons* intactos e degradados para todos os tratamentos (Figura 2 c,d), mostrando que a inoculação inicial continua presente mesmo após cerca de seis a 7 meses da aclimatização. A %F não apresentou diferença para as três espécies nos três substratos avaliados ($P>0,05$) com exceção de *H. caulescens* que apresentou uma frequência de colonização inferior no tratamento com cascalho (Tabela 1). A %M, por sua vez, apresentou-se menor em *H. caulescens* nos substratos de casca de pinus e cascalho (Tabela 1). Os valores elevados do coeficiente de variação (CV%) mostram que tais características apresentam alta variabilidade, sendo assim, comparar estes dados não apresenta conclusões consistentes. A colonização de fungos micorrízicos no sistema radicular de orquídeas pode ser muito variável (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2007), o que foi observado também nas amostras coletadas das plantas adultas das mesmas espécies estudadas em seu habitat natural: fragmentos de raízes com intensa colonização ou com ausência de *pelotons*.

A colonização das orquídeas por diversas espécies de fungos micorrízicos aumenta a complexidade desta interação, porém até o presente momento nenhum trabalho testou uma mistura de inoculantes. É possível que diferentes grupos de fungos atuem em diferentes funções nas plantas hospedeiras (PORRAS-ALFARO *et al.*, 2007).

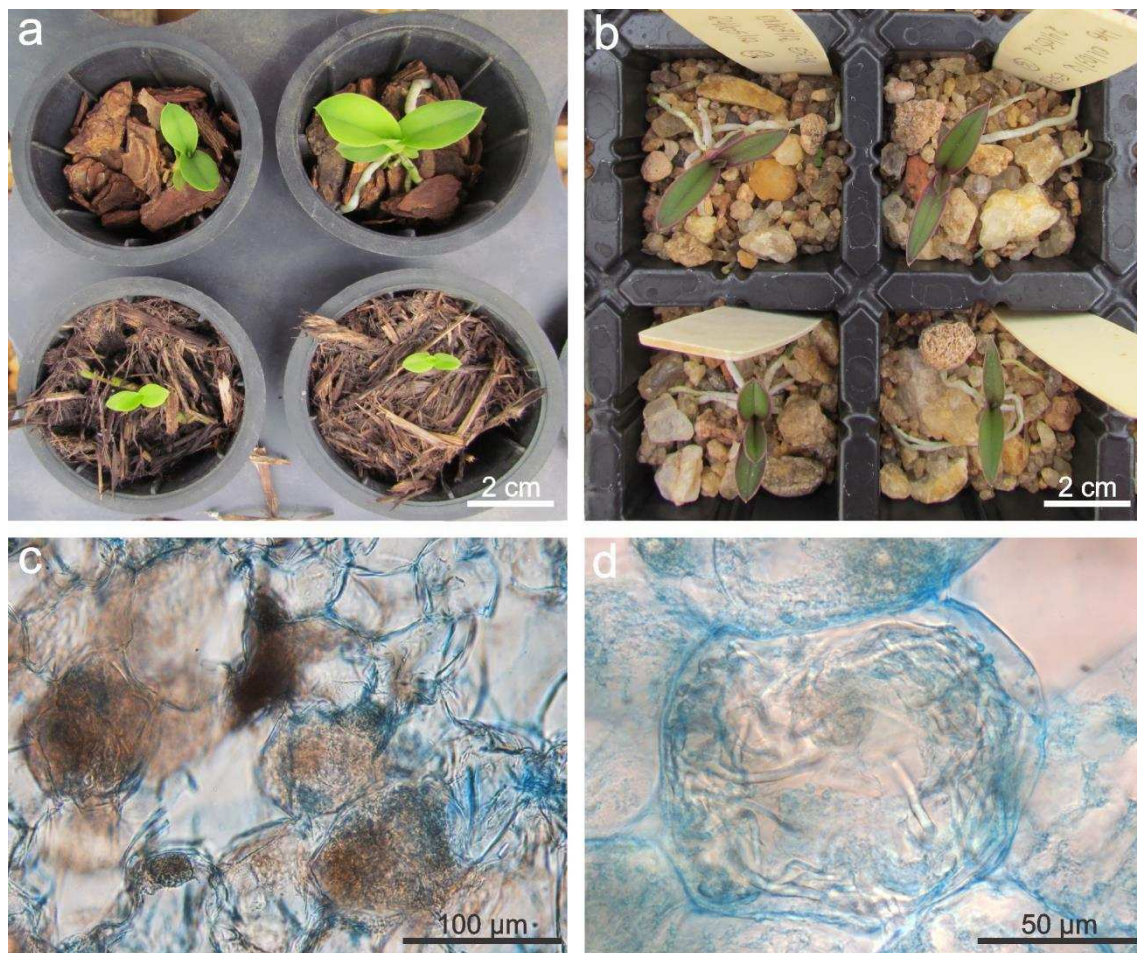


Figura 2: **a.** Plântulas de *H. jongheana* nos substratos de casca de *Pinus* e eucalipto após 6 meses a semeadura **b.** Plântulas de *H. caulescens* no substrato de cascalho após 7 meses a semeadura **c.** Presença de *pelotons* intactos e degradados no sistema radicular de *H. jongheana* com 6 meses no tratamento de cascalho. **d.** *Peloton* intacto na célula do córtex de raiz de plântula de *H. caulescens* com 4 meses de aclimatização no tratamento com *Pinus*.

Tabela 1: Porcentagem de colonização (M) e da frequência de Colonização (F) de plântulas de orquídeas inoculadas com *Epulorhiza* sp. Isolado M65, seis a sete meses após transplântio para casa de vegetação em diferentes substratos. Média de cinco repetições.

Espécie de Orquídea			
	Cascalho	Eucalipto	<i>Pinus</i>
	----- F (%) -----		
<i>H. cinnabarina</i>	50 a	25 a	47 a
<i>H. caulescens</i>	9 b	54 a	9 a
<i>H. jongheana</i>	39 ab	37 a	34 a
*CV%	52,36	58,63	35,95
	-----M (%)-----		
<i>H. cinnabarina</i>	3,53 ab	1,87 a	3,76 a
<i>H. caulescens</i>	0,42 b	2,13 a	1,17 b
<i>H. jongheana</i>	4,25 a	1,8 a	2,49 a
*CV%	66,58	71,87	57,78

*Coeficiente de Variação expresso em porcentagem.

Um indivíduo adulto de orquídea pode apresentar uma grande diversidade de simbiontes, pois segundo Kristiansen *et al* 2001, um *peloton* pode ser formado por varias espécies de fungos micorrízicos. Alguns autores supõem que os fungos micorrízicos podem exercer diferentes consequências funcionais sobre a orquídea hospedeira, porém as evidências sobre este fato ainda são limitadas (ZETTLER; HOFER, 1998; CLEMENTS, 1988). Ensaio de germinação simbiótica *in vitro* podem esclarecer estes questionamentos (OTERO *et al* 2004,2005), bem como experimentos de aclimatização, pois assim poderemos supor os fungos micorrízicos eficientes em duas etapas importantes, a germinação e o desenvolvimento de plantas *ex vitro*. No caso deste experimento optou-se em aclimatar as plântulas inoculadas com o isolado M65, pois este simbiote desempenhou as maiores taxas de germinação e desenvolvimento de protocormos para as três orquídeas estudadas.

Conclusões

O substrato cascalho, casa de eucalipto ou de *Pinus* não afetou o número de folhas e o comprimento da maior folha. No entanto, a micorrização das plantas pode ser observada em todos os tratamentos durante o experimento. Além disso, as taxas de sobrevivências para todos os tratamentos foram altas. Sendo assim o método de aclimatização de mudas micorrizadas de *Hadrolaelia jongheana*, *Hoffmannseggella caulescens* e *H. cinnabarina*, desenvolvido neste trabalho, pode ser aplicado em projetos de conservação de espécies de orquídeas em risco de extinção que visam à reintrodução em áreas naturais.

Agradecimentos

À empresa BIOMA Meio Ambiente pelo apoio logístico no trabalho de campo na Mina de Alegria - Companhia Vale, Complexo de Mariana- MG; à UFV, CAPES, CNPq, FAPEMIG e American Orchid Society pelo apoio financeiro e/ou logístico.

Referências

AMARAL, T.L.; JASMIM, J.M.; ARAÚJO, J.S.P.; THIÉBAUT, J.T.L.; COELHOS, F.C.; FREITAS, C.B. Adubação de orquídeas em substratos com fibras de coco. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 11-19, 2010.

ASSAKAWA; R. H.; FARIA, S. L. de; ZONETTI, P.da C.uso de substratos alternativos na aclimatização de plântulas de *Laelia purpurata* Lindl (Orchidaceae). IV Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Cesumar, Centro Universitário de Maringá Paraná, 2008.

ASSIS, A.M.; FARICA, R.T.; COLOMBO, L.A.; CARVALHO, J.F.R.P. Utilização de substratos à base de coco no cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 27, n. 2, p. 255-260, 2005.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**, 2008.

BRUNDRETT, M.C; SCADE, A.; BATTY, A.L.; DIXON, K.W.; SIVASITHAMPARAM, K. 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, 2003.

- CLEMENTS, M.A. Orchid Mycorrhizal associations. **Lindleyana**, v. 3, p. 73-86, 1988.
- CRIBB, P.J.; KELL, S.P.; DIXON, K.W.; BARRET, R.L. Orchid conservation: a global perspective. In: DIXON, K.W., KELL, S.P., BARRET, R.L. & CRIBB, P.J. (Eds). **Orchid Conservation**. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah, 2003.
- DEARNALEY, J.D.W. Further Advances in Orchid Mycorrhizal. **Research. Mycorrhiza**, v. 17, p 475-486, 2007.
- DORNELES, L. T.; TREVELIN, V. Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. **Iheringia**, v. 66, n.2, p. 167-174, 2011.
- DRUMMOND, G.M.; MACHADO, A.B.M.; MARTINS, C. S.; MENDONÇA, M.P.; STEHMANN, J.R. Listas **Vermelhas das espécies ameaçadas de extinção em Minas Gerais**. Fundação Biodiversitas, 2008.
- GIRLANDA, M.; SELOSSE, M.A.; CAFASSO, D. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 491–504, 2006.
- KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária, 2000.
- KRAUS, J.E. & ARDUIN, M.. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR (Editora universidade Rural). 107p., 1997.
- KRISTIANSEN, K.A.; RASMUSSEN F.N.; RASMUSSEN H.N. Seedlings of *Neuwiedia* (Orchidaceae subfamily Apostasioideae) have typical orchidaceous mycotrophic protocorms. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 956–959, 2001.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc. 523p. ,1940,
- LONE, A.B.; BARBOSA, C.M.; TAKAHASHI, L.S.A.; FARIA, R.T. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 4, p. 465-469, 2008.
- MORAES, L.M.; CAVALCANTE, L.C.D.; FARIA, R. T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 24, n. 5, p. 1397-1400, 2002.

- OTERO, J.T.; BAYMAN, P. & ACKERMAN, J.D. Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata in vitro*: the potential for natural selection. **Evolutionary Ecology**, v. 19, p. 29-43, 2005.
- PEREIRA, M.C.; TORRES, D.P.; GUIMARÃES, F.A.R.; PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M. 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, n. 3, p. 534-541, 2011.
- PEREIRA, O.L.; ROLLEMBERG, C.L.; KASUYA, M.C.M. Associações micorrízicas em orquídeas: perspectivas e utilização em programas de propagação simbiótica. **Orquidário**, v.6, n.2, p.40-44, 2002.
- PORRAS-ALFAROS, A. e BAYMAN, P. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. **Mycologia**, v. 99, n. 4, p. 510-525, 2007.
- RASMUSSEN, H. N. **Terrestrial Orchid: from seed to mycotrophic plant**. New York: Crambridge University Press. p. 444, 1995.
- SANTOS, M.N.; TEIXEIRA, M.L.F. Semente de amendoeira (*Terminalia catappa* L.) (Combretaceae) como substrato para o cultivo de orquídeas epífitas. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 339-343, 2010.
- SCHNITZER, J. A.; FARIA, R. T.; VENTURA, M. U.; SORACE, M. Substratos e extrato pirolenhoso no cultivo de orquídeas brasileiras *Cattleya intermedia* (John Lindley) e *Miltonia clowesii* (John Lindley) (Orchidaceae). **Acta Scientiarum Agronomy**. v. 32, n. 1, p. 139-143, 2010.
- SEENI, S.; LATHA, P.G. *In vitro* mutiplication and ecorehabitation of the endangered Blue Vanda. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 61, n. 1, p. 1-8, 2000.
- SHEFFERSON, R.P.; WEISS, M.; KULL, T.; TAYLOR, D.L. High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady 'slipper orchids, genus *Cypripedium*. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 613 – 626, 2005.
- SILVA, F.S.C.; SILVA, S.P.C. O substrato na cultura das orquídeas, sua importância, seu envelhecimento. **Revista Oficial da Orquidário**, v. 11, n. 1, p. 3-10, 1997.
- STEFANELLO, S.; SILVEIRA, E.V.; OLIVEIRA, K.O.; BESSON, J.C.F.; DUTRA, G.M.N. Eficiência de substratos na aclimatização de plantas de *Miltonia flavescens*

Lindl. propagadas *in vitro*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.3, p. 467-476, 2009.

TISSERANT, B.B.; BRENAC, V.; REQUENA, N.; JEFFRIES, P.; DODD, J.C. The detection of *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) forming mycorrhizas In three plants, at different stages of seedling development, using mycorrhiza-specific isozymes. **New Phytologist**, v. 138, p. 225–239, 1998.

TORRES, D.P.; BOCAYUVA, M.; GUIMARÃES, F.A.R.; OLIVEIRA, S.F.; VELOSO, T.G.R.; PEREIRA, M.C.; PEREIRA, O.L.; FONTANA, A.P.; FRAGA, C.N.; KASUYA, M.C.M. **Propagação simbiótica de *Hadrolaelia jongheana***. In: Anais do FertBio, Londrina, 2008.

TROUVELOT, A.; KOUGH, J. L.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Mesure du taux de mycorhization 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 Mycorrhiza** ed. Paris: INRA Pressa. P. 217-221, 1986.

TANG, M.; CHEN, H.; HUANG, J. C.; TIAN, Z. Q. AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. **Soil Biology & Biochemistry**, 41(5): 936-940, 2009

VALENCIA, W. H. **Avaliação de substratos orgânicos no cultivo de orquídeas nativas na APA Ilha do Combu, Belém, Pará, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Gestão de Recursos Naturais e Desenvolvimento Local) – Núcleo de Meio Ambiente, Universidade Federal do Pará, 2009.

VELOSO, T. G .R; BOCAYUVA, M. F.; OLIVEIRA, S. F.; FREITAS, E. F.; MELO, L. F.; OTONI, W. C.; KASUYA, M. C. **Propagação simbiótica de *Cattleya caulescens* (ORCHIDACEAE)**. In: Congresso Brasileiro de Ciência do solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2011.

YAMAKAMI, J. K.; FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; REGO-OLIVEIRA, L. V. Cultivo de *Cattleya* Lindley (Orchidaceae) em substratos alternativos ao xaxim. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, n. 4, p. 523-526, 2006.

ZETTLER, L. W. Terrestrial Orchid Conservation by symbiotic seed Germination: Techniques and perspectives. In: HIGGINS, W. E & WALSH B. W. (Eds.) **Orchid**

Conservation Proceedings: An International Conference on Orchid Conservation.

Florida, Selby Botanical Gardens Press, p. 51-57, 2001.

ZETTLER, L.W.; HOFER, C.J. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications.

Environmental and Experimental Botany, v. 39, n. 3, p. 189-195, 1998.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve sucesso na realização de algumas das principais etapas de conservação integrada de três espécies em risco de extinção da Floresta Atlântica, tornando possível agora realizar futuramente outras etapas importantes, tais como a reintrodução e “assisted migration” em áreas naturais.

Através da caracterização morfológica e molecular de 30 isolados de *Rizocthonia*-like, associados às orquídeas estudadas foi possível constatar que os todos isolados estão filogeneticamente próximos a cinco diferentes espécies de *Tulasnella*. Além disso, podemos supor que as espécies tropicais brasileiras, sejam elas epífitas ou rupícolas, são generalistas em suas associações com micorrizas do gênero *Epulorhiza*. Em termos de metodologia nesta etapa, as ferramentas moleculares podem ser consideradas mais eficazes e mais precisas nos estudos de levantamento e de identificação de micorrizas de orquídeas, mas que se faz necessário aprimorar os procedimentos de extração de DNA, já que em muitos casos não se obteve sucesso na etapa de amplificação. Pode se constatar também que a espécie *Hoffmannseggella cinnabarina* no ambiente de campos de altitude precisa ser amostrada novamente, pois não foi possível obter muitas amostras desta localidade.

Os ensaios de germinação proporcionam um maior entendimento dos padrões de associações micorrízicas destas orquídeas, pois foi possível supor que espécies epífitas são provavelmente menos dependentes que as espécies rupícolas. Além disso, foi ressaltado que os conceitos atuais sobre a relação fungo-orquídeas são baseados principalmente no caso das espécies terrestres, e mais recentemente das epífitas. Ou seja, o Brasil pode vir a enriquecer estas teorias considerando que apresenta uma grande diversidade de orquídeas de hábitos diferentes, a saber, epífitas, rupícolas e terrestres, ressaltando que o padrão de especificidade deste três tipos de orquídeas devem ser tratados separadamente.

A eficácia do isolado de *Epulorhiza* M65 proporcionou a produção de mudas de micorrizadas com êxito, seria interessante rever os delineamentos de produção na etapa de cultivo em frascos *in vitro* a fim de otimizar a produção de mudas. Além disso, podemos afirmar que este isolado apresenta grande potencial na elaboração de um protótipo de inóculo.

O método de aclimatização de mudas micorrizadas de *Hadrolaelia jongheana*, *Hoffmannseggella caulescens* e *H. cinnabarina*, desenvolvido neste trabalho foi eficaz,

já que apresentou elevadas taxas de sobrevivências para todos os tratamentos de substratos, cascalho, casa de eucalipto ou de *Pinus*, e que foi observada a permanência da à micorrização das plantas ao longo de cerca de 7 meses. No entanto, já podemos apontar mudanças necessárias no protocolo de aclimatização que poderia ser executado com plântulas com medidas iniciais maiores priorizando o uso do cascalho que se apresenta como um substrato mais promissor. Além disso, a aplicação de solução nutritiva em diferentes concentrações para se avaliar seu efeito sobre a colonização de fungos micorrízicos no sistema radicular, e caso não haja inibição destes, e sobre o desenvolvimento das plântulas.