

EMILIANE FERNANDA SILVA FREITAS

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS AO SISTEMA RADICULAR
DE *Gomesa recurva* EM DIFERENTES FORÓFITOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

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

T

F866d
2017 Freitas, Emiliane Fernanda Silva, 1991-
Diversidade de fungos associados ao sistema radicular de
Gomesa recurva em diferentes forófitos / Emiliane Fernanda
Silva Freitas. – Viçosa, MG, 2017.
viii, 30f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Catarina Megumi Kasuya.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.24-30.

1. Orchidaceae. 2. Micorriza. 3. *Ceratobasidium*.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

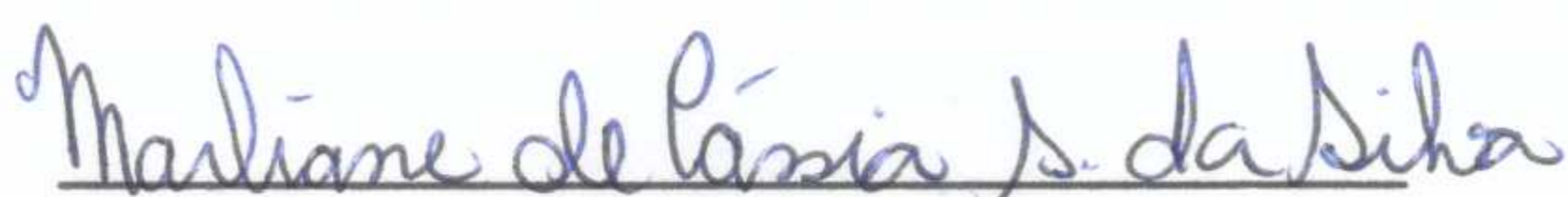
CDD 22 ed. 579.5

EMILIANE FERNANDA SILVA FREITAS

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS AO SISTEMA RADICULAR
DE *Gomesa recurva* EM DIFERENTES FORÓFITOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

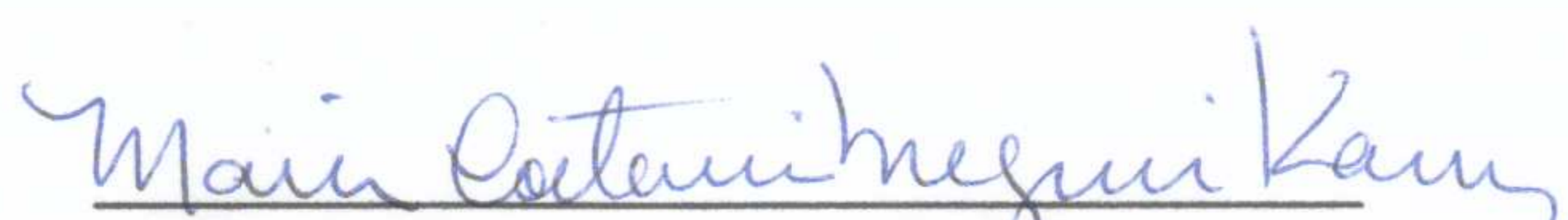
APROVADA: 24 de fevereiro de 2017.


Marliane de Cássia Soares da Silva


Sabrina Feliciano Oliveira


Meiriele da Silva


Mateus Ferreira Santana


Maria Catarina Megumi Kasuya
(Orientadora)

*“... Não é sobre chegar ao topo do mundo
E saber que venceu
É sobre escalar e sentir
Que o caminho te fortaleceu”.*
(Ana Vilela)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pelo aprendizado e oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao CNPq, Capes e Fapemig pelo apoio financeiro.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do DMB, em especial à Emília, ao Danilo e ao Sr. Paulo pela disposição em ajudar.

À professora Maria Catarina Megumi Kasuya, pela orientação, ensinamentos, amizade, e dedicação durante todos esses anos. Exemplo de caráter e profissionalismo.

Aos amigos do Laboratório de Associações Micorrízicas pelo aprendizado, agradável convivência e momentos de descontração, que tornaram meus dias mais leves.

Ao Grupo de Pesquisa em Micorrizas de Orquídeas, pelo imenso apoio e oportunidade de crescimento profissional.

À Melissa Bocayuva pela fundamental contribuição para coleta e identificação das orquídeas e forófitos, e também pela orientação.

Ao Merrinha pela disposição nas coletas e por auxiliar na identificação dos forófitos.

Ao Everaldo, pela amizade, imensa dedicação e contribuição na execução dos experimentos.

Ao Tomás, pela amizade durante todos estes anos, por ser sempre solícito e por sua contribuição na execução do trabalho.

À Letícia pela contribuição nos experimentos. Agradeço também ao Conrado, pela amizade e contribuição nas análises.

À Sabrina Feliciano Oliveira por aceitar o convite para compor a banca examinadora.

À Meiriele da Silva pela grande amizade e apoio, e por aceitar o convite para também fazer parte da banca examinadora.

Em especial à Marliane de Cássia Soares Silva pela disposição em ensinar, por contribuir diretamente na execução do trabalho, e por aceitar o convite para compor a banca examinadora.

Aos meus amigos de longa data pelo apoio e torcida. Em especial à Dinha pelas demonstrações de carinho.

Ao Ivan, agradeço por todo amor e compreensão, e pelo apoio em todos os momentos, especialmente naqueles de medo e insegurança.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor incondicional, por me apoiarem sempre e comemorarem comigo cada conquista.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização de mais esta etapa.

Ao Bom Deus pela proteção, pela constante presença em minha vida, por renovar minhas forças sempre que precisei, e por me presentear com pessoas maravilhosas.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

EMILIANE FERNANDA SILVA FREITAS é filha de Fernando Lopes Rosado de Freitas e Maria das Dores Silva Freitas, nasceu em Viçosa, Minas Gerais em 09 de janeiro de 1991. Em março de 2009 ingressou na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, e graduou-se em Agronomia em janeiro de 2015. Em março de 2015 iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da UFV.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1 Coleta de amostras	5
2.2 Extração de DNA a partir do sistema radicular de <i>G. recurva</i>	6
2.3 Análise do perfil da comunidade de fungos em <i>G. recurva</i>	7
Amplificação da região ITS	7
Eletoforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)	8
Análises do perfil de fungos	9
2.4 Sequenciamento e análises das sequências	9
3. RESULTADOS	10
3.1 Perfil da comunidade fúngica em <i>G. recurva</i> associada a diferentes forófitos	10
3.2 Influência do forófito sobre o perfil de fungos em <i>G. recurva</i> revelado por DGGE	13
3.3 Comunidade de fungos associados a <i>G. recurva</i> revelados a partir do sequenciamento da região ITS	14
Composição da comunidade fúngica	14
Diversidade da comunidade fúngica	15
Influência do forófito na comunidade de fungos em <i>G. recurva</i>	16
4. DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÕES	23
6. REFERÊNCIAS	24

RESUMO

FREITAS, Emiliane Fernanda Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Diversidade de fungos associados ao sistema radicular de *Gomesa recurva* em diferentes forófitos.** Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Coorientadores: Denise Mara Soares Bazzoli, Marc-André Selosse e Melissa Faust Bocayuva Cunha.

Além de ser a mais diversa entre todas as Angiospermas e ser amplamente distribuída entre todos os continentes, a família Orchidaceae destaca-se por ser aquela que apresenta maior número de espécies epífitas. As orquídeas apresentam como característica comum sementes sem endosperma, necessitando da associação com fungos micorrízicos para suprir a necessidade de carbono e outros nutrientes e, assim, viabilizar a germinação. Dessa forma, a compreensão dos fatores que definem os parceiros simbióticos das orquídeas é fundamental para garantir a conservação da família. O objetivo do presente trabalho foi verificar influência do forófito no perfil da comunidade fúngica associada ao sistema radicular de *Gomesa recurva*, uma orquídea epífita. Os resultados mostraram baixa similaridade entre a comunidade fúngica das orquídeas em uma mesma espécie de forófito, indicando que o forófito não tem influência direta na comunidade de fungos de *G. recurva*. Este resultado foi confirmado por sequenciamento, que também revelou que esta orquídea se associa principalmente com o gênero *Ceratobasidium*. Este é o primeiro estudo que investiga, a partir de técnicas independentes de cultivo, a relação de fungos em orquídeas epífitas e o forófito ao qual estas plantas estão associadas.

ABSTRACT

FREITAS, Emiliane Fernanda Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Diversity of fungi associated with the *Gomesa recurva* root system in different forophytes.** Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-advisers: Denise Mara Soares Bazzoli, Marc-André Selosse and Melissa Faust Bocayuva Cunha.

Besides to being the most diverse among all Angiosperms and being widely distributed among all continents, the Orchidaceae family stands out as having the highest number of epiphytic species. Orchids have as a common characteristic seeds without endosperm, necessitating the association with mycorrhizal fungi to supply the need for carbon and other nutrients and, thus, enable germination. In this way, the understanding of the factors that define the symbiotic partners of the orchids is fundamental to ensure the conservation of the family. The objective of this work is to evaluate the influence of forophytes on the diversity profile of fungi community associated with *Gomesa recurva*, an epiphyte species. The results showed low similarity between orchid's fungi community in the same forophyte species, indicating that the forophyte has no direct influence on the fungal community of *G. recurva*. This result was confirmed by sequencing, which also revealed that the species is mainly associated with *Ceratobasidium*. This is the first study that investigates, from culturing independents techniques, the relation of fungi in epiphytic orchids and the phorophyte to which these plants are associated.

1. INTRODUÇÃO

Orchidaceae é a maior família entre as Angiospermas, com mais de 27.000 espécies descritas, distribuídas entre cerca de 740 gêneros (Chase *et al.*, 2015). A família é composta por cinco subfamílias: Apostasioideae, Vanilloideae, Cyripedioideae, Orchidoideae e Epidendroideae, sendo a última a mais diversa delas, com 19.785 espécies (Cribb *et al.*, 2003).

As orquídeas estão distribuídas em uma grande variedade de habitats, com espécies adaptadas desde florestas tropicais até regiões de tundra boreal (Gebauer & Meyer, 2003). Entretanto, a distribuição varia entre os continentes e até mesmo entre regiões, sendo a faixa tropical a mais rica em diversidade (Cribb *et al.*, 2003).

Aproximadamente 205 gêneros e 2.650 espécies ocorrem no Brasil e cerca de 1.800 são endêmicas (Giulietti *et al.*, 2005). A Mata Atlântica destaca-se entre os biomas brasileiros pela diversidade de orquídeas, com cerca de 1.250 espécies descritas (Stehmann *et al.*, 2009).

A família Orchidaceae destaca-se também por ser um modelo de coevolução e interação com outros organismos, tais como insetos e outros polinizadores, simbiontes fúngicos importantes para germinação das sementes, e espécies lenhosas usadas como forófitos pelas espécies epífitas (Rasmussen *et al.*, 2015).

O hábito epífita é muito comum entre as orquídeas. Aproximadamente cerca de 19.000 espécies são epífitas, a maioria deles pertencem a subfamília Epidendroideae (Zotz, 2013). As orquídeas epífitas usam as árvores como forófitos e, além de servir como suporte para as orquídeas, eles oferecem sítios ideais para a germinação, bem como contribuem com carbono orgânico para os simbiontes (Rasmussen, 2015).

As sementes das orquídeas são produzidas dentro de frutos chamados cápsulas. Cada cápsula exibe até quatro milhões de sementes que medem de 0,05 a 6 mm e pesam de 0,31 a 24 µg (Roberts & Dixon, 2008). Outra característica das sementes das orquídeas é a ausência de endosperma suficiente para garantir a germinação do embrião e o estabelecimento das mudas. Dessa forma as sementes necessitam de uma fonte externa de

carbono e outros nutrientes que são fornecidos através da associação com fungos micorrízicos (Rasmussen, 1995).

Os simbiontes fúngicos colonizam as células vegetais e formam enovelados de hifas, chamados *pelotons* (Brundrett, 2004). A transferência de carbono para a célula vegetal ocorre por meio da degradação dos *pelotons*, tornando possível a germinação e auxiliando no estabelecimento das plantas (Dearnaley *et al.*, 2012).

Embora seja bem aceito que os protocormos dependam dos fungos micorrízicos, a natureza da relação entre orquídeas adultas e seus simbiontes ainda vem sendo discutida (McCormick *et al.*, 2006). Quando a primeira folha emerge a maioria das espécies de orquídeas torna-se fotossintética, e deixam de ser micoheterotófica (Lewis, 2016). No entanto, a maioria das espécies mantém a interação com fungos micorrízicos ao longo do ciclo de vida, dessa forma, parte do carbono é adquirido pela fotossíntese e outra parte é obtida a partir dos simbiontes fúngicos (Dearnaley *et al.*, 2012). Outras espécies aclorofiladas são totalmente dependentes da associação com fungos micorrízicos em todo ciclo de vida (Leake, 1994).

Nos primeiros estudos a respeito da interação micorrízica em orquídeas, foi sugerido que a associação é uma via de mão única, na qual o fungo fornece carbono e outros nutrientes à orquídea, e a orquídea fotossintética não é capaz de fornecer qualquer benefício nutricional ao fungo (Alexander & Hadley, 1985). Entretanto, atualmente sabe-se que a associação em orquídeas pode ser caracterizada como mutualista, com significativa troca de nutrientes entre a orquídea e o fungo (Cameron *et al.*, 2006, 2008). Nesta rede mutualística, a troca de carbono pode ocorrer até entre orquídeas e plantas de outras espécies conectadas pelo fungo micorrízico, uma vez que o mesmo fungo pode colonizar diversas plantas simultaneamente (Julou *et al.*, 2005).

As orquídeas se associam, principalmente, com fungos basidiomicetos do grupo rizoctonióides, um grupo polifilético que inclui taxa pertencentes às famílias Sebacinaceae, Ceratobasidiaceae e Tulasnellaceae (Dearnaley *et al.*, 2012; Martos *et al.*, 2012; Pecoraro *et al.*, 2015; Jacquemyn *et al.*, 2016; Khamchatra *et al.*, 2016). Entretanto, fungos ectomicorrízicos como Thelephoraceae e Cortinariaceae também tem sido relatados em espécies

de *Cephalanthera damasonium* clorofiladas e aclorofiladas, ao mesmo tempo em que poucos fungos rizoctonioides foram identificados (Julou *et al.*, 2005). Em *Epipactis microphylla* foi relatada pela primeira vez a associação com um fungo Ascomycota com típica formação de *pelotons* nas células do córtex (Selosse *et al.*, 2004).

Muitos trabalhos já foram realizados com o objetivo de identificar os simbiontes micorrízicos associados ao sistema radicular das orquídeas brasileiras. Os gêneros *Thanatephorus*, *Tulasnella* e *Ceratobasidium* têm sido descritos em associação com orquídeas em Campos Rupestres (Nogueira *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2014). Em regiões de Mata Atlântica os gêneros *Thanatephorus*, *Ceratobasidium* (Pereira *et al.*, 2005b) e *Tulasnella* (Pereira *et al.*, 2009) também foram identificados a partir de raízes de orquídeas epífitas e terrestres.

Em um estudo desenvolvido com sete espécies de orquídeas brasileiras, *Tulasnella* e *Ceratobasidium* foram identificados como os gêneros mais comuns associados a orquídeas (Pereira *et al.*, 2005a). Em outro estudo realizado com espécies ameaçadas de extinção, fungos pertencentes às ordens Cantharellales e Sebacinales foram relatados (Oliveira *et al.*, 2014).

Juntamente com estudos de diversidade de fungos micorrízicos em orquídeas, outra vertente que tem sido investigada nesse tipo de interação é a especificidade micorrízica, um importante fator na conservação da Família Orchidaceae (Jacquemyn, 2010). Embora vários trabalhos mostrem que algumas espécies de orquídeas apresentam uma baixa ou intermediária especificidade nas relações simbióticas com os fungos micorrízicos (Selosse *et al.*, 2004; Jacquemyn, 2010; Martos *et al.*, 2012), outras espécies são vistas como especialistas (Dearnaley, 2007; Dearnaley *et al.*, 2012).

Os fatores que determinam os parceiros simbióticos das orquídeas e a especificidade da relação, ainda são pouco conhecidos. Orquídeas de grupos relacionados tendem a estar associadas com o mesmo grupo de fungos (Martos *et al.*, 2012), mas a influência do forófito na relação entre orquídeas epífitas e seus fungos micorrízicos é ainda desconhecida. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi investigar a influência do forófito no perfil da comunidade de fungos associados à *Gomesa recurva*, uma espécie epífita.

Nós respondemos as seguintes questões: (1) O perfil da comunidade de fungos associados a *G. recurva* é controlado pelos forófitos? (2) *G. recurva* pode apresentar maior ou menor diversidade de fungos de acordo com o forófito ao qual ela está associada? (3) *G. recurva* tem tendência a ser generalista ou especialista em suas associações simbióticas?

Gomesa recurva é uma orquídea epífita pertencente a subfamília Epidendroideae. A espécie é Holoepífita facultativa e ocorre predominantemente em Floresta Sazonal Semidecídua e em Floresta Ombrófila Densa (Neto *et al.*, 2009). Esta orquídea é comumente encontrada em baixa a média altura nos troncos das árvores, e requer menor luminosidade e maior umidade que a maioria das espécies de orquídeas epífitas (Miller *et al.*, 2006).

Para avaliar a comunidade micorrízica em *G. recurva* foi utilizada a técnica *Nested* Reação em Cadeia da Polimerase com Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (Nested-PCR-DGGE) da região espaçadora interna transcrita (ITS) do rDNA de fungos. Esta ferramenta permite avaliar a variação da comunidade microbiana de ambientes com baixa riqueza de espécies (Mitchell & Zuccaro, 2006), com custo relativamente baixo (Hoshino & Morimoto, 2008). A região ITS tem sido usada para monitorar o perfil da comunidade de fungos em amostras ambientais a partir de Nested-PCR-DGGE (Korkama *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2009; Curlevski *et al.*, 2010), incluindo estudos de diversidade de fungos endofíticos em orquídeas (Tao *et al.*, 2008). Adicionalmente, realizou-se Sequenciamento de Nova Geração para identificar os principais grupos de fungos associados às raízes de *G. recurva*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras

Amostras de *G. recurva* foram coletadas em uma área localizada na Trilha do Encontro, na sede do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), no município de Araponga, Minas Gerais. O parque está situado no extremo norte da Serra da Mantiqueira, ocupando uma área de 14.984 hectares e abrange oito municípios do estado de Minas Gerais, com altitudes que podem alcançar mais de 1900 m. A vegetação do PESB é composta por Mata Atlântica, intercalada com os campos de altitude e afloramentos rochosos (IEF, 2016).

Gomesa recurva foi coletada em cinco espécies de forófitos diferentes, sendo que em cada espécie foram amostrados três indivíduos de orquídea (Tabela 1). Para cada orquídea três raízes foram coletadas, totalizando nove amostras de raízes de orquídeas por espécie de forófito. Todo material foi armazenado sob refrigeração e, em seguida, transportado para o Laboratório de Associações Micorrízicas (DMB/BIOAGRO/UFV, Viçosa/MG).

Tabela 1: Identificação das amostras de *Gomesa recurva* coletadas nos respectivos forófitos. Para cada indivíduo de orquídea foram amostradas três fragmentos de raízes.

Forófito		Identificação das amostras
Família	Espécie	
Euphorbiaceae	<i>Alchornea triplinervia</i>	AT1; AT2; AT3
Melastomataceae	<i>Miconia</i> sp.	Msp1; Msp2; Msp3
Apocynaceae	<i>Himatanthus sucuuba</i>	HS1; HS2; HS3
Primulaceae	<i>Rapanea gardneriana</i>	RG1; RG2; RG3
Moraceae	<i>Sorocea bonplandii</i>	SB1; SB2; SB3

As raízes foram lavadas superficialmente em água corrente para retirar restos de musgos e outros resíduos. Para confirmação da colonização, amostras aleatórias de raízes foram segmentadas com auxílio

de bisturi sob estereomicroscópio SZX7 (Olympus) para observação de *pelotons* (Figura 1C e 1D). Em seguida, os primeiros três centímetros das raízes, a partir da base (porção mais próxima do rizoma), foram segmentados e armazenados em uma solução tampão a base de dodecil sulfato de sódio (SDS) a -20 °C até a extração de DNA.

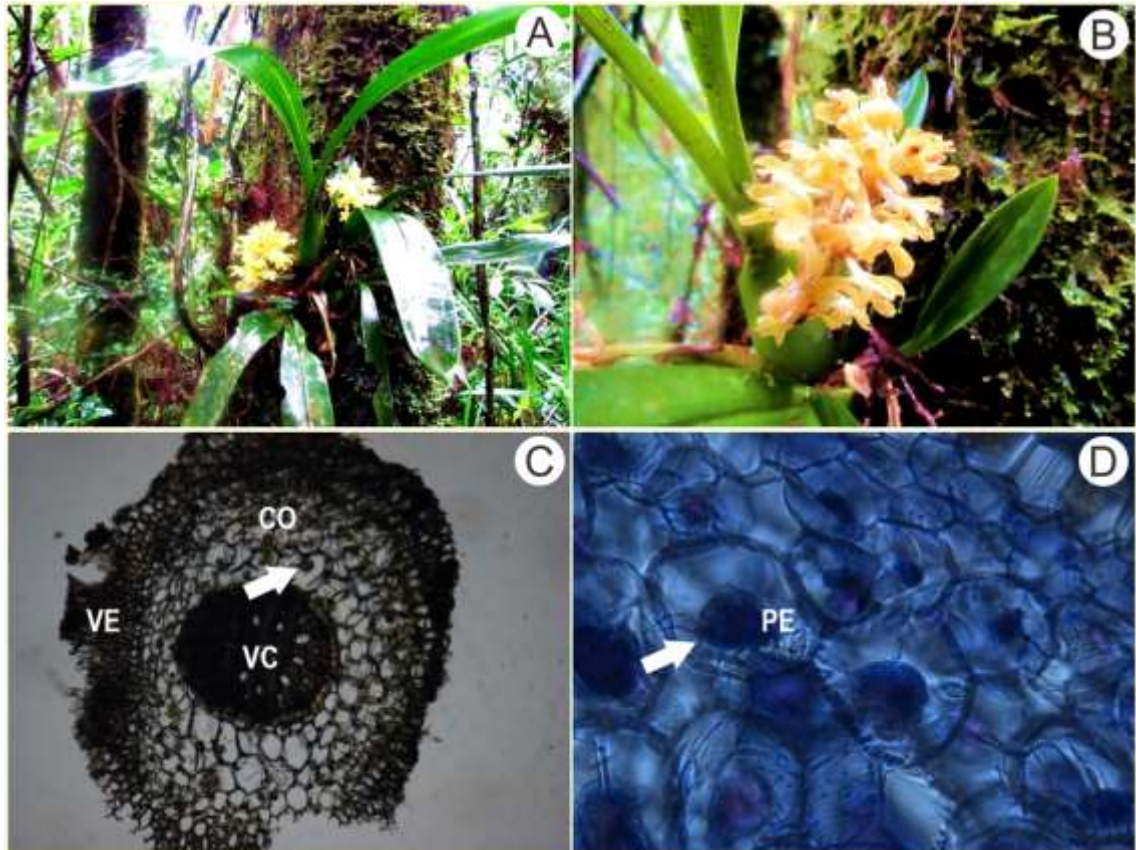


Figura 1: *Gomesa recurva* e a confirmação da colonização micorrízica em seu sistema radicular. A) *G. recurva* sobre forófito; B) detalhes das flores de *G. recurva*; C) corte transversal do sistema radicular de *G. recurva* com velame (VE), córtex (CO) e tecido vascular (VC). É possível notar a presença de *pelotons* (PE) no córtex (seta); D) detalhe dos *pelotons* (PE) nas células do córtex, com hifas conectando células (seta).

2.2 Extração de DNA a partir do sistema radicular de *G. recurva*

A extração do DNA do sistema radicular das orquídeas, juntamente com os fungos que as colonizam, foi realizada utilizando o kit Nucleospin Soil (Macherey-Nagel), de acordo com as instruções do fabricante. Ao final 70 µl de DNA foram obtidos a partir de cada amostra. A integridade do DNA foi confirmada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV em fotodocumentador L-Pix-CHemi (Loccus, São

Paulo, SP, Brazil). O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro L-Quant (Loccus).

2.3 Análise do perfil da comunidade de fungos em *G. recurva*

Amplificação da região ITS

As amostras de DNA total obtidas foram submetidas à amplificação da região ITS do rDNA por Nested-PCR utilizando dois pares de primers (Tabela 2). A região ITS foi escolhida para este estudo por ser mais precisa e apresentar maior potencial do que a região 18S no estudo de comunidades fúngicas (Liu *et al.*, 2015).

Na primeira reação de PCR foi amplificada a região ITS, incluindo a região 5.8S do rDNA e as regiões flanqueadoras ITS1 e ITS2, com o par de primers ITS1F/ITS4OF em um volume total de 50 µL contendo: 1 µL DNA molde (20 ng/µl), 10 µL de tampão 5X, 2 µL de cada primer (5 µM), 2 µl de dNTP (10 mM), 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.25 µL de Go Taq™ (Promega, Madison, USA) e 28,75 µL de água Mili-Q. As condições de ciclo foram: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguido por 39 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 50 °C e 1 min a 72 °C; e uma extensão final a 72 °C por 7 min. O controle negativo foi realizado com a adição e 1 µL de água Mili-Q ao invés do DNA.

A segunda reação de Nested PCR para amplificação da região ITS2 a partir dos amplicons anteriores, foi realizada com o par de primers ITS86F e ITS4-GC (para a adição de grampo GC) em 50 µL de mistura contendo: 1 µl do produto de amplificação do primeiro PCR, 10 µL de tampão 5X, 2 µL de cada primer (5 µM), 2 µl de dNTP (10 mM), 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.25 µL Go Taq™ and 28,75 µL de água Mili-Q. Nesta reação de PCR as condições de ciclo foram desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguido por 40 ciclos de 45 seg a 94 °C, 45 seg a 55 °C e 45 seg a 72 °C; e uma extensão final a 72 °C por 10 min. Amplificações ocorreram no termociclador My Cycler Thermo-cycler (Bio-Rad).

Produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% (w/v), corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz UV em fotodocumentador L-Pix-CHemi (Loccus, São Paulo, SP, Brazil) para checar tamanho e integridade dos fragmentos amplificados.

Tabela 2: Primers utilizados para amplificação da região ITS.

Primer	Sequência (5' – 3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
ITS1F (forward)	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	603	(Gardes & Bruns, 1993)
ITS4OF (reverse)	GTTACTAGGGGAATCCTTGTT		(Taylor & McCormick, 2008)
ITS86F (forward)	GTGAATCATCGAATCTTTGAA	314	(Turenne <i>et al.</i> , 1999)
ITS4-GC (reverse)	CGCCCGGGGCGCGCCCGGG CGGGGCGGGGCACGGGGG TCCTCCGCTTATTGATATGC		(White <i>et al.</i> , 1990)

Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

Os produtos de amplificação do Nested-PCR foram analisadas por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) em DCode™ (BIO-Rad, California, USA). Um volume de 20 µL de DNA foram aplicados em um gel de acrilamida 8% (w/v) com gradiente desnaturante de 35% a 55% (onde 100% corresponde a 7 mol L⁻¹ de uréia e 40% de formamida).

Os amplicons obtidos a partir das raízes de orquídeas coletados em cada forófito foram carregados separadamente em cada gel, totalizando cinco géis com nove amostras cada. Em seguida, os amplicons das três raízes de uma mesma orquídea foram misturados formando uma amostra composta, e então carregadas em único gel para analisar a influência do forófito no perfil de fungos de *G. recurva*.

O DNA extraído a partir de isolados da coleção de fungos micorrízicos de orquídeas do Laboratório de Associações Micorrízicas (DMB/ BIOAGRO/ UFV) foram utilizados como molde para as reações de PCR com os primers ITS1F/ITS4OF. Os produtos desta primeira reação foram amplificados por Nested-PCR com o par de primers ITS86F/ITS4GC, e os amplicons obtidos usados como marcadores externos no gel de DGGE.

A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X (Tris/Ácido acético/ EDTA, pH 8,0 a 100 V por 12 h a 60 °C. Após a eletroforese, os géis foram corados por 40 min em tampão TAE 1X com Syber Gold (Molecular Probes,

Leiden, The Netherlands) e visualizado sob luz UV em fotodocumentador L-PIX Image EX (Loccus Biotechnology).

Análises do perfil de fungos

Análises do perfil de bandas geradas pelo DGGE foram realizadas utilizando o software Bionumerics, versão 6.0, e os marcadores externos foram utilizados para normalização das bandas. Bandas distintas foram consideradas pertencentes a diferentes unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Coeficiente de similaridade de Jaccard foi utilizado para comparar o perfil de bandas gerado pelo DGEE em cada amostra, e dendrogramas foram construídos usando o método de agrupamento UPGMA.

2.4 Sequenciamento e análises das sequências

A região ITS1 dos fungos foi sequenciada na plataforma Illumina Miseq, gerando sequências de aproximadamente 250 pb.

As sequências foram analisadas utilizando o software Quantitative Insights Into Microbial Ecology Software (QIIME 1.8.0) (Caporaso *et al.* 2010), de acordo com Brazilian Microbiome Project para região ITS (Pylro *et al.* 2014). Os *reads* foram submetidos a processos de limpeza para remoção de sequências de baixa qualidade. A região ITS1 foi extraída utilizando o software ITSx, descartando assim as regiões flangeadoras 18S e 5.8S (Bengtsson-Palme *et al.*, 2013). Somente as sequências de alta qualidade com comprimento mínimo de 140 pb foram utilizadas para serem agrupadas em OTUs com 97% de identidade. Cada OTU foi anotada usando o banco de dados UNITE (Koljalg *et al.*, 2014). A riqueza e os índices de diversidade de Shannon e Simpson foram calculados utilizando o pacote iNEXT (Chao *et al.*, 2014) no software R (versão 3.2.5) (R Core Team, 2016). A análise de coordenadas principais (PCoA) foi realizada utilizando a distância de Bray-Curtis e plotada pelo Software Canoco (versão 4.5, Biometris, Wageningen, Netherlands). A ferramenta online Jvenn (Bardou *et al.*, 2014) foi utilizada para plotar os diagramas de Venn.

3. RESULTADOS

3.1 Perfil da comunidade fúngica em *G. recurva* associada a diferentes forófitos

O perfil de bandas obtido a partir da técnica Nested-PCR-DGGE revelou os perfis das comunidades de fungos nas amostras de *G. recurva* em cada forófito (Figuras 2A - 6A). Os perfis das diferentes amostras foram comparados por meio do índice de similaridade de Jaccard, e agrupadas pelo método UPGMA. A partir dos dendogramas gerados notamos baixa similaridade entre o perfil de fungos colonizando orquídeas associadas a uma mesma espécie de forófito, e também entre raízes de uma mesma orquídea (figuras 2B - 6B).

Entre as amostras de *G. recurva* associadas ao forófito *A. triplinervea*, as raízes da planta 2 agruparam com aproximadamente 40% de similaridade, enquanto a planta 3 aproximadamente 55% (Figura 2B). A partir do dendograma das orquídeas associadas a *R. gardneriana* notamos que apenas um indivíduo exibiu similaridade maior que 60% entre suas 3 raízes (Figura 3B). No forófito *H. succuba* as amostras de *G. recurva* não exibiram um padrão de agrupamento, indicando baixa similaridade entre os perfis da comunidade fúngica (Figura 4B). Resultado semelhante foi observado para indivíduos associados aos forófitos *Miconia* sp. e *S. bomplandii* (Figuras 5B e 6B, respectivamente).

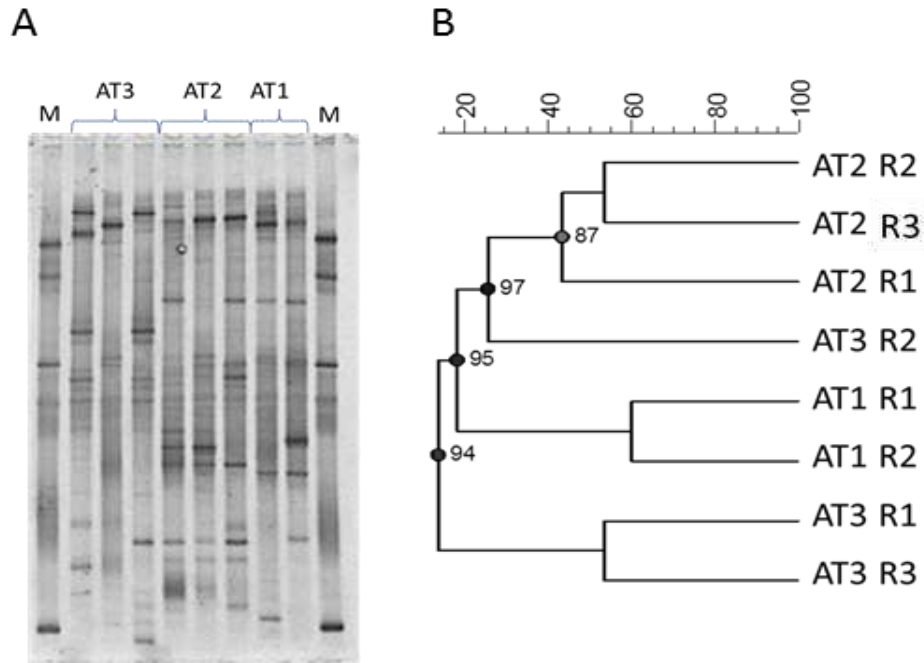


Figura 2: Análise de agrupamento UPGMA com índice de similaridade de Jaccard obtidas a partir de DGGE da comunidade de fungos nas raízes de *G. recurva* associadas ao forófito *A. triplinervea*. A) Padrão de bandas de amostras do sistema radicular utilizando a região ITS2; B) Dendograma. AT = *A. triplinervea*; R1, R2, R3 = repetições de raízes; M = marcadores; escala = similaridade (%).

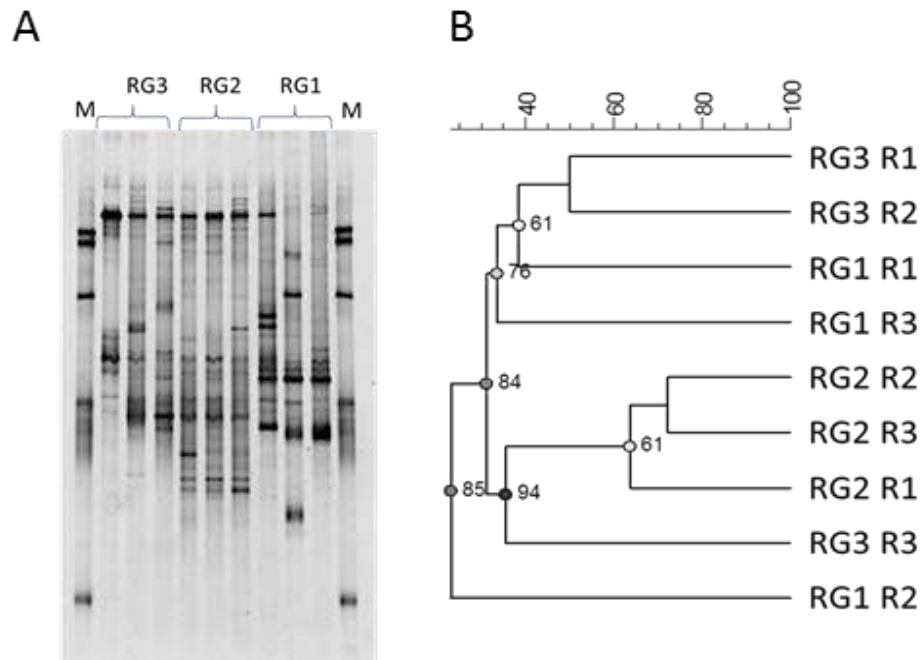


Figura 3: Análise de agrupamento UPGMA com índice de similaridade de Jaccard obtidas a partir de DGGE da comunidade de fungos nas raízes de *G. recurva* associadas ao forófito *R. gardneriana*. A) Padrão de bandas de amostras do sistema radicular utilizando a região ITS2; B) Dendograma. RG = *R. gardneriana*; R1, R2, R3 = repetições de raízes; M=marcador; escala = similaridade (%).

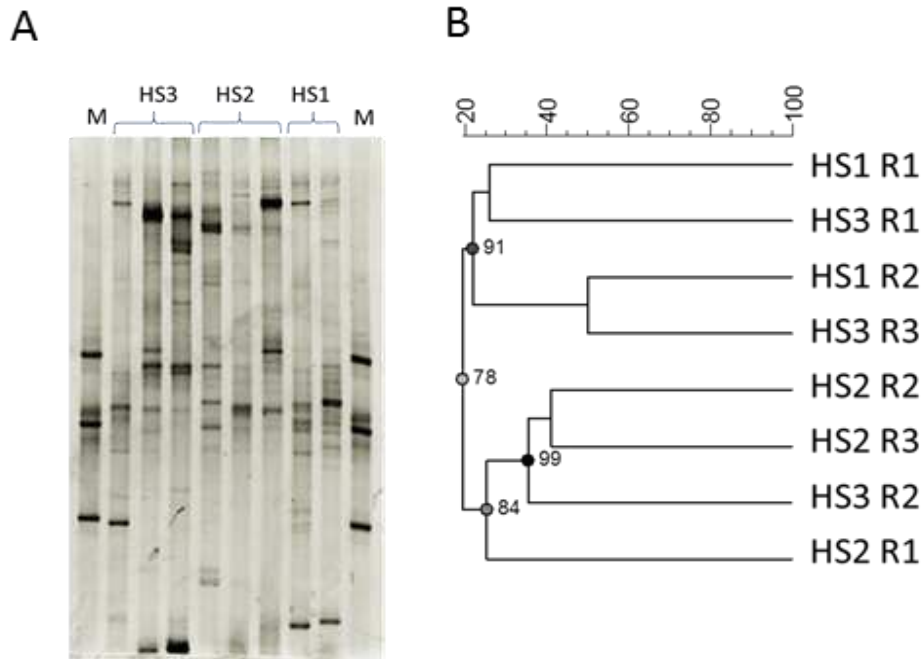


Figura 4: Análise de agrupamento UPGMA com índice de similaridade de Jaccard obtidas a partir de DGGE da comunidade de fungos nas raízes de *G. recurva* associadas ao forófito *H. succuba*. A) Padrão de bandas de amostras do sistema radicular utilizando a região ITS2; B) Dendrograma .HS = *H. succuba*; R1, R2, R3 = repetições de raízes; M = marcador; escala = similaridade (%).

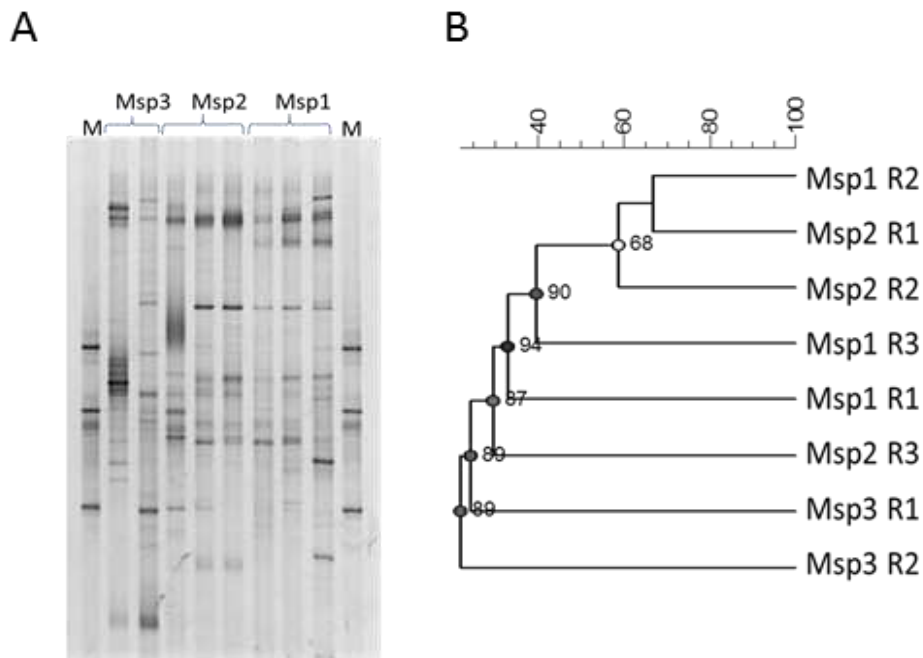


Figura 5: Análise de agrupamento UPGMA com índice de similaridade de Jaccard obtidas a partir de DGGE da comunidade de fungos nas raízes de *G. recurva* associadas ao forófito *Miconia sp.*. A) Padrão de bandas de amostras do sistema radicular utilizando a região ITS2; B) Dendrograma. Msp = *Miconia sp.*; R1, R2, R3 = repetições de raízes; M = marcador; escala = similaridade (%).

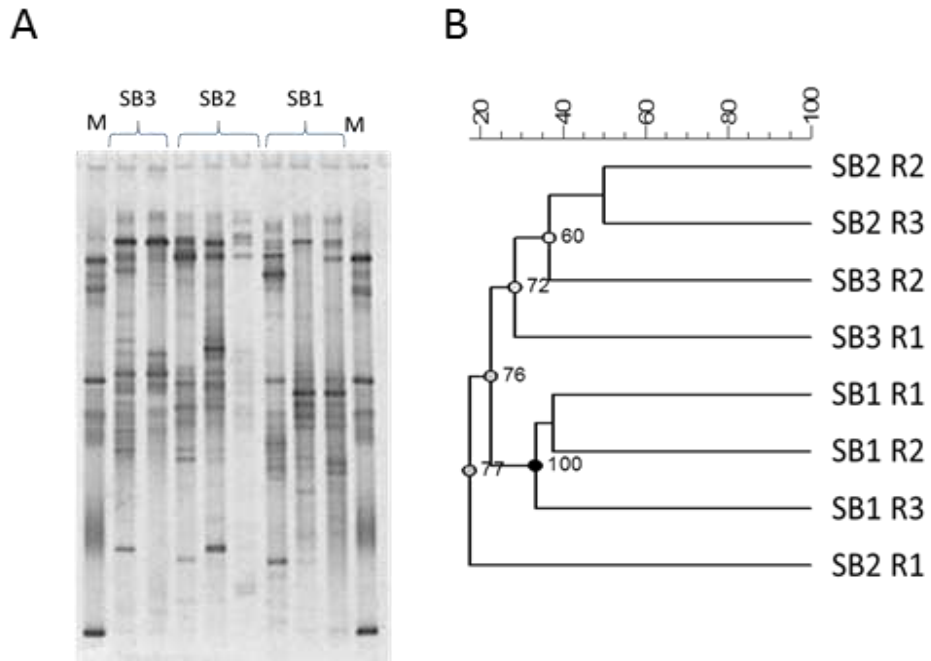


Figura 6: Análise de agrupamento UPGMA com índice de similaridade de Jaccard obtidas a partir de DGGE da comunidade de fungos nas raízes de *G. recurva* associadas ao forófito *S. bomplandii*. A) Padrão de bandas de amostras do sistema radicular utilizando a região ITS2; B) Dendograma. SB = *S. bomplandii*; R1, R2, R3 = repetições de raízes; M = marcador; escala = similaridade (%).

3.2 Influência do forófito sobre o perfil de fungos em *G. recurva* revelado por DGGE

Ao analisarmos o dendograma das amostras compostas de raízes de um mesmo indivíduo de orquídea (amostra com as 3 raízes misturadas) no seu respectivo forófito, observamos que não houve a formação de grupos para cada espécie de forófito (Figura 7B). Houve uma pequena tendência de 2 amostras no forófito *R. gardneriana* se agruparem, no entanto com baixa similaridade (menos que 40%). O mesmo foi observado para amostras nos forófitos *Miconia* sp. e *A. triplinervea*.

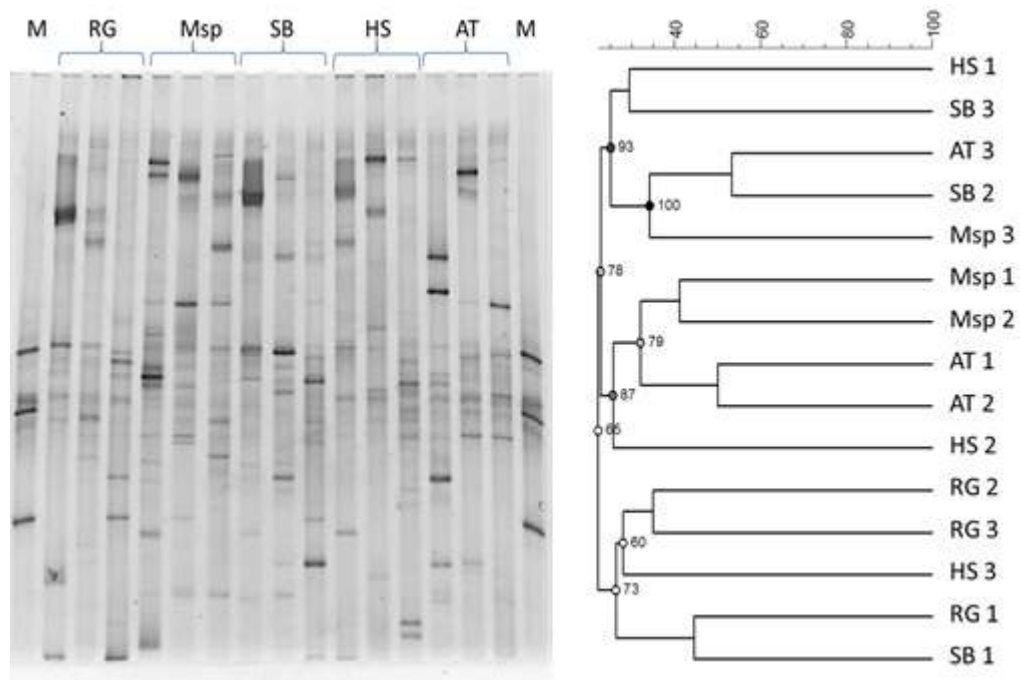


Figura 7: Análise de agrupamento UPGMA com índice de similaridade de Jaccard obtidas a partir de DGGE da comunidade de fungos nas raízes de *G. recurva* associadas aos diferentes forófitos. A) Padrão de bandas de amostras do sistema radicular utilizando a região ITS2; B) Dendrograma. AT = *A. triplinervea*; HS = *H. sucuuba*; Msp = *Miconia* sp.; RG = *R. gardneriana*; SB = *S. bomplandii*; M=marcador; escala=similaridade (%).

3.3 Comunidade de fungos associados a *G. recurva* revelados a partir do sequenciamento da região ITS

Composição da comunidade fúngica

Após eliminar as sequências de baixa qualidade, um total de 643 OTUs foram recuperadas. Para *G. recurva* associada aos forófitos *A. triplinervea*, *H. sucuuba*, *Miconia* sp., *R. gardneriana* e *S. bomplandii* obtivemos 118,152,107, 128 e 138 OTUs, respectivamente.

O número de sequências pertencentes ao filo Basidiomycota foi maior do que Ascomycota para os forófitos *H. sucuuba*, *R. gardneriana* e *S. bomplandii* (Figura 8). Dentro do filo Basidiomycota mais de 97% das sequências identificadas pertencem ao gênero *Ceratobasidium*. Não foi observada nenhuma sequência pertencente às famílias *Sebacinaceae* e *Tulasnellaceae*, frequentemente relatadas como fungos micorrízicos em orquídeas.

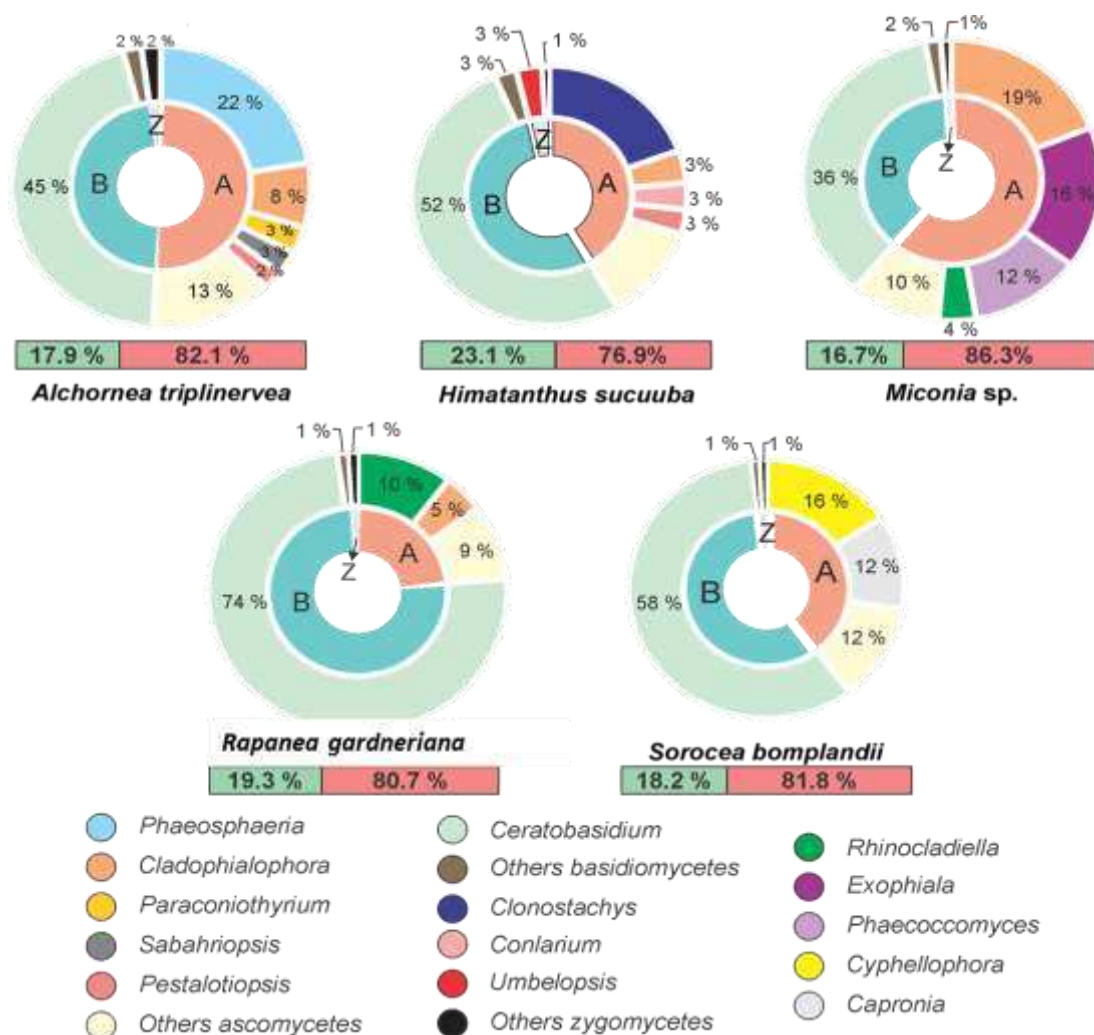


Figura 8: Composição da comunidade de fungos para *G. recurva* associada a diferentes forófitos. O tamanho total da barra representa 100% das OTUs encontrados em cada forófito, a parte verde o percentual de gêneros identificados e a parte vermelha o percentual de gêneros não identificados no banco de dados do UNITE. Os gráficos de pizza foram construídos tendo como base somente os gêneros identificados. A = Ascomycota; B = Basidiomycota; Z= Zygomycota.

Diversidade da comunidade fúngica

A partir dos gráficos de riqueza e diversidade observamos que a curva de rarefação apresentou uma tendência a saturação para as amostras coletadas em qualquer dos forófitos, indicando que o esforço amostral foi suficiente para cobrir a diversidade fúngica de *G. recurva*.

Maiores valores de riqueza, índice de Shannon e índice de Simpson foram observados nas raízes de *G. recurva* associada ao forófito *H. succuba*, enquanto as orquídeas associadas à *Miconia* sp. apresentaram menores valores (Figura 9).

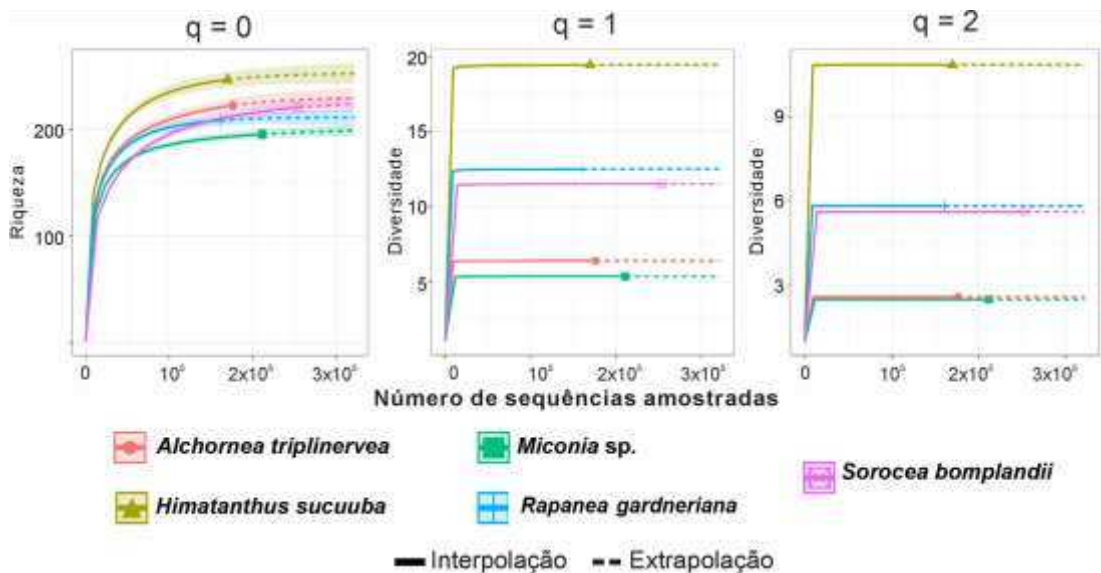


Figura 9: Riqueza e diversidade de fungos no sistema radicular *G. recurva* em cinco forófitos distintos. Os números de Hill $q = 0, 1$ e 2 , indicam medidas de riqueza de espécies, diversidade de Shannon e diversidade de Simpson (D), respectivamente. Linhas sólidas = curva de rarefação; linhas pontilhadas = extrapolação.

Influência do forófito na comunidade de fungos em *G. recurva*

O diagrama de Venn nos mostra que mais de 25% das OTUs foram comuns entre *G. recurva* em todos os forófitos. A porcentagem de OTUs que ocorrem exclusivamente em um forófito variou de 3,2% a 8,7%.

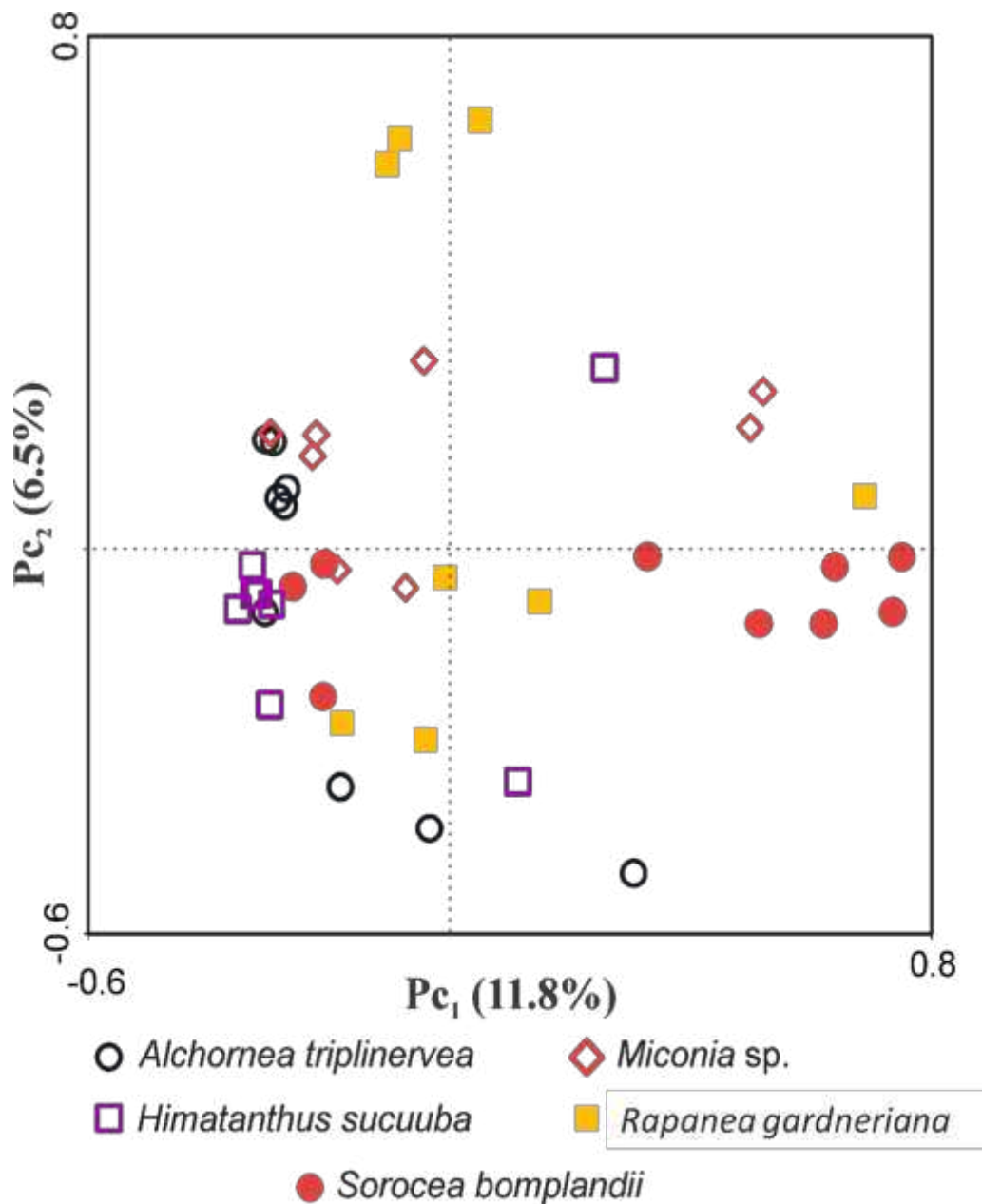


FIGURA 11: Análise de componentes principais (PCA) para a comunidade de fungos colonizadores do sistema radicular de *G. recurva* associada a cinco diferentes forófitos. Os números entre parêntese indicam o nível percentual de explicação por cada componente principal (Pc_1 ou Pc_2).

4. DISCUSSÃO

É notável a importância dos forófitos para as orquídeas epífitas. Além de atuar como substrato, fornecendo água e nutrientes diretamente para as orquídeas, os forófitos também contribuem com carbono orgânico para os simbiossiontes presentes nas raízes das orquídeas (Rasmussen, 2015). No presente trabalho nós investigamos mais uma possível contribuição dos forófitos: influenciar no perfil de simbiossiontes associados à orquídea *G. recurva*. Para isso investigamos o perfil da comunidade fúngica da espécie *G. recurva* em cinco diferentes espécies de árvores hospedeiras.

O grande número de bandas observadas nas três raízes de um único indivíduo de *G. recurva* associadas a um mesmo forófito evidencia que esta orquídea se associa a mais de uma espécie fúngica por vez. Adicionalmente, a baixa similaridade entre os perfis da comunidade de fungos de uma mesma planta, sugere que *G. recurva* seja uma espécie generalista, mantendo interação com fungos de diferentes espécies. Estas observações foram confirmadas com o sequenciamento das amostras, que mostraram um grande número OTUs em um mesmo fragmento de raiz. Trabalhos anteriores indicam que a associação micorrízica em orquídeas pode apresentar baixa especificidade (Selosse *et al.*, 2004; Jacquemyn, 2010; Martos *et al.*, 2012; Jacquemyn *et al.*, 2016). Baixa especificidade também foi observada em orquídeas tropicais, epífitas e terrestres, na Ilha da Reunião (Madagascar), onde os autores também observaram que mais de um fungo poderiam co-ocorrer dentro de um único fragmento de raiz (Martos *et al.*, 2012).

Por outro lado, na espécie epífita *Goodyera pubescens* protocormos e plantas adultas associam-se a um único fungo de cada vez, e são capazes de substituir um fungo dominante por outro fungo sob condições extremas (McCormick *et al.*, 2006). A espécie epífita *Ionopsis utricularioides* também exibe alta especificidade, no qual um único clado de *Ceratobasidium* foi identificado associado a esta planta (Valadares *et al.*, 2015). Já a espécie terrestre *Oeceoclades maculata* apresenta um comportamento particular, demonstrando ser altamente específica durante a fase de germinação das

sementes, e esta especificidade é perdida na fase adulta, na qual uma grande diversidade de fungos associados foi relatada (Bayman *et al.*, 2016).

Os maiores índices de diversidade da comunidade de fungos para *G. recurva* foram observados no forófito *H. succuba*. Os valores de índice Simpson obtidos foram semelhantes aos valores observados para a espécie epífita *Hadrolaelia jongheanna* (Oliveira *et al.*, 2014), em estudo realizado na mesma região de amostragem de *G. recurva*. No entanto, os valores de índice de Shannon foram muito maiores neste trabalho. Para *Zygopetalum maxillare*, uma espécie epífita que apresenta tendência em se associar com as samambaias arbóreas *Cyathea delgadii* e *Dicksonia sellowiana*, também foi observado valor de índice de Shannon menor que o apresentado por *G. recurva* no presente trabalho (Veloso, 2016).

Os altos valores de índice de Shannon em *G. recurva* nos indica que a espécie pode estar associada a um maior número de espécies fúngicas raras, uma vez que este índice é mais sensível a mudanças nas espécies raras da comunidade. Os valores observados nos permite afirmar que *G. recurva* associadas ao forófito *H. succuba* exibem maior diversidade de fungos colonizando suas raízes.

Comparação da arquitetura da associação micorrízica entre orquídeas epífitas e terrestres revelam que as espécies epífitas são mais conservadoras nas associações micorrízicas do que as espécies terrestres (Martos *et al.*, 2012). Os autores sugerem que a maior restrição na escolha do fungo simbionte pode ser resultado de condições abióticas mais extremas no hábito epífita, uma vez que as orquídeas estão mais expostas a alta radiação e baixa disponibilidade de água e nutrientes. Apesar da grande diversidade observada entre os perfis de fungos em *G. recurva* nos diferentes forófitos, nota-se a presença de bandas comuns na maioria das amostras, indicando que a espécie pode se associar a fungos fortemente relacionados, independente da espécie do forófito. Esta hipótese foi confirmada a partir do sequenciamento, onde foi observado que 25,6% das OTUs são comuns a *G. recurva* associada aos diferentes forófitos.

Entre os gêneros mais conhecidos como fungos micorrízicos de orquídeas, apenas *Ceratobasidium* foi encontrado associado a *G. recurva* (figura 8). O gênero *Ceratobasidium* também foi observado como único

fungo micorrízico isolado a partir das espécies epífitas *Sarcochilus hillii*, *Plectorrhiza tridentata*, and *Sarcochilus parviflorus* (Gowland *et al.*, 2013). Em outro estudo realizado com *Sarcochilus weinthalii*, uma espécie epífita rara encontrada no Leste da Austrália, *Ceratobasidium* também foi o gênero de fungo micorrízico predominante (Graham & Dearnaley, 2012).

Além de *Ceratobasidium*, fungos do filo Ascomycota também foram encontrados associados a *G. recurva*. O gênero *Clonostachys* foi frequentemente observado nas orquídeas associadas ao forófito *H. succuba*. A espécie *Clonostachys rosea*, foi relatado como fungo endofítico na orquídea epífita *Dendrobium nobile*, e testes iniciais revelaram que este fungo pode oferecer potenciais benefícios para as orquídeas durante a aclimatização (Yuan *et al.*, 2009).

O gênero *Cladophialophora* observado em orquídeas associados a todos os forófitos, exceto em *Miconia* sp., também já foi identificado como endofítico nas orquídeas *Phalaenopsis* sp. e *Cypripedium acaule* (Bunch *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014). Já o gênero *Phaeosphaeria* identificado em *A. triplinervea* tem sido relatado como produtor de giberilina, um fitormônio que estimula o crescimento de plantas (Bömke & Tudzynski, 2009). Portanto, estes fungos endofíticos identificados em *G. recurva* podem apresentar importante função no desenvolvimento das orquídeas.

As orquídeas epífitas não se associam aleatoriamente às árvores hospedeiras, elas podem apresentar preferência por determinadas espécies de forófito (Gowland *et al.*, 2007). O forófito, no entanto, não exerce influência sobre a probabilidade de floração, tamanho vegetativo, ou número de inflorescências das orquídeas que a ele se associam (Gowland *et al.*, 2011). Gowland *et al.* (2013) estudaram três espécies de orquídeas epífitas para investigar se a preferência por árvores hospedeiras refletia diferenças no perfil de fungos micorrízicos associados a estas espécies. Seus resultados mostraram que a distribuição da comunidade fúngica nas orquídeas reflete, mas não explicam completamente, a tendência de associação ao forófito. No entanto, esses autores utilizaram técnicas baseadas em cultivo, o que não leva em consideração àqueles micro-organismos não cultiváveis e, portanto, subestima a diversidade.

No presente trabalho os perfis de fungos simbioss entre as orquídeas associadas a uma mesma espécie de forófito apresentaram baixa similaridade. Adicionalmente, no dendrograma de comparação do perfil de fungos associados a *G. recurva* nos diferentes forófitos não observamos nenhum agrupamento, o que evidencia que a árvore hospedeira não tem influência direta sobre a comunidade de fungos que coloniza as raízes de *G. recurva*. A análise de componentes principais (PCA) juntamente com o diagrama de Venn confirmam esta hipótese.

A variação na comunidade de fungos micorrízicos associados às orquídeas pode estar relacionadas a variações ambientais, como umidade, pH, teor de fósforo e nitrogênio e composição da matéria orgânica no substrato (Jacquemyn *et al.*, 2015). Espécies terrestres do gênero *Dactylorhiza* apresentaram variações na comunidade micorrízica em função do habitat no qual a orquídea se encontra (Jacquemyn *et al.*, 2016). Outro estudo realizado com duas espécies do gênero *Zygopetalum* mostrou que a espécie epífita *Z. maxillare* teve a comunidade de fungos micorrízicos mais influenciada por fatores ambientais do que a espécie terrestre *Z. mackayi* (Veloso, 2016).

Segundo Adhikari *et al.* (2012), orquídeas epífitas são sensíveis ao microclima formado na casca das árvores hospedeiras, o que nos faz acreditar que a variação no perfil de fungos observados em *G. recurva* nas diferentes árvores hospedeiras possa ser um reflexo de fatores abióticos que geram diferentes microclimas nos troncos dos forófitos.

Este trabalho é pioneiro na determinação da relação entre fungos micorrízicos em orquídeas epífitas e os forófitos nos quais estas orquídeas estão associadas, a partir de técnicas moleculares independente de cultivo. No entanto, estudos com outras espécies são necessários para compreender melhor a ecologia da relação simbiótica em orquídeas epífitas e, assim, poder auxiliar na definição de estratégias de conservação destas plantas.

5. CONCLUSÕES

A espécie de forófito não tem influência direta no perfil de fungos no sistema radicular de *G. recurva*.

Gomesa recurva associa-se a diferentes fungos de uma só vez, podendo ser considerada uma orquídea generalista. No entanto, *Ceratobasidium* é o fungo predominante no sistema radicular desta orquídea.

6. REFERÊNCIAS

- Adhikari YP, Fischer A, Fischer HS. 2012.** Micro-site conditions of epiphytic orchids in a human impact gradient in Kathmandu valley, Nepal. *Journal of Mountain Science* **9**: 331–342.
- Alexander C, Hadley G. 1985.** Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* br. *New Phytologist* **101**: 657–665.
- Bardou P, Mariette J, Escudié F, Djemiel C, Klopp C. 2014.** Jvenn : an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* **15**: 293.
- Bayman P, Mosquera-Espinosa AT, Saladini-Aponte CM, Hurtado-Guevara NC, Viera-Ruiz NL. 2016.** Age-Dependent Mycorrhizal specificity in an invasive orchid, *Oeceoclades Maculata*. *American Journal of Botany* **103**: 1880–1889.
- Bengtsson-Palme J, Ryberg M, Hartmann M, Branco S, Wang Z, Godhe A, De Wit P, Sánchez-García M, Ebersberger I, de Sousa F, et al. 2013.** Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution* **4**: 914–919.
- Bömke C, Tudzynski B. 2009.** Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry* **70**: 1876–1893.
- Brundrett M. 2004.** Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* **79**: 473–495.
- Bunch WD, Cowden CC, Wurzburger N, Shefferson RP. 2013.** Geography and soil chemistry drive the distribution of fungal associations in lady's slipper orchid, *Cypripedium acaule*. *Botany* **91**: 850–856.
- Cameron DD, Johnson I, Read DJ, Leake JR. 2008.** Giving and receiving:

Measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist* **180**: 176–184.

Cameron DD, Leake JR, Read DJ. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: Evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* **171**: 405–416.

Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, Sander EL, Colwell RK, Ellison AM. 2014. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological Monographs* **84**: 45–67.

Chase MW, Cameron KM, Freudenstein J V., Pridgeon AM, Salazar G, van den Berg C, Schuiteman A. 2015. An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **177**: 151–174.

Cribb PJ, Kell SP, Dixon KW, Barrett RL. 2003. Orchid Conservation: A global Perspective. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ, eds. Orchid Conservation. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications, 1–24.

Curlevski NJA, Xu ZH, Anderson IC, Cairney JWG. 2010. Diversity of soil and rhizosphere fungi under *Araucaria bidwillii* (Bunya pine) at an Australian tropical montane rainforest site. *Fungal Diversity* **40**: 12–22.

Dearnaley J. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal. *Mycorrhiza* **17**: 475–486.

Dearnaley JDW, Martos F, Selosse M -a. 2012. Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. *Fungal Associations*: 207–230.

Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes, application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Molecular Ecology* **2**: 113–118.

- Gebauer G, Meyer M. 2003.** ^{15}N and ^{13}C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* **160**: 209–223.
- Giulietti AM, Harley RM, De Queiroz LP, Wanderley MDGL, Van Den Berg C. 2005.** Biodiversity and conservation of plants in Brazil. *Conservation Biology* **19**: 632–639.
- 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.
- Gowland KM, Van Der Merwe MM, Linde CC, Clements M a., Nicotra AB. 2013.** The host bias of three epiphytic Aeridinae orchid species is reflected, but not explained, by mycorrhizal fungal associations. *American Journal of Botany* **100**: 764–777.
- Gowland KM, Wood J, Clements MA, Nicotra AB. 2011.** Significant phorophyte (substrate) bias is not explained by fitness benefits in three epiphytic orchid species. *American Journal of Botany* **98**: 197–206.
- Graham RR, Dearnaley JDW. 2012.** The rare Australian epiphytic orchid *Sarcochilus weinthalii* associates with a single species of *Ceratobasidium*. *Fungal Diversity* **54**: 31–37.
- Hoshino YT, Morimoto S. 2008.** Comparison of 18S rDNA primers for estimating fungal diversity in agricultural soils using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science and Plant Nutrition* **54**: 701–710.
- Huang CL, Jian FY, Huang HJ, Chang WC, Wu WL, Hwang CC, Lee RH, Chiang TY. 2014.** Deciphering mycorrhizal fungi in cultivated *Phalaenopsis* microbiome with next-generation sequencing of multiple barcodes. *Fungal Diversity* **66**: 77–88.

- Jacquemyn H. 2010.** Low specificity and nested subset structure characterise mycorrhizal associations in five- closely related species of the genus *Orchis*. *Molecular Ecology* **19**: 4086–4095.
- Jacquemyn H, Waud M, Merckx VSFT, Brys R, Tyteca D, Hedrén M, Lievens B. 2016.** Habitat-driven variation in mycorrhizal communities in the terrestrial orchid genus *Dactylorhiza*. *Scientific Reports* **6**: 37182.
- Jacquemyn H, Waud M, Merckx VSFT, Lievens B, Brys R. 2015.** Mycorrhizal diversity , seed germination and long-term changes in population size across nine populations of the terrestrial orchid *Neottia ovata*. *Molecular Ecology* **24**: 3269–3280.
- Julou T, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse MA. 2005.** Mixotrophy in orchids: Insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist* **166**: 639–653.
- Khamchatra N, Dixon KW, Tantiwivat S, Piapukiew J. 2016.** Symbiotic seed germination of an endangered epiphytic slipper orchid, *Paphiopedilum villosum* (Lindl.) Stein. from Thailand. *South African Journal of Botany* **104**: 76–81.
- Korkama T, Pakkanen A, Pennanen T. 2006.** Ectomycorrhizal community structure varies among Norway spruce (*Picea abies*) clones. *New Phytologist* **171**: 815–824.
- Leake JR. 1994.** The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* **127**: 171–216.
- Lewis JD. 2016.** Mycorrhizal Fungi, Evolution and Diversification of. *Encyclopedia of Evolutionary Biology* **3**: 94–99.
- Liu J, Yu Y, Cai Z, Bartlam M, Wang Y. 2015.** Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR-DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **31**: 1387–1395.

- Martos F, Munoz F, Pailler T, Kottke I, Gonneau C, Selosse M-A. 2012.** The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology* **21**: 5098–5109.
- McCormick MK, Whigham DF, Sloan D, O'Malley K, Hodkinson B. 2006.** Orchid – Fungus Fidelity : a Marriage Meant To Last ? *Ecology* **87**: 903–911.
- Mitchell JI, Zuccaro A. 2006.** Sequences, the environment and fungi. *Mycologist* **20**: 62–74.
- Neto LM, Forzza RC, Zappi D. 2009.** Angiosperm epiphytes as conservation indicators in forest fragments: A case study from southeastern Minas Gerais, Brazil. *Biodiversity and Conservation* **18**: 3785–3807.
- Nogueira RE, Pereira OL, Kasuya MCM, Lanna MCDS, Mendonça MP. 2005.** Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **19**: 417–424.
- Oliveira SF, Bocayuva MF, Veloso TGR, Bazzolli DMS, da Silva CC, Pereira OL, Kasuya MCM. 2014.** Endophytic and mycorrhizal fungi associated with roots of endangered native orchids from the Atlantic Forest, Brazil. *Mycorrhiza* **24**: 55–64.
- Oliveira CA, Sá NMH, Gomes EA, Marriel IE, Scotti MR, Guimarães CT, Schaffert RE, Alves VMC. 2009.** Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Applied Soil Ecology* **41**: 249–258.
- Pecoraro L, Girlanda M, Liu Z-J, Huang L, Perotto S. 2015.** Molecular analysis of fungi associated with the Mediterranean orchid *Ophrys bertolonii* Mor. *Ann Microbiol* **65**: 2001–2007.

- Pereira OL, Kasuya MCM, Borges AC, Araújo EF De. 2005a.** Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Canadian Journal of Botany* **83**: 54–65.
- Pereira OL, Kasuya MCM, De Lima Rollemberg C, Chaer GM. 2005b.** Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizotonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* **29**: 191–197.
- Pereira MC, Pereira OL, Costa MD, Rocha RB, Kasuya MCM. 2009.** Diversidade de fungos micorrízicos Epulorhiza spp. isolados de Epidendrum secundum (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* **33**: 1187–1197.
- Rasmussen HN. 1995.** *Terrestrial Orchids: From Seed to Mycotrophic Plant*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rasmussen HN, Dixon KW, Jersa J. 2015.** Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of Botany* **116**: 391–402.
- Roberts DL, Dixon KW. 2008.** Orchids. *Current Biology* **18**: 325–329.
- Selosse M a, Faccio a, Scappaticci G, Bonfante P. 2004.** Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla*, (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial ecology* **47**: 416–426.
- Stehmann JR, Forzza RC, Salino A, Sobral M, Da Costa DP, Kamino LHY. 2009.** *Plantas da Floresta Atlântica* (JR Stehmann, RC Forzza, A Salino, M Sobral, DP Da Costa, and LHY Kamino, Eds.). Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Tao G, Liu Z, Hyde K, Lui X, Yu Z. 2008.** Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). *Fungal*

Diversity **33**: 101–122.

Taylor DL, McCormick MK. 2008. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *The New phytologist* **177**: 1020–33.

Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM. 1999. Rapid identification of fungi by sequencing the I T S I and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 1846–1851.

Valadares RBDS, Otero JT, Pereira MC, Cardoso EJBN. 2015. The epiphytic orchids *Ionopsis utricularioides* and *Psycmorchis pusilla* associate with different *Ceratobasidium* lineages at Valle del Cauca, Colombia. *Acta Botanica Brasilica* **29**: 40–44.

Veloso TGR. 2016. Fungal community profile of *Zygopetalum maxillare* and *Zygopetalum mackayi* (Orchidaceae). MSc Thesis, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

White TJ, Bruns S, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*: 315–322.

Yuan ZL, Chen YC, Yang Y. 2009. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): Estimation and characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**: 295–303.

Zotz G. 2013. The systematic distribution of vascular epiphytes – a critical update. *Botanical Journal of the Linnean Society* **171**: 453–481.