

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**INTERAÇÕES ECOLÓGICAS ENTRE FUNGOS ORQUIDÓIDES E
ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS (*Cattleya guttata* e *Brassavola
tuberculata*) EM FRAGMENTO DE MATA ATLÂNTICA DO ESPÍRITO
SANTO**

WOLMEN OLIVEIRA DOS SANTOS

VILA VELHA
MARÇO / 2012

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**INTERAÇÕES ECOLÓGICAS ENTRE FUNGOS ORQUIDÓIDES E
ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS (*Cattleya guttata* e *Brassavola
tuberculata*) EM FRAGMENTO DE MATA ATLÂNTICA DO ESPÍRITO
SANTO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

WOLMEN OLIVEIRA DOS SANTOS

VILA VELHA
MARÇO / 2012

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UUV-ES

S237i Santos, Wolmen Oliveira dos.

Interações ecológicas entre fungos orquidóides e espécies de orquídeas (*Cattleya guttata* e *Brassavola tuberculata*) em fragmento de Mata Atlântica do Espírito Santo / Wolmen Oliveira dos Santos. – 2012.

65 f.: il.

Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2012.

Inclui bibliografias.

1. Fungos do solo. 2. Orchidaceae. 3. Ecologia das Florestas Tropicais. 4. Mata Atlântica – Espírito Santo (Estado). I. Ramos, Alessandro Coutinho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 579.5

WOLMEN OLIVEIRA DOS SANTOS

**INTERAÇÕES ECOLÓGICAS ENTRE FUNGOS ORQUIDÓIDES E
ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS (*Cattleya guttata* e *Brassavola
tuberculata*) EM FRAGMENTO DE MATA ATLÂNTICA DO ESPÍRITO
SANTO.**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

Aprovada em 31 de março 2012,

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Juares Ogliari – IFF/RJ

Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss – UVV

Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos - UVV
Orientador

Ao meu pai (in memória) a minha mãe e
minha esposa Regina que sempre acreditaram em
mim, mesmo nas horas mais difíceis da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente á Deus e a minha mãe Nossa Senhora da Penha, por ter me dado a oportunidade de realização de um sonho que até pouco tempo achava que seria impossível.

A mensagem que marca a minha a vida é sempre acreditar, no poder da fala, da sinceridade, da honestidade, da humildade, da perseverança, da união, e do compromisso de que estamos aqui para crescermos como seres humanos. Nada disso seria possível sem o apoio da minha família em especial da minha esposa Regina que com muita paciência, compreensão e amor, me deu suporte para mais uma conquista, que não é somente minha, mas de todos os meus familiares.

Agradeço em especial ao meu pai biológico (Walaci dos Santos in memória) que me deu a maior de todas as virtudes ser honesto e acreditar que tudo é possível com perseverança.

Aos meus pais adotivos (Geraldo Vieira de Carvalho e Léa Coimbra de Carvalho in memória) e minha cunhada Claudia que sempre acreditaram na minha capacidade me dando suporte e me encorajando.

Ao meu paizão, amigo e orientador, Dr. Alessandro Coutinho Ramos, que temsido importante na consolidação da pesquisa na minha vida.

Agradeço a minha eterna e guerreira mãe (Aláides de Oliveira Santos), que aos Sessenta e poucos anos se formou em Serviço Social e com muita humildade me questionou. E aí o que vai fazer, bom aqui estou eu realizando mais um sonho.

Aos meus irmãos Wolmar, Wallace Junior, Elvira, Eliane, Euzilene e Eudicéia pela grande torcida, companherismo e fé.

Aos meus tios Abilio e Adescrisps Alves de Oliveira pela amizade e apoio.

Aos professores, técnicos e funcionários do Laboratório Biopráticas da UVV, em especial ao prof. Rodrigo que me acompanha desde a graduação.

Aos colegas do LMAB e do Mestrado, Gabriela, Suellen, Ju Mendes, Juliana Melo, Sávio Bastos, Fred Figueira, Nágila Simoura, Ju Rabbi, Loh, Tamires, Lucas, Fred Eutrópio, Carlos Colodete, Juliano, Fernanda, Thécio, José Carlos, Luis Augusto, Kátia, Davi, Arthur e Amanda, estes mesmo longe são importantes na formação deste grupo de trabalho.

Em especial aos meus grandes amigos Wagner Bissoli Dias e Rômulo Félix Boldrini que agüentaram as minhas insatisfações, reclamações e conquistas. Vocês fazem parte disto e serão sempre importantes.

Agradeço a professora Maria Catarina Megumi Kasuya e Melissa Bocayuva pela dedicação em atender e tirar todas as minhas dúvidas sobre o isolamento de fungo micorrízico na Universidade Federal de Viçosa.

Em especial a Adriana e aos pais do professor Alessandro, Sr Antonio de Pádua Clemente Ramos e Sra. Etelvina Coutinho Ramos pela acolhida e dedicação com que sempre me receberam. Obrigado.

Agradeço a FAPES pelo suporte financeiro, pois, sem esse apoio, a execução deste projeto seria muito difícil. Muito Obrigado!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas e a Universidade Vila Velha, pelo suporte dado ao desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE SIGLAS.....	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	01
2.1 APP Morro do Moreno.....	05
2.2 Família Orchidaceae.....	06
2.3 Espécie estudada <i>Brassavola tuberculata</i>	09
2.4 Espécie estudada <i>Cattleya guttata</i> Lindl.....	10
2.5 A relação Ecológica: Fungos – Orquídeas.....	11
2.6 Dependência micorrízica das sementes de orquídeas.....	13
2.7 Formas de infecção.....	14
2.8 Fungos micorrízicos orquidóides.....	15
2.9 Metabolismo.....	16
2.10 Taxonomia de fungos rizoctonióides.....	18
2.11 Cultivo Assimbiótico e Simbiótico.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Caracterização da área de estudo.....	21
3.2 Coleta das amostras.....	21
3.3 Análise anatômica de colonização micorrízica.....	25

3.4 Isolamento do fungo rizoctonióide.....	25
3.5 Cultivo e manutenção dos fungos rizoctonióides.....	26
3.6 Caracterização morfológica.....	27
3.6.1 Caracterização morfológica Qualitativa.....	27
3.6.2 Caracterização morfológica Quantitativa.....	28
3.7. Identificação dos isolados.....	29
3.8 Análise Estatísticas.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1 Análise de colonização da associação micorrízica nas espécies <i>B. tuberculata</i> e <i>C. guttata</i>	30
4.2 Isolamento e identificação dos isolados.....	32
4.3 <i>B. tuberculata</i>	33
4.4 <i>C. guttata</i>	34
4.5 Caracterização morfológica.....	35
4.5.1 Dados qualitativos.....	35
4.5.2 Dados quantitativos.....	36
4.6 Taxa de crescimento BDA com 72 horas.....	36
4.7 Crescimento diário do micélio fúngico em BDA após 21 dias.....	36
4.8 Crescimento diário do micélio fúngico em CMA após 21 dias.....	37
5 Discussão.....	39
6 Conclusões.....	42
7 Referências.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho mostrando a simetria bilateral da flor de uma orquídea tipo e a fusão de órgão reprodutor masculino e feminino em uma coluna com aglomerado de políneas que contém os polens (Suttleworth, F.S.; Zim, H. S.; Dillon, G. W. Orquídeas: guia dos orquidófilos. 3 ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1991).	08
Figura 2	<i>Brassavola tuberculata</i> na APP Morro do Moreno, localizado em Vila Velha. E.S.	10
Figura 3	<i>Cattleya guttata</i> na APP Morro do Moreno, localizado em Vila Velha. E.S.	11
Figura 4	Diagrama ilustrativo demonstrando as formas típicas dos tipos de micorrizas. Ectomicorrizas em hospedeiros das famílias Fagaceae (a); Pinaceae (b). Fungos micorrízicos arbusculares classificados em Glomineae (c) e Gigasporineae (d). Micorriza do tipo orquidóide (e). Modificado de Sylvia et al. (1999)	15
Figura 5	Pelotons de Rhizoctonia em um protocórmio de <i>Orchis morio</i> . Micrografia eletrônica de varredura . Barra = 100 μ (Smith & Read, 1997)	17
Figura 6	Localização da APP Morro do Moreno no Mapa do estado do Espírito Santo. 2 .Foto de satélite (Google Earth 5.0, 2009) da APP Morro do Moreno, localizada no município de Vila Velha, ES	21
Figura 7	Pontos de amostragem de <i>Brassavola tuberculata</i> e <i>Cattleya guttata</i> na APP Morro do Moreno, Vila Velha. E.S. Imagem obtida do software Google Earth 2012	24
Figura 8	Corte transversal de segmento de raiz de orquídea sob Lupa estereoscópica (50X) onde mostra em A: Segmento de raiz colonizado por peloton. B. Segmento de corte transversal de raiz não colonizado por fungo micorrízico orquidóide	26
Figura 9	Cortes transversais de raízes de orquídeas sem tratamento onde mostra em (A, B) ausência de pelotons na região do córtex, enquanto que em (C, D) existe a presença de pelotons na região do córtex da raiz espécies analisadas	30

- Figura 10** Cortes transversais de raízes de orquídeas com tratamento de azul de tripano, onde mostra em (A) pelotons (pl) em vários estádios de desenvolvimento, podendo estar intactos e degradados. Em (B) presença de hifas fúngicas (hf) na região do velame (vl); Em (C) hifas atravessando a camada da exoderme (ex) pelas células de passagem (cp) e finalmente em (D) pelotons localizados na região do córtex. 31
- Figura 11** A- Presença de Pelotons; B-Presença de escleródios; C. Características de fungos Rhizoctonióides com presença constrição da hifa na região do septo, ramificação da hifa logo após o septo e em ângulo reto; D. Células monilióides do isolado WSCG₁; E. Células monilióides do isolado WSBT₁ 32
- Figura 12** A figura mostra a colonização de fungos micorrízicos em raiz de *B. Tuberculata*. Observa-se uma maior colonização de pelotons em toda circunferência da região do córtex (A) e em (B). Visualização de pelotons na região cortical. Aumento de 400X 33
- Figura 13** (A) - A figura demonstra em corte transversal de raiz de *C. Guttata* com tratamento de azul de tripano a colonização de pelotons e local de contato com o substrato sendo o local de infecção fúngica. (B) - Região do córtex onde estão mais concentrados os pelotons 34
- Figura 14** Fotos dos isolados de *C. guttata* (WSCG₁) e *B. tuberculata* (WSBT_{1,2,3,4,5}) após 21 dias de incubação em BOD. 35
- Figura 15** Taxa de crescimento diário em (mm h⁻¹) de micélio fúngico nos isolados (WSCG₁, WSBT_{1,2,3,4,5}) em meio de cultura BDA após 21 dias de incubação das espécies de orquídeas estudadas 37
- Figura 16** Crescimento diário em (mm h⁻¹) de micélio fúngico nos isolados WSCG₁, WSBT_{1,2,3,4,5}) em meio de cultura CMA após 21 dias de incubação das espécies de orquídeas estudadas 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descriminação das espécies <i>B. tuberculata</i> e <i>C. guttata</i> nas respectivas áreas de acordo com o seu georreferenciamento (GPS)	25
Tabela 2	Características culturais dos isolados de <i>Cattleya guttata</i> (WSCG) e <i>Brassavola tuberculata</i> (WSBT) após 21 dias de incubação a 28°C	28
Tabela 3	Dados quantitativos: Taxas de crescimento (TC) e diâmetro após 72 horas (D) em meios BDA e CMA.	36

LISTA DE ABREVIATURAS

APP -Área de preservação permanente

PEPCV – Parque Estadual Paulo Cesar Vinha

AG – Grupo de anastomose

PCR - RFLP – Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment leught Polymorphism

ITS – Internal Transcribed Spacer (Regiões Ribossomais Altamente Variáveis)

IJSN – Instituto Jones Santos Neves

UVV – Universidade Vila Velha

BDA – Batata Dextrose Agar

BOD – Biochemical Oxygen Demand

CMA – Corn Meal Agar

pH – Potencial Hidrogeniônico

SEAMA – Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos

RESUMO

SANTOS, Wolmen Oliveira, MSc., Universidade Vila Velha. Março de 2012. **INTERAÇÕES ECOLÓGICAS ENTRE FUNGOS ORQUIDÓIDES E ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS (*Cattleya guttata* e *Brassavola tuberculata*) EM FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA DO ESPÍRITO SANTO.** Orientador: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

Na natureza, as orquídeas são totalmente dependentes de fungos micorrízicos para germinar. Estes fungos podem penetrar nas células das raízes e formar pélotons, os quais, quando digeridos pela planta, providenciam açúcares simples para o embrião. Durante a fase aclorofilada de desenvolvimento da plântula as orquídeas são obrigatoriamente dependentes dos fungos; algumas continuam assim por toda vida enquanto outras se tornam facultativamente responsivas à colonização por fungos micorrízicos. Este trabalho tem como objetivo fornecer conhecimento científico e aplicado sobre os mecanismos de colonização de fungos rizoctonióides em raízes de orquídeas epífitas e rupícolas, nas diferentes formações vegetais da APP Morro do Moreno, Vila Velha, ES. As coletas de raízes das espécies *Brassavola tuberculata* Hook. e *Cattleya guttata* Lindl foram realizadas no mês de Março de 2011 em trilhas pré definidas existentes na APP Morro do Moreno, localizado em Vila Velha, E.S. Foram coletadas amostras de raízes saudáveis de 6 plantas das espécies estudadas. Cada ponto de coleta foi identificado e enumerado de acordo com a espécie e sua localização georreferenciadas com GPS (GARMIN). Foi analisada a forma de colonização de fungos micorrízicos orquidóides em raízes das espécies *B. Tuberculata* e *C. guttata* posteriormente de acordo com as características e taxas de crescimento quantitativo e qualitativo dos grupos anamorfos apresentados pelos isolados, foi possível identificar as características de fungos orquidóides e suas interações ecológicas entre planta e fungo quanto ao seu hábito de vida das espécies analisadas. Os resultados identificaram as características de fungos micorrízicos orquidóides para todos os isolados das duas espécies de orquídeas, um de *C. guttata* (WSCG₁) e quatro de *B. tuberculata* (WSBT_{1,2,3,4}) Conclui-se que *C. guttata* apresenta uma maior especificidade e menos dependência na relação planta fungo mas são altamente dependentes desta

simbiose para germinação de sementes na natureza, enquanto que *B. tuberculata* apresenta uma maior diversidade de morfotipos de fungos rizotonióides e está menos dependente da relação planta fungo.

Palavras chaves: Micorriza, Rhizoctonia, Orchidaceae, fungos endofíticos, floresta tropical.

ABSTRACT

SANTOS, Wolmen Oliveira, MSc., University of Vila Velha. March 2012.
ECOLOGICAL INTERACTIONS BETWEEN ORCHID MYCORRHIZAL FUNGI AND ORCHIDS SPECIES (*Cattleya guttata* and *Brassavola tuberculata*) IN THE ATLANTIC FOREST FRAGMENTS OF ESPÍRITO SANTO. Advisor: Dr. Alessandro Ramos Coutinho.

In habitat, orchids are totally dependent on mycorrhizal fungi to germinate. These fungi can penetrate the roots cells and form pelotons, which when digested by the plant, provide simple sugars to the embryo. During the achlorophyllous development stage, orchids seedling are necessarily dependent on fungi, some remain so throughout their lives while others become optionally responsive to colonization by mycorrhizal fungi. This work aims to provide applied and scientific knowledge of mechanisms colonization of the Rhizoctonia-like fungi in roots of epiphytic and rupicolous orchids in different plant formations of APP Morro do Moreno, Vila Velha, ES. Sampling of roots of *Brassavola tuberculata* Hook. and *Cattleya guttata* Lindl species were carried out in March (2011) on pre-defined trails in the APP Morro do Moreno, located in Vila Velha, ES. The samples were collected from healthy roots in six plant of the studied species. Each collection point has been identified and listed according to the species and its location georeferenced with GPS (GARMIN). Subsequently we analyzed the colonization form of orchid mycorrhizal fungi in roots of *B. Tuberculata* and *C. guttata* according to the characteristics and quantitative and qualitative growth rates of anamorphs groups presented by isolates. Thus, it was possible to identify the characteristics of orchid mycorrhiza and their ecological interactions between plant and fungus about their life habits of the species analyzed. The results identified the orchid mycorrhizal fungi characteristics for all isolates of both orchids species, one of *C. guttata* (WSCG₁) and four of *B. tuberculata* (WSBT_{1,2,3,4}). Was concluded that *C. guttata* has a greater specificity and less dependence in the plant-fungus interaction, but is highly dependent on this symbiosis for seed germination in the wild, whereas *B. tuberculata* presents a greater diversity of Rhizoctonia-like fungi morphotypes and is more dependent on the plant fungus relation.

Keywords: Mycorrhiza, Rhizoctonia, Orchidaceae, endophytic fungi, tropical forest.

1. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é a maior entre as Liliopsidas do mundo e estima-se que tenha 30.000 espécies em 980 gêneros. No Brasil, aproximadamente 2.650 espécies estão agrupadas em 205 gêneros, destacando-se como gêneros de maior valor ornamental: *Cattleya*, *Laelia*, *Epidendrum*, *Miltonia*, *Oncidium* entre outros (Pabst; Dungs, 1975; Park; Murthy; Paek, 2002; Joly, 2002; Giuliete et al., 2005;).

Esta família possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em todos os continentes, ocorrendo em campos, desertos e em várias fitofisionomias distintas, desde o nível do mar até acima de 4.500 metros. Apresentam maior diversidade nas regiões tropicais, concentrando-se nas áreas de montanhas com maior umidade, especialmente nos trópicos americanos e Sudeste asiático. Acredita-se que a família Orchidaceae foi submetida a uma rápida especiação e diversificação ecológica possibilitando a ocupação de uma variedade de habitats (Ruschi, 1986; Smith; Read, 1997; Joly, 2002; Van den Berg; Azevedo, 2005).

Dentro deste contexto, a Mata Atlântica é considerada um dos centros de diversidade das Orchidaceae e abriga o maior número de espécies no território brasileiro, apesar disto, poucos inventários florísticos incluem ervas rupícolas e epífitas. Este fato está refletido nas coleções depositadas em herbários e nas literaturas, que representam muito pouco da diversidade das Orchidaceae da Mata Atlântica e Restinga (Cunha & Forzza, 2007).

A vegetação litorânea ou Restinga apresenta diversidade fisionômica expressando uma composição que, geralmente mistura espécies próprias do litoral com outras provenientes de ecossistemas como mata atlântica, cerrados e tabuleiros arenosos. Os ecossistemas litorâneos são os mais impactados seja pela ocupação humana, seja pelo extrativismo. A Área de Preservação Permanente (APP) Morro do Moreno, conhecida popularmente como “Pedra da Macaca” faz parte desse contexto, cuja estrutura da vegetação evidencia a ação antrópica especialmente pela escassez de faixas contínuas de cobertura vegetal, bem como uma grande representação de plantas invasoras como Ciperaceae e Poaceae. Os fragmentos florestais encontram-se intercalados por afloramentos rochosos que por

conceito são denominadas de “Inselbergs” e são recortados por inúmeras trilhas indicando a forte pressão humana (Pereira, 2000; Fraga, 2004).

Como ocorre com todos os organismos vegetais, dos mais simples aos mais complexos, as orquídeas necessitam de determinados fatores ambientais para o seu adequado desenvolvimento, tais como: Intensidade de iluminação, umidade, temperatura adequada e disponibilidade de nutrientes. Para minimizar os impactos decorrentes de possíveis estresses ambientais, as orquídeas evoluíram no sentido de favorecer a absorção de água, nutrientes e economizar energia na produção de mecanismos de reprodução com a finalidade de balancear e direcionar essa energia para a formação de outras estruturas. Seu sistema radicular é aéreo, o que facilita a absorção de água proveniente de precipitações pluviais, do orvalho noturno e da umidade do ar (Faria et al., 2001; Assis et al., 2005).

As orquídeas possuem sementes diminutas, usualmente chamadas de “dust seeds”. Estas sementes possuem uma quantidade mínima de tecidos de reservas (endosperma) capazes de serem metabolizadas, portanto, necessitam de uma fonte de energia externa para germinar. Na natureza, esta disfunção fisiológica, é suprida pela colonização de fungos micorrízicos, os quais penetram no interior da semente e fornecem água e nutrientes ao embrião. Conseqüentemente, o processo de germinação é desencadeado e as primeiras raízes já apresentam colonização e formação de pélotons, que são novelos de hifas, e quando digeridos, fornecem açúcares simples para o embrião (Arditti, 1992; Peterson et al., 1998; Rasmussen, 2002; Boldrini & Santos, 2010).

Esta associação da planta com o fungo adequado é indispensável para a germinação das sementes e para o desenvolvimento do protocórmio (do grego prôtos = primeiro e kormós = caule) foi inicialmente proposto por Melchior Treub, em 1888 (Arditti & Ernst, 1993) que é uma característica distintiva da família Orchidaceae, sendo este tecido originado a partir da diferenciação das células do embrião que originará a plântula (Peterson et al., 1998). Assim, a fase de protocórmio é heterotrófica e mesmo em orquídeas que são autotróficas na fase adulta a presença do parceiro fúngico é um fator indispensável na germinação de sementes das orquídeas na natureza. (Arditti, 1992; Smith; Read, 1997; Peterson; Uetake; Zelmer, 1998, (Mckendrick et al., 2000; Peterson et al., 2004; Rasmussen, 2008)

Os fungos rizoctonióides, ou micorrizas orquídeas, são caracterizados por terem ramificações de suas hifas em ângulo de noventa graus e constrição do septo próximo ao ponto de ramificação. Frequentemente podem ser induzidos em meio de cultura CMA (Corn Meal Agar) a desenvolverem propágulos de resistência que são cadeias de células infladas, denominadas células monilióides (Sneh et al., 1991). O fato de que raramente estes fungos produzem esporos sexuais em meio de cultura foi sempre uma dificuldade para taxonomistas. Assim, a caracterização morfológica baseada em características assexuais produziu vários grupos polifiléticos. Com os recentes avanços em biologia molecular, fungos rizoctonióides têm sido descritos por métodos moleculares, via o sequenciamento e análise da região intergênica do DNA ribossômico ITS (Internal Transcribed Spacer) (Otero et al., 2004; Peterson et al., 2004; Gonzalez, 2006; Dearnaley, 2007;).

A maioria dos fungos micorrízicos de orquídeas pertencem ao gênero-forma *Rhizoctonia*. Os membros deste grupo são considerados um complexo de fungos filamentosos, apresentando em comum uma fase assexuada não promotora de esporos, denominada anamorfo tipo-*Rhizoctonia* (do inglês *Rhizoctonia-like*). Estes fungos estão dispersos nos ambientes naturais, exercendo outros papéis ecológicos como saprófitas, patógenos ou simbiotes de espécies vegetais de outras famílias (Warcup, 1981; Rasmussen, 1995; Zettler; Mcinnis, 1997; Otero, 2002; Rasmussen, 2002; Currah; Ackerman; Bayman, 2004; Richard; Simard, 2006; Otero et al., 2007; Selosse; B; Dearnaley, 2007). Estudos têm relatado a eficiência destes fungos em promover a germinação de sementes de orquídeas hospedeiras e não-hospedeiras na natureza (Zettler et al., 1999; Pereira et al., 2005).

É fundamental obter conhecimento sobre a ecologia de micorrizas orquídeas, para que se possa avaliar o seu potencial nos processos de germinação de sementes, a sua distribuição no ecossistema e como atuam nesta simbiose qual sua função determinando a permanência ou não de espécies em seu habitat. Atualmente, grande parte das orquídeas é reproduzida em meio assimbiótico, sem seu fungo micorrízico específico e isso impede sua reintrodução eficaz, não garantindo a germinação de sementes e o estabelecimento das plântulas na natureza (Rasmussen, 1995; Otero et al., 2007; Pereira et al., 2010)

O objetivo deste trabalho foi fornecer conhecimento científico sobre os mecanismos de colonização, entre fungos orquídeas e raízes de espécies de

epífitas na APP Morro do Moreno, Vila Velha. Espírito Santo. Desta forma, foi realizado o isolamento e seleção de fungos rizotonióides associados às espécies *Brassavola tuberculata* Hook e *Cattleya guttata* Lind, análise da diversidade, especificidade e colonização dos fungos micorrízicos associados às espécies estudadas.

De acordo com o exposto, a hipótese deste trabalho fundamenta-se na importância dos fungos micorrízicos orquídeas para a germinação de sementes de orquídeas na natureza e a sua ausência promoverá a extinção de diversas espécies em seu habitat. Para testar esta hipótese objetiva-se com esta dissertação o fornecimento de conhecimentos científicos sobre os mecanismos de colonização de fungos rizotonióides em raízes de orquídeas epífitas e rupícolas, nas diferentes formações vegetais e afloramento rochoso da APP Morro do Moreno, localizado em Vila Velha - ES.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Área de estudo APP Morro do Moreno*

A Mata Atlântica compreende a cobertura florestal que se estende sobre a cadeia montanhosa litorânea ao longo do Oceano Atlântico, nas regiões nordeste, sudeste e sul do Brasil. Suas formações vegetais e ecossistemas associados cobriam originalmente aproximadamente 13% do território brasileiro. Atualmente a Mata atlântica sobrevive em apenas 95.641 Km², o que corresponde a 7% da área original e, mesmo assim, ainda ameaçada (Tabarelli et al., 2005). Este bioma está distribuído ao longo de mais de 23 graus de latitude sul e é composto de uma série de fitofisionomias bastante diversificadas, que incluem florestas de planície e de altitude, matas costeiras e de interior, ilhas oceânicas e ecossistemas associados como: restingas, manguezais e campos de altitude. Esse bioma apresenta várias denominações, podendo ser chamado de Floresta Latifoliada Hidrófila Costeira, Floresta Tropical Atlântica Brasileira, Floresta Úmida de Encosta, Floresta Ombrófila Densa, ou, simplesmente Mata Atlântica (Oliveira, 2000; Fraga, 2001; Pereira, 2002).

No Brasil a Mata Atlântica tem sido alvo de agressões desde o período colonial. Esse fato revela a necessidade de conservar o que restou de um ecossistema complexo, ainda pouco conhecido, cuja biodiversidade desperta o interesse de todo mundo, seja pela sua beleza, seja pela riqueza de recursos que possui (Oliveira & Araujo, 2000)

A Mata Atlântica é considerada um dos centros de diversidade das Orchidaceae e abriga o maior número de espécies no território brasileiro, apesar disso, poucos inventários florísticos incluem ervas rupícolas, epífitas e terrestres. Este fato está refletido nas coleções depositadas em herbários e nas literaturas, que representam muito pouco da diversidade das Orchidaceae da Mata Atlântica e Restinga (Miller & Warren, 1996; Cunha & Forzza, 2007).

A vegetação litorânea ou Restinga apresenta uma diversidade fisionômica expressando uma composição que, geralmente mistura espécies próprias do litoral

com outras provenientes de ecossistemas como Mata atlântica, cerrado e tabuleiro arenoso. Os ecossistemas litorâneos são os mais impactados seja por ocupação humana e principalmente pelo extrativismo (Fraga, 2001; Pereira, 2002).

A Área de Preservação Permanente (APP) Morro do Moreno, conhecida popularmente como “Pedra da Macaca” faz parte desse contexto, cuja estrutura da vegetação evidencia a ação antrópica, especialmente pela escassez de faixas contínuas de cobertura vegetal, bem como uma grande representação de plantas invasoras como Ciperaceae e Poaceae. Os fragmentos florestais encontram-se intercalados por afloramentos rochosos e são recortados por trilhas indicando a forte pressão humana. A área de APP é um maciço rochoso litorâneo, de formações graníticas e gnáissicas, denominadas, pelo geólogo alemão Bomhardt, como “Inselbergues” (insel = ilha; berg = montanha) que são formações Pré-Cambrianas, com aproximadamente mais de 50 milhões de anos, podem ocorrer isoladas ou ocorrer em pequenas distâncias formando aglomerados densos individuais (Saddi, 2008).

Segundo Rizzini, (1997) a cobertura vegetal que compõe estes ambientes de “Inselbergues” trata-se de remanescentes de Mata Atlântica. O mesmo autor cita o termo “Scrub” para formações vegetacionais de Mata Atlântica que se apresentam sempre verdes em manchas dispersas que ocorrem nas rochas da orla marítima.

2.2 A Família *Orquidaceae*.

A família Orchidaceae é a maior entre as Liliopsidas do mundo e estima-se que tenha aproximadamente 30.000 espécies em 980 gêneros (Pabst & Dungs, 1975; Pabst & Dungs, 1977; Giulietti et al., 2005; Dearnaley, 2007). Possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrados em todos os continentes, ocorrendo nos mais diversos ecossistemas e ocupando inúmeros nichos ecológicos, desde campos e florestas a desertos e também está presente em várias fitofisionomias distintas, desde o nível do mar até acima de 4.500 metros. (Braga & Mera, 1981; Heywood, 1996; Pereira & Ribeiro, 2004).

A sua maior diversidade está nas regiões tropicais, concentrando-se nas áreas de montanhas com maior umidade, especialmente nos trópicos americanos e Sudeste asiático (Van den Berg & Azevedo, 2005). Nos trópicos há um predomínio das formas epífitas e rupícolas, enquanto que nas regiões fora dos trópicos predominam as terrestres (Joly, 2002). Acredita-se que a família Orchidaceae foi submetida a uma rápida especiação e diversificação ecológica, possibilitando a ocupação dos mais variados habitats (Smith & Read, 1997).

Estão entre as plantas mais apreciadas com alto valor comercial, sendo cultivadas como plantas ornamentais para a indústria de floricultura, com seus híbridos de flores vistosas. Estas espécies têm atraído a atenção de muitos cientistas, floricultores e produtores amadores, por seus mecanismos de polinização especializados e pela sua diversidade de cores e formas florais. Na produção comercial, as plantas são submetidas a técnicas, desde por reprodução vegetativa, a partir de sementes por meio de cultura assimbiótica ou por divisões do tecido meristemático, produzindo uma infinidade de clones de forma rápida e eficiente (Joly, 2002; Peterson et al., 2004; Raven et al., 2007).

Dentre os gêneros que ocorrem no Brasil, destacam-se como de maior valor ornamental: *Cattleya*, *Laelia*, *Miltonia*, *Oncidium*, *Epidendrum*, *Brassavola*, *Cyrtopodium*, *Catasetum*, *Stanhopea*, e *Habenaria*. Há também gêneros exóticos que tem o maior percentual de comercialização, dentre eles: *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Vanda*, *Paphiopedilum*, *Aerides* e *Cymbidium*. (Joly, 2002). Existem aproximadamente 2.650 espécies, agrupadas em 205 gêneros no Brasil, que detém o terceiro lugar em número de espécies de orquídeas, atrás apenas da Colômbia e do Equador. É importante ressaltar que o endemismo das Orchidaceae brasileiras é expressivo, com aproximadamente 35 gêneros e 1.800 espécies (Giulietti et al., 2005).

As orquídeas são plantas herbáceas perenes e ocupam uma variedade de habitats na natureza. Epífitas, terrestres ou rupícolas, possuem raízes tuberosas ou não, em geral com presença de velame (camada de tecido multiextratificado de células mortas presentes nas raízes para controle hídrico e mecânico). Caule muitas vezes rizomatoso, e internós freqüentemente formando pseudobulbos. Folhas simples, inteiras, com nervação usualmente paralelinérvea. Inflorescências racemosas ou paniculadas, algumas vezes reduzidas a uma única flor, terminais ou

laterais. Flores usualmente monoclinas, zigomorfas (com simetria bilateral). Três sépalas livres ou conatas (ligadas) e três pétalas livres, a mediana diferenciada em labelo (com características fundamentais para distinção taxonômica), as laterais semelhantes às sépalas (figura 1). Néctar em geral ausente e quando presente produzido em cálcar ou em nectários septais. Frutos na forma de cápsula, abrindo por fendas longitudinais; sementes minúsculas, com tegumento membranáceo, embrião muito reduzido e ausência ou quantidade mínima de endosperma (tecido de reserva) (Dressle & Dodson, 1960) (Joly, 2002; Raven et al., 2007; Machado, 2008).

Outra característica distintiva das Orchidaceae é a coluna, que é a fusão de um único estame com estilete e estigma. Além disso, os pólenes estão agrupados em massas chamadas de polínea, que se entende como a congregação de todo o conteúdo de uma antera, e a quantidade e número de políneas são de caráter taxonômico (Joly, 2002; Van den Berg & Azevedo, 2005; Raven et al., 2007; Machado, 2008).

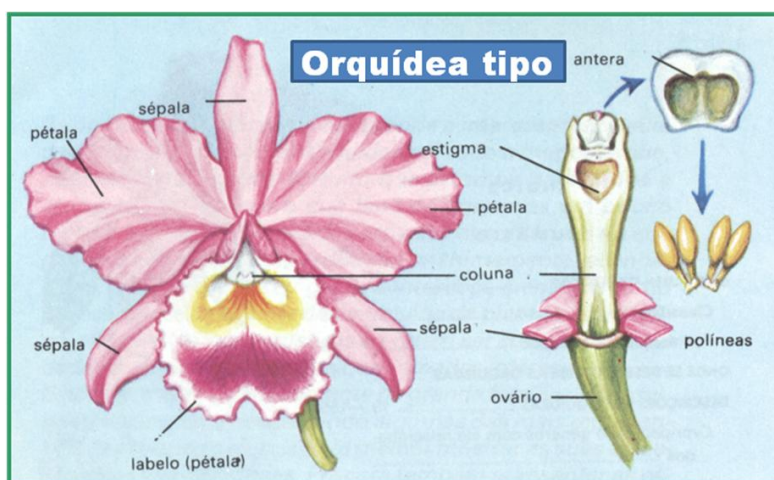


Figura 1 Desenho mostrando a simetria bilateral da flor de uma orquídea tipo e a fusão de órgão reprodutor masculino e feminino em uma coluna com aglomerado de políneas que contém os pólenes (Suttleworth, F.S.; Zim, H. S.; Dillon, G. W. Orquídeas: guia dos orquidófilos. 3 ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1991).

2.3 Espécie estudada *Brassavola tuberculata* Hook

Brassavola tuberculata é uma espécie muito freqüente nos afloramentos rochosos, sendo que suas maiores populações encontram-se em locais expostos a altas intensidades luminosas (heliófilas), em especial vegetando diretamente sobre a rocha nua como hábito de vida rupícola, entretanto, ocorre também como epífita nas restingas do litoral Brasileiro (figura 2). Possui rizoma desenvolvido e suas raízes são numerosas com a presença de caule unifoliado com nós e entrenós bem evidentes, não espessados em pseudobulbos com folhas cilíndricas na extremidade do pseudobulbo (Fraga & Menezes 2000).

Esta espécie é caracterizada por seu hábito pendente com flores com sépalas e pétalas creme-amareladas e labelo branco com centro amarelo. Com sua característica de ocorrer em ambientes diversos apresentando uma grande plasticidade fenotípica fez com que alguns autores aplicassem outros nomes para esta espécie, como por exemplo: *Brassavola fragrans*, *Brassavola gibbiana* Hort. ex Nichols. e *B. perrinii* e *B. tuberculata*. Mas para Pabst & Dungs (1975) e Sprunger (1991) consideram as espécies *Brassavola fragrans*, *Brassavola gibbiana* Hort. ex Nichols. e *B. perrinii* sinônimos de *B. tuberculata* e que são parte de um complexo de espécies proximamente relacionadas, que diferem apenas em sua localização geográfica.

Está presente desde a Bolívia até o Brasil (Cogniaux, 1898-1902). Ocorre em regiões de altitude até a nível do mar, está presente na região Sudeste, Sul e nos estados de Goiás, Tocantins e Sergipe (Pabst & Dungs, 1975). Sua floração pode ocorrer entre os meses de julho e outubro (Fraga, 2000; Bocayuva & Forzza, 2007).



Figura 2 *Brassavola tuberculata* na APP Morro do Moreno, localizado em Vila Velha. E.S.

2.4.Espécie estudada *Cattleya guttata* Lindl

Planta herbácea com porte de 60 cm altura podendo atingir até 1 metro de altura em ambientes de restingas. Seu rizoma apresenta-se reduzido com caule cilíndrico envolto por catafilos (membranas), não espessado em pseudobulbos e com folhas dísticas no ápice do caule, possui inflorescência com 5 a 11 flores, de coloração creme-amarelada com pintas púrpuras nas sépalas e pétalas e com labelo de coloração lilás. Tem como atrativo a produção de néctar com aroma que intensifica a visita de polinizadores (Pabst & Dungs, 1975).

A *Cattleya guttata* é uma espécie pouco freqüente na APP Morro do Moreno, tornando-se mais abundante acima dos 300 m de altitude. Os indivíduos de *C. guttata* observados na APP Morro do Moreno são sempre de hábito epifítico e locais sombreados (ciófilas) e apresentam porte menor que aqueles observados em áreas de restinga, onde em geral a espécie é terrestre e sua população encontra-se em locais expostos a altas intensidades luminosas (heliófilas) (figura 3). Possui distribuição litorânea do Paraná até o norte do Espírito Santo; em São Paulo ocorre no Alto Vale da Ribeira até o litoral. A espécie *C. guttata* é uma planta muito ornamental, bastante utilizada para produção de diversos híbridos e também é citada na lista de espécies ameaçadas do Espírito Santo e Rio de Janeiro. Floresce entre abril e maio e frutifica de janeiro a agosto (Fraga & Menezes 2000).



Figura 3 *Cattleya guttata* na APP Morro do Moreno, localizado em Vila Velha. E.S.

2.5 A Relação Ecológica: Fungos – Orquídeas

O reino Fungi representa um grupo microbiano pouco conhecido, tanto filogeneticamente quanto à ecologia específica e tem sido alvo crescente de estudos para o entendimento das suas interações com os seres vivos e com o meio que os cerca. Nas interações ecológicas (fungo-hospedeiro), por exemplo, pode haver a produção de metabólitos secundários por parte dos fungos em resposta às condições ambientais bióticas ou abióticas sofridas pelo hospedeiro. Por sua vez, esses metabólitos muitas vezes desempenham funções adaptativas essenciais ao hospedeiro, tanto em relação ao ambiente, quanto em relação à proteção contra predação e parasitismo por outros seres. Tais relações ecológicas no ambiente, em geral, são de extrema importância para o funcionamento e manutenção dos ecossistemas. As diferentes associações entre microrganismos e plantas, por exemplo, atuam no controle biológico de patógenos, influenciam na solubilização de minerais e contribuem para a estruturação ecológica dos ecossistemas (Petrini et al., 1992; Redman et al., 2002; Arnold et al., 2003; Souza et al., 2004)

Quanto aos fungos endofíticos, estes são microrganismos que vivem inter ou intracelularmente nos tecidos de sua planta hospedeira, em algum tempo do seu ciclo de vida e que podem estar associados à planta de forma neutra, simbiótica, ou antagônica. Acredita-se que todas as plantas podem ser hospedeiras de um ou mais

fungos endofíticos, já que estes foram encontrados em todas as espécies de plantas pesquisadas até o momento, podendo haver ou não interespecificidade e/ou dependência (Arditti, 1992; Pereira, 2006). O conhecimento destes microrganismos, de sua biodiversidade, da filogenia e das relações ecológicas bióticas e abióticas, é promissor e de suma importância para se entender as diferentes interações e funcionalidades em um ecossistema, para a bioprospecção e para a biotecnologia. (Rasmussen, 1995; Pereira, 2006).

Os fungos, “organismos aclorofilados, nucleados, produtores de esporos, que geralmente se reproduzem sexuadamente e assexuadamente e cujas estruturas somáticas filamentosas e ramificadas são envolvidas por paredes celulares contendo celulose, quitina, ou ambas” (Alexopoulos et al., 1996; Peterson; Massicote; Melville, 2004)., são objeto de estudo da Micologia, possuindo ainda ramificações, aplicações e disciplinas na medicina, medicina veterinária, bioquímica, genética, citologia, ecologia, dentre outras. Estes organismos são heterotróficos e, portanto não podem sintetizar moléculas orgânicas a partir de moléculas inorgânicas como fazem as plantas. Eles alimentam-se pela secreção de exoenzimas digestivas no substrato ao seu redor e então absorvem os nutrientes digeridos. Estes organismos desempenham funções ecológicas únicas nos ecossistemas e ocorrem em todos os ambientes da Terra, seja dispersos no meio ambiente, associados a vegetais, no ar atmosférico, no solo, ou na água. Eles são os principais intervenientes no seqüestro de carbono, reciclagem de nutrientes, sucessão ecológica e apresentam uma ampla gama de comportamentos e interações, podendo ser decompositores ou saprófitos, parasitas, predadores, simbioses, mutualistas e comensais (Hawksworth, 2004).

A ecologia dos fungos é especialmente importante para as plantas. Por exemplo, as sementes de orquídeas não germinam até serem inoculadas por hifas do fungo endomicorrízico do gênero *Rhizoctonia*. Mais de 90% das espécies vegetais do planeta são dependentes desta simbiose com outros tipos de fungos. A planta fornece os nutrientes, enquanto o fungo obtém água e minerais que a rede de hifas é capaz de encontrar muito mais eficientemente do que as raízes da planta (Pereira et al., 2009). Hoje, mediante os inúmeros avanços e descobertas acerca do mundo ecológico microbiano nos ecossistemas, tem se tornado possível estudos e aplicabilidades destes microrganismos como ferramentas na biodegradação, na

biorremediação e no biocontrole, temas de suma importância para a conservação e restauração ambiental (Pereira et al., 2005).

De acordo com Strobel e colaboradores (2003), as florestas tropicais e temperadas constituem os ecossistemas terrestres com maior biodiversidade do planeta e para muitos autores a diversidade fúngica atinge seu ápice em florestas tropicais (Arnold et al., 2000; Strobel et al., 2003). Para Hawksworth (2001), dentre os ecossistemas do planeta, aqueles com maior biodiversidade são também aqueles que têm apresentado maiores riquezas e freqüências de fungos endofíticos. Está implícito também que as plantas lenhosas provavelmente apresentem maior riqueza de fungos endofíticos que as plantas herbáceas e que a localização geográfica parece influenciar de várias formas significativas a produção de moléculas bioativas na planta, tanto do ponto de vista qualitativo quanto quantitativo (Strobel, 2006).

Estudos estatísticos em outros trabalhos mostraram que endofíticos de regiões tropicais produzem maior número de metabólitos ativos quando comparados àqueles presentes em outras regiões, já que estes estariam expostos a um ambiente de maior biodiversidade. Durante a evolução das plantas, associações mutualísticas com fungos endofíticos ocorreram e promoveram adaptações relacionadas à capacidade de defesa da planta contra predadores e patógenos, aumentando a taxa de crescimento vegetal, enraizamento e resistência a estresses bióticos e abióticos (Clay et al., 2002). Em contrapartida, os fungos endofíticos podem receber proteção e nutrientes do hospedeiro. Vários estudos indicam que a riqueza de fungos endofíticos pode variar sazonalmente e também em relação às variações abióticas e bióticas (Bacon, 1993; Collado et al., 1999; Redman et al., 2002; Arnold et al., 2003; Souza et al., 2004).

2.6 Dependência micorrízica das sementes de Orquídeas

Geralmente as sementes de orquídeas são diminutas, e variam em morfologia, tamanho, estruturas, cores com tamanho médio entre 300 e 800 μm , porém esta faixa de variação pode ser estendida entre de 150 a 6.000 μm (Molvray & Kores, 1995). O embrião contém poucas reservas de lipídios e proteínas que não são suficientes para serem metabolizadas para o desenvolvimento do embrião,

sendo obrigatória a infecção e colonização por um fungo micorrízico compatível no habitat, para fornecimento dos carboidratos simples necessários para sua germinação. Estes fungos são imprescindíveis para que as espécies possam se estabelecer e completar seu ciclo de vida (Smith & Read, 1997; Rasmussen, 2002; Peterson et al., 2004; Rasmussen & Rasmussen, 2007; Pereira et al., 2011)

2.6 Formas de infecção

As formas de infecção por hifas de fungo compatível em uma semente de orquídea podem ocorrer de três formas: por pêlos epidérmicos (ou rizóides), atravessando a testa da semente e pela micrópila ou por fendas no tegumento. A entrada de hifas no embrião e em células do protocórmio provoca uma série de eventos como o aumento do volume nuclear, alterações no citoesqueleto e o desencadeamento de vários ciclos de síntese de DNA na célula hospedeira. As hifas dentro da semente se deslocam por atração ao suspensor e enovelam-se formando pelotons dentro do embrião, estes pelotons separa-se da célula hospedeira por uma modificação da membrana plasmática vegetal, denominada membrana perifúngica (Peterson et al., 2004; Pereira et al 2011).

Após sucessivas divisões celulares, o embrião cresce e aumenta em volume, originando o protocórmio. Hifas de diâmetro reduzido passam de célula a célula pela produção de enzimas hidrolíticas, que tem capacidade de degradar áreas da parede celular. Após a formação do protocórmio, inicialmente os pelotons formados passam pelo processo de degradação. Desta forma, a célula hospedeira isola os pelotons degradados por constituintes da parede celular permitindo a prevenção de danos ao citoplasma do hospedeiro. Assim, a célula vegetal pode ser colonizada mais de uma vez pelas hifas dos fungos rizoctonióides (Smith & Read, 1997; Peterson et al., 2004).

2.8 Fungos micorrízicos orquídeas

Em 1879, o termo simbiose foi introduzido por Anton de Bary, que o descreveu referindo-se a organismos vivendo juntos em seu sentido amplo, englobando desde o mutualismo ao parasitismo. Somente em 1885 o botânico alemão Albert Bernard Frank propôs inicialmente o termo micorrizas, denominando-as como a associação simbiótica mutualista e não patogênica entre raízes de plantas e fungos específicos. Notaram pela primeira vez a ocorrência de fungos micorrízicos nas raízes das orquídeas tropicais e de regiões temperadas (Wahrlich, 1886; Janse, 1897 Harrison, 1998; Zhu et al., 2008)

Existem três tipos de micorrizas: endomicorrizas, ectomicorrizas e ectendomicorrizas (figura 4). As endomicorrizas caracterizam-se pelo crescimento intra e intercelular no córtex da raiz e os tipos mais representativos são as arbusculares, ericóides e orquídeas. As Ectomicorrizas caracterizam-se pelo crescimento intercelular (rede de Hartig), desenvolvendo um manto de hifas externas no entorno das raízes. As ectendomicorrizas também penetram nas células do córtex e formam a rede de Hartig (Allen, 1991).

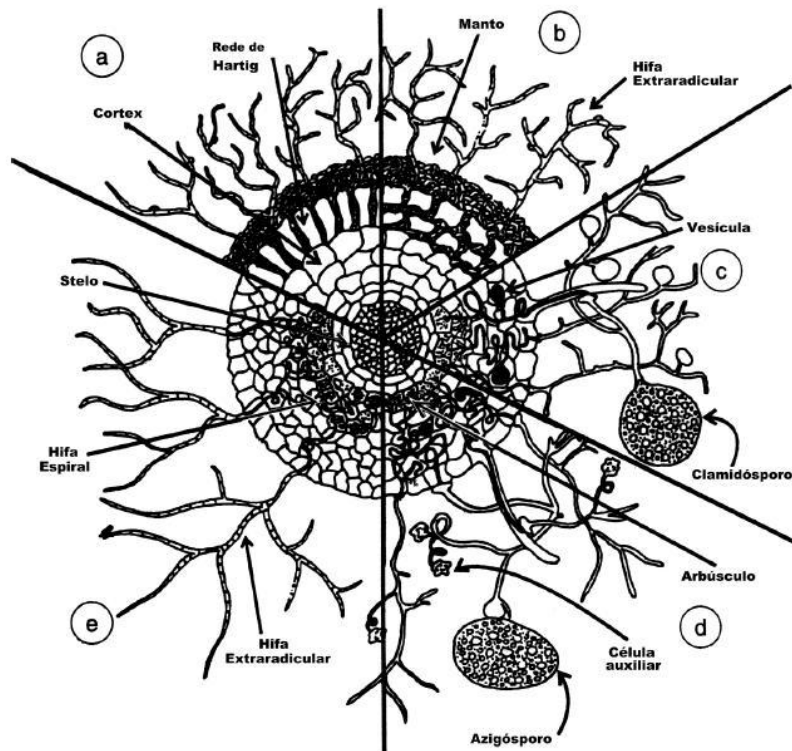


Figura 4 Diagrama ilustrativo demonstrando as formas típicas dos tipos de micorrizas. Ectomicorrizas em hospedeiros das famílias Fagaceae (a); Pinaceae (b). Fungos micorrízicos arbusculares classificados em Glomineae (c) e Gigasporineae (d). Micorriza do tipo orquídoide (e). Modificado de Sylvia et al. (1999).

2.9 Metabolismo

As micorrizas rizotonióides apresentam como forma de colonização, hifas que penetram nas raízes, atravessam o velame, a camada de exoderme e se alojam nas células do córtex formando estruturas emaranhadas e elaboradas, denominadas pelotons (Figura 5). Além das raízes, os endófitos micorrízicos também já foram encontrados nos protocórmios de orquídeas, que são formados após a germinação das sementes incapazes de produzir carbono e são destes pelotons degradados que provêm açúcares simples para o embrião (Masuhara & Katsuya, 1994; Zelmer et al. 1996; Hayakawa et al. 1999; Kristiansen et al. 2001; Rasmussen, 2002; Zettler et al. 2005). Algumas plantas jovens e adultas aclorofiladas também não são capazes de produzir carbono, dependendo do fungo para provê-lo. É verdadeiro afirmar que todas as Orchidaceae têm uma fase micoheterotrófica, por isso há dificuldade das

orquídeas se propagarem em habitat natural necessitando da presença do fungo simbiótico (Zhu et al., 2008).

Entre as vantagens da associação micorrízica orquidóide, está o fornecimento de compostos orgânicos e inorgânicos para as orquídeas. Tal fato exemplificado no trabalho de Trudell et al. (2003), que mostra o fornecimento de carbono e nitrogênio pelos fungos micorrízicos. Há ainda pesquisas que demonstram o fornecimento de fósforo (Cameron et al. 2007) e de água para permitir a germinação e o desenvolvimento do protocórmio destas plantas (Smith & Read, 1997; Yoder et al. 2000; Dearnaley, 2007; Bonfantes & Genres., 2010)

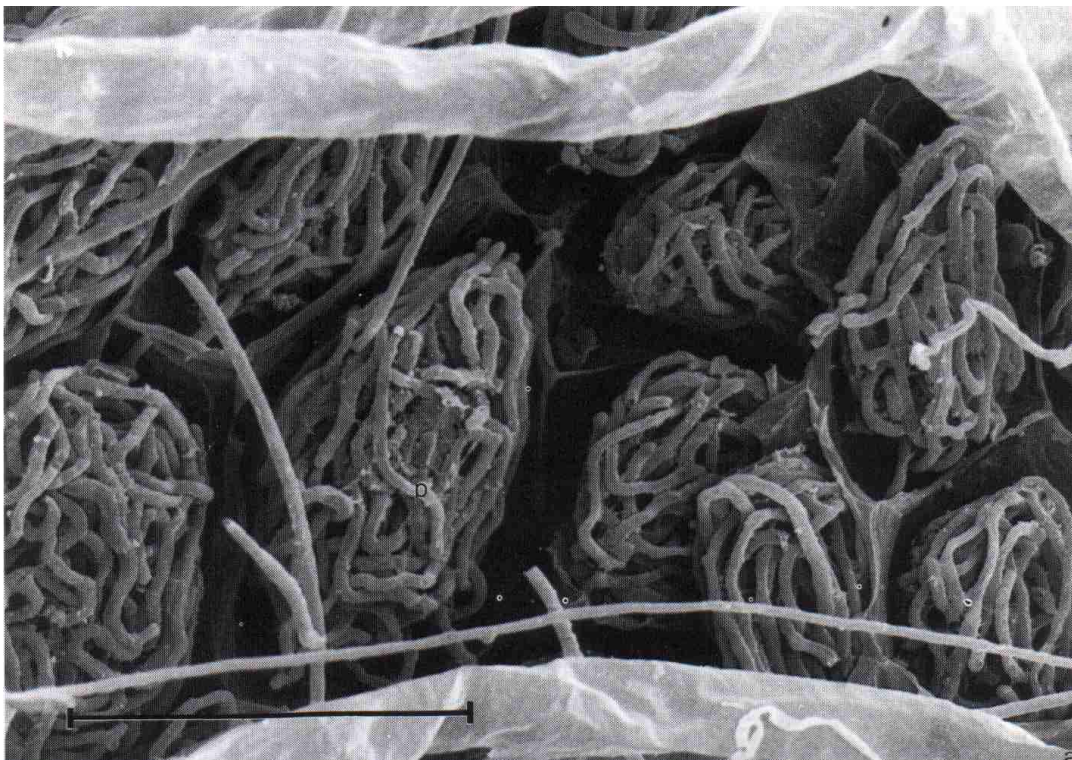


Figura 5 Pelotons de Rhizoctonia em um protocórmio de *Orchis morio*. Micrografia eletrônica de varredura Barra= 100 μ (Smith & Read, 1997).

2.10 Taxonomia de fungos rizoctonióides

O grupo Rhizoctonia-like são os mais representativos entre a associação micorrízica com a família Orchidaceae. Dentre as características mais importantes destacam-se: ramificações em ângulo reto, septo próximo ao ponto da ramificação, uma constrição na hifa ramificada próximo ao ponto de origem, formação de escleródios e septo dolipórico complexo. Em geral, apresentam cadeias (seqüências) de hifas infladas, intumescidas, em formato arredondado, como um barril, chamadas de células monilióides. As fases sexuais (teleomorfos) são raramente encontradas em laboratório ou no campo e conseqüentemente, a sistemática e taxonomia destes fungos é feita com base em seus estados anamorfos, isto é, fases assexuais (Otero et al. 2002;).

De acordo com características com base na ultraestrutura do septo e na conexão teleomorfo-anamorfo, Moore (1987) em seu estudo, agrupou diferentes gêneros anamorfos de fungos micorrízicos associados a orquídeas identificando-os como: Moniliopsis, Ceratorhiza, Epulorhiza, Ascorhizoctonia e Rhizoctonia, porém apenas o gênero Ascorhizoctonia ainda não foi registrado nessa simbiose. Os fungos do gênero Ceratorhiza possuem hifas binucleadas com parenteossoma perfurado e com teleomorfo em Ceratobasidium. Epulorhiza foi classificada por ter isolados binucleados com parenteossoma sem perfuração e possuir teleomorfo em Tulasnella. O gênero Opadorhiza agrupa fungos com teleomorfos em Sebacina. Os fungos do gênero Moniliopsis, anteriormente denominados Rhizoctonia, englobam isolados multinucleados com parenteossoma perfurado, além de seu teleomorfo estar em Thanatephorus.

A taxonomia das micorrizas rizoctonióides é difícil a nível de espécie, pelas características morfológicas a serem estudadas. Em termos gerais, abordagens sistemáticas para este grupo de fungos têm sido baseadas nas características vegetativas, condição nuclear e, quando possível, classificação em grupos de anastomose. Quando estádios teleomórficos estão disponíveis, estudos comparativos da morfologia do basídio e basidiósporos têm sido rotineiramente

empregados e, com as novas ferramentas de biologia molecular, vários destes problemas têm sido sanados (Garcia et al. 2006).

Através de culturas puras com base em isolamentos de raízes de orquídeas têm até o momento sido a principal fonte de informação sobre os endófitos simbiotes. Estes fungos simbiotes são basidiomicetos e os que geralmente são isolados são de espécies que não dispõem de conidiogênese na fase assexuada, ou seja, apresenta micélio estéril, com uma pequena tendência a esporular na cultura (Rasmussen, 2002). Pelo que foi descrito até então, a técnica de grupos de anastomose (AG) está sendo utilizada para identificação de *Rhizoctonia*, e cada AG é conhecido pela especificidade em sua variedade de hospedeiros. Cada AG é geneticamente distinto e tem facilitado a identificação dos fungos a nível de espécie e subespécie (Hayakawa et al. 1999).

2.11 Cultivo Assimbiótico e Simbiótico.

Existem duas estratégias principais para a germinação de sementes de orquídeas *in vitro*: assimbiótica e simbiótica. A germinação assimbiótica é utilizada em larga escala na floricultura para produção comercial de plantas híbridas. Quando as sementes são propagadas em um substrato úmido os embriões indiferenciados absorvem água, incham ligeiramente e podem romper a testa. Para completar o seu desenvolvimento, o embrião deve receber do meio a fonte exógena de carbono reduzido, usualmente na forma de dissacarídeos e várias espécies também necessitam ainda de vitaminas e outros fatores de crescimento. Nas sementes a embebição ativa uma série de processos fisiológicos, porém, normalmente não se detecta nenhum estágio de germinação nos primeiros 15 dias, pois as reservas de lipídios não sofrem transformação em menos de dois meses nesta cultura. Isto faz com que este processo assimbiótico venha a consumir um maior período de tempo para atingir um estágio avançado de desenvolvimento. (Smith & Read, 1997).

Na germinação Simbiótica, sementes previamente desinfetadas são embebidas em meio de cultura contendo polissacarídeos complexos como fonte de carbono. Vários substratos incluindo amido, celulose ou grãos de aveia pulverizados, entre outros, têm sido usados. Os inóculos de estirpes de fungos compatíveis serão

também adicionados. As hifas do fungo crescerão e hidrolisarão os polissacarídeos. Após a infecção das sementes, e durante o seu desenvolvimento, o fungo disponibilizará açúcares solúveis, além de vitaminas, aminoácidos e hormônios de crescimento para o embrião. A colonização pelo fungo é requerida também para estimular o desenvolvimento de glioxissomos para degradação das reservas endógenas de lipídeos, e a gliconeogênese, provendo o suporte nutricional antes do início da fotossíntese (Smith; Read, 1997; Pereira et al., 2010).

Tanto a germinação Simbiótica quanto a Assimbiótica podem ser conduzidas inicialmente em placas de Petri, no escuro, por um período variável de tempo, usualmente em ambiente controlado de câmara de crescimento. Porém, quando os protocórmios se desenvolverem, estes devem ser expostos a luz e transferidos para um recipiente adequado, que permita o seu crescimento. Desta forma, é necessário aperfeiçoar o fotoperíodo, a intensidade ideal de luz, a temperatura ótima e também a ventilação para permitir trocas gasosas. Finalmente, quando as orquídeas atingirem o estado de plântulas, estas são transferidas para tubetes contendo substrato pasteurizado e são acondicionadas em casa de vegetação para rustificação. Depois de passar por este processo estas podem ser utilizadas em programas de reintrodução em habitat natural ou na floricultura comercial (Batty, 2006; Pereira et al., 2010).

3 . MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização da área de estudo

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB), do Complexo Biopráticas, UVV – Universidade Vila Velha. As coletas de raízes das espécies *Brassavola tuberculata* Hook., *Cattleya guttata* Lindl. Foram realizadas na área de preservação permanente (APP) Morro do Moreno, Vila Velha - E.S. durante o mês de Março de 2011. Este fragmento de mata Atlântica e afloramento rochoso estão inseridos em área urbana próximo ao litoral, nas coordenadas 20°19'32.75"S e 40°16'36.91" W com altitude máxima de 189,9 m e mínima ao nível do mar (IJSN 1990; Magnano et al., 2007) (Figura 6).

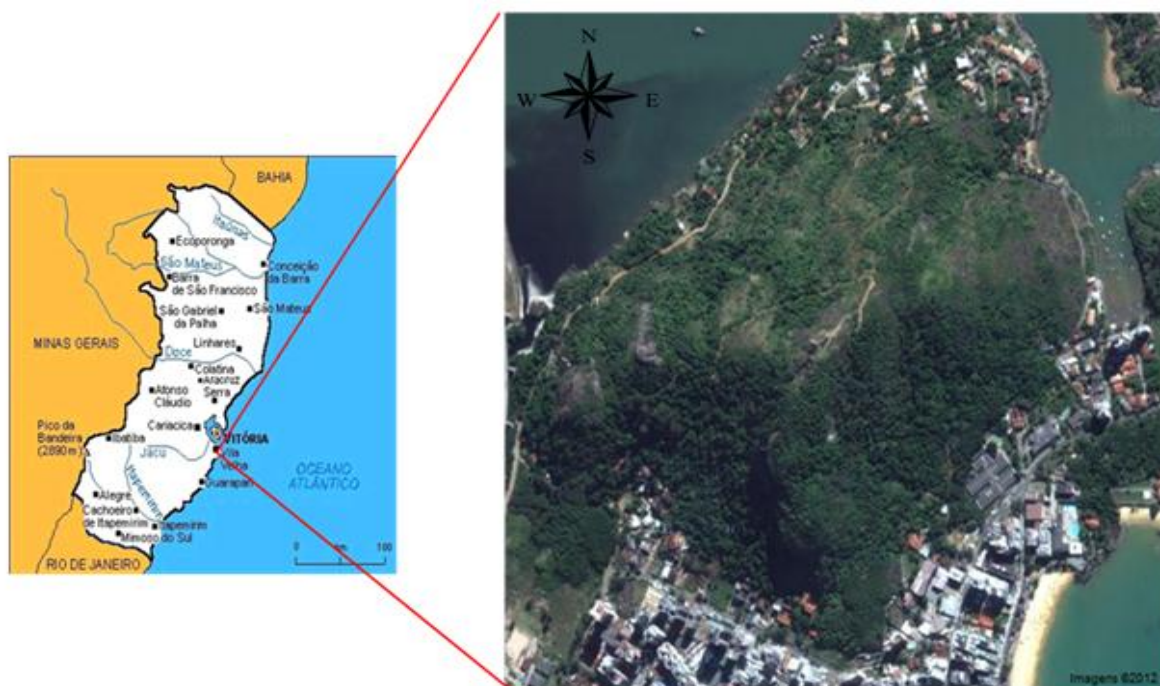


Figura 6 - Localização da APP Morro do Moreno no Mapa do estado do Espírito Santo. Foto de satélite (Google Earth 5.0, 2012) da APP Morro do Moreno, localizada no município de Vila Velha, ES.

3.2. Coleta das amostras

As coletas foram realizadas no Mês de Março de 2011 em trilhas pré definidas que existem na APP Morro do Moreno (Figura 7). Foram coletadas amostras de

raízes saudáveis de 6 plantas de *Brassavola tuberculata* e *Cattleya guttata* respectivamente. Cada ponto de coleta foi identificado e inumerado com a espécie específica e sua localização georreferenciadas com GPS de marca (CARMIN) (Tabela 1). Estas trilhas foram estabelecidas por apresentarem maior frequência de coletas e as raízes das duas espécies foram usadas para comparação da forma de colonização e especificidade de fungos micorrízicos orquídoídes quanto ao hábito rupícola e epífita das espécies.

As amostras de raízes foram cortadas em segmentos com o auxílio de luvas e materiais cortantes estéreis em seguida foram colocadas em tubos de vidros com identificação e acondicionadas em caixas de isopor com gelo a 4°C por 24 horas, mantendo íntegras suas características para posteriores análises em laboratório. As identificações das espécies de orquídeas foram realizadas com auxílio de chaves de identificações no próprio local de coleta ou quando necessário, com o auxílio de herbários depositados no departamento de botânica da UUV e da Universidade Federal do Estado do Espírito Santo (UFES).



Figura 7 Pontos de amostragem de *Brassavola tuberculata* e *Cattleya guttata* na APP Morro do Moreno, Vila Velha, E.S. Imagem obtida do software Google Earth 2012

Tabela 1. Discriminação das espécies *B. tuberculata* e *C. guttata* identificadas e enumeradas de acordo com o ponto de coleta e sua localização de acordo com o seu georreferenciamento (GPS)

PTO COLETA	ESPÉCIE	LATITUDE	LONGITUDE
1	<i>B. tuberculata</i> 1	20°19'34.9"S	40°16'35.27"O
2	<i>B. tuberculata</i> 2	20°19'35.20"S	40°16'35.40"O
3	<i>B. tuberculata</i> 3	20°19'35.43"S	40°16'35.42"O
4	<i>B. tuberculata</i> 4	20°19'32.75"S	40°16'38.50"O
5	<i>B. tuberculata</i> 5	20°19'32.92"S	40°16'38.70"O
6	<i>B. tuberculata</i> 6	20°19'33.22"S	40°16'38.60"O
1	<i>C. guttata</i> 1	20°19'32.77"S	40°16'29.77"O
2	<i>C. guttata</i> 2	20°19'33.15"S	40°16'30.26"O
3	<i>C. guttata</i> 3	20°19'33.99"S	40°16'30.33"O
4	<i>C. guttata</i> 4	20°19'42.65"S	40°16'39.72"O
5	<i>C. guttata</i> 5	20°19'42.71"S	40°16'39.66"O
6	<i>C. guttata</i> 6	20°19'42.74"S	40°16'39.72"O

3.3 Análise anatômica de colonização da associação micorrízica

As raízes das espécies *B. tuberculata* e *C. guttata* coletadas na APP Morro do Moreno, foram cortadas transversalmente em reduzida espessura, com auxílio de lâmina de aço inoxidável e pinça manualmente, com auxílio de Microscópio Estereoscópico Stereozoom Bel Photonics. Os cortes foram submetidos à coloração com Azul de Tripano (Trypan blue) diluído na proporção de 1:10, para evidenciar hifas e pélotons no sistema radicular. Os registros fotográficos e observações foram realizados em Microscópio Biológico Invertido Optech Bel Photonics, com acoplamento para câmera fotográfica digital Sony Cyber-Shot DSC-W320.

3.4 Isolamento do fungo rizotonióide

As raízes amostradas foram cuidadosamente lavadas em água corrente e cortadas em segmentos de aproximadamente 8 cm, os quais foram desinfetados superficialmente pela imersão consecutiva em etanol a 70 % por 1 minuto em

solução de hipoclorito a 20 % (0.5% de cloro ativo) por 4 minutos e lavados cinco vezes em água destilada autoclavada.

Os segmentos foram seccionados transversalmente sob lupa estereoscópica, para observação da colonização pelo fungo micorrízico (Figura 8). Das secções transversais dos segmentos de raízes contendo pélotons foi descartado o velame com auxílio de duas agulhas estéreis. Estes fragmentos de córtex colonizados foram lavados novamente em água estéril e depois transferidos para placas de Petri contendo 15 ml de meio BDA (Batata Dextrose Agar) autoclavados por 20 minutos a 1atm.

As placas foram monitoradas diariamente, e observadas o crescimento de micélio fúngico. Após 21 dias foram retirados discos de 9mm de diâmetro das bordas do micélio fúngico e transferidas para uma nova placa contendo o mesmo meio (BDA). Destas placas foram selecionados e cultivados os fungos com características semelhantes aos agrupados no gênero *Rhizoctonia* (Pereira et al,2005).

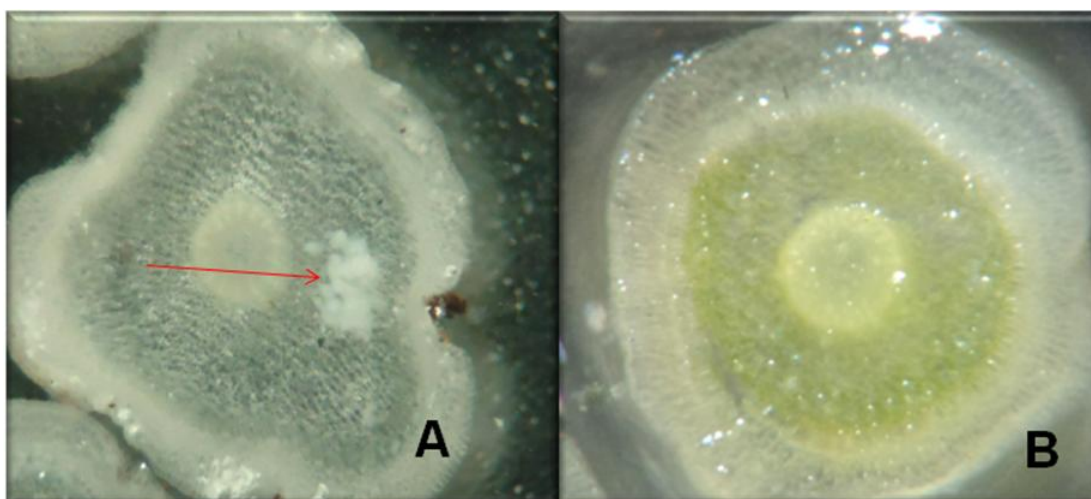


Figura 8. Corte transversal de segmento de raiz de orquídea sob Lupa estereoscópica (50X) onde mostra em A: Segmento de raiz colonizado por peloton. B. Segmento de corte transversal de raiz não colonizado por fungo micorrízico orquidóide.

3.5 Cultivo e manutenção dos fungos *Rizoctonióides*

As placas previamente identificadas em *C. Guttata* (WSCG_{1,2}) *B. Tuberculata* (WSBT_{1,2,3,4,5}) foram replicadas em 5 placas para cada morfotipo à temperatura constante de 28°C em BOD e monitoradas diariamente para acompanhamento do

crescimento do micélio fúngico. Para as análises qualitativas e quantitativas os isolados fúngicos foram incubados em meio BDA. (Batata Dextrose Agar) e CMA (Corn Meal Agar). Culturas estoque foram mantidas em placas com BDA e foram estocados também discos de 9mm de diâmetro contendo micélio em água destilada estéril em câmara a 4°C (Nogueira et al., 2005; Valadares et al., 2008).

3.6 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi realizada para os isolados obtidos de *C. Guttatae* *B. Tuberculata* utilizando parâmetros quantitativos e qualitativos adotados por (Pereira,2006).

3.6.1 Caracterização morfológica Qualitativas

As características qualitativas da colônia nas placas incubadas em BOD a28°C foram realizadas em meios de cultura BDA e CMA modificado. Os isolados cultivados nos meios foi levado em consideração as características visuais do micélio fúngico que permitia identificar este morfotipos de acordo com os seguintes critérios: coloração do micélio fúngico (branca, creme ou marrom), aspecto da colônia (grumoso, aveludado ou liso), margem da colônia (Definida ou Indefinida) Micélio aéreo (Presente ou Ausente) Zoneamento da Borda do micélio (Rendilhado ou Circular) (Currah, 1986; Currah et al., 1987; 1997; Currah & Zelmer, 1992; Zelmer & Currah, 1995) (Tabela 2).

Foram também feitas observações da presença de células monilióides em meio de aveia CMA modificado. Este meio induz o desenvolvimento de células monilióides conforme descrito por Zelmer & Currah (1995). Para melhor visualização destas células foi colocado laminulas inclinadas 45º no meio de cultura para o crescimento das hifas fúngicas. As placas foram mantidas em temperatura ambiente a 25°C por 40 dias. Após este período foram retiradas as lamínulas com hifas fúngicas e em seguida foram coradas com azul de Tripano para observação e registro fotográficos de células monilióides com auxílio de Microscópio Biológico Invertido Optech Bel Photonics, com acoplamento para câmera fotográfica digital Sony Cyber-Shot DSC-W320.

E para confirmação de que possuem as características de fungos rizoctonióides os isolados de *C. Guttata*(WSCG_{1,2}) *B. Tuberculata* (WSBT _{1,2,3,4,5.})

foram mantidos em meio de cultura BDA descritas por (Currah & Zelmer, 1992). Conforme as características a seguir: Construção da hifa na região do septo, ramificação da hifa logo após o septo, ângulo de 90⁰ nas ramificações das hifas, presença de cadeias de células monilióides e presença de escleródios. Para melhor visualização dessas características, foram também colocadas laminulas inclinadas a 45⁰ no meio de cultura por 30 dias e após este período as laminúlas contendo hifas fúngicas foram coradas com azul de tripano e posterior observação em Microscópio Biológico Invertido Optech Bel Photonics, com acoplamento para câmera fotográfica digital Sony Cyber-Shot DSC-W320. (Currah & Zelmer, 1992; Garcia et al., 2006).

Tabela 2 Características culturais dos isolados de *Cattleya guttata* (WSCG) e *Brassavola tuberculata* (WSBT1,2,3,4,5) após 21 dias de incubação a 28°C.

Isolado	Cor	Aspecto	Margem	Micélio aéreo	Zoneamento
WSCG	Creme	Cotonoso	Indefinida	Presente	Rendilhado
WSBT 1	Branca	Cotonoso	Definida	Presente	Circular
WSBT 2	Marrom escuro	Aveludado	Definida	Presente	Circular
WSBT 3	Branca	Cotonoso	Definida	Presente	Circular
WSBT 4	Branca	Aveludado	Definida	Presente	Circular
WSBT 5	Creme	Cotonoso	Definida	Presente	Circular

3.6.2 Caracterização morfológica Quantitativas

Foi avaliado diariamente o diâmetro da colônia para o cálculo das taxas de crescimento em meio BDA (Batata Dextrose Agar, ACUMEDIA) e meio CMA (Corn Meal Agar, ACUMEDIA) segundo descrito por (Pereira et al. 2009). Discos de ágar de 9mm de diâmetro retirados da borda da colônia crescida em meio BDA contendo micélio fúngico dos isolados de *C. Guttata* (WSCG_{1,2}) *B. Tuberculata* (WSBT_{1,2,3,4,5}), foram transferidos para o centro de três placas de Petri contendo 15 ml do meio de cultura e incubadas a 28 °C em BOD. A taxa de crescimento em mm h⁻¹ foi

determinada com base nas variações diárias dos diâmetros das colônias dia até atingir o tamanho das placas no intervalo de 30 dias. Para isso, foram usadas duas linhas perpendiculares traçadas no verso da placa, utilizando o disco de ágar como o centro da intersecção das linhas. Neste caso, o parâmetro diâmetro do micélio fúngico foi usado como uma característica morfométrica para calcular a taxa de crescimento do micélio fúngico (Nogueira et al., 2005).

3.7 Identificação dos Isolados

Para o procedimento de identificação dos isolados fúngicos, foi seguido o proposto pelos estudos de Moore (1987) e Currah e Zelmer (1992), que descreveram chaves e notas para os fungos micorrízicos orquidóides com base em características morfológicas.

3.8 - Análises estatísticas

O delineamento experimental dos dados quantitativos foi inteiramente casualizado com 4 repetições. Foram analisadas e testadas as diferenças entre as médias utilizado-se o teste de Scott-Knott para mostrar se existe significância (5%) na taxa de crescimento entre os morfotipos apresentados (Nogueira et al., 2005).

4. RESULTADOS

4.1: Análise de colonização da associação micorrízica nas espécies *B. tuberculata* e *C. guttata*.

As observações realizadas por microscópio biológico invertido revelaram a presença de pelotons nos cortes transversais das raízes de *B. Tuberculata* e *C. guttata*. De acordo com a (Figura 9) a distribuição dos pelotons ocorreram colonização alternada no mesmo segmento de raízes das espécies analisadas (Pereira et al., 2005).

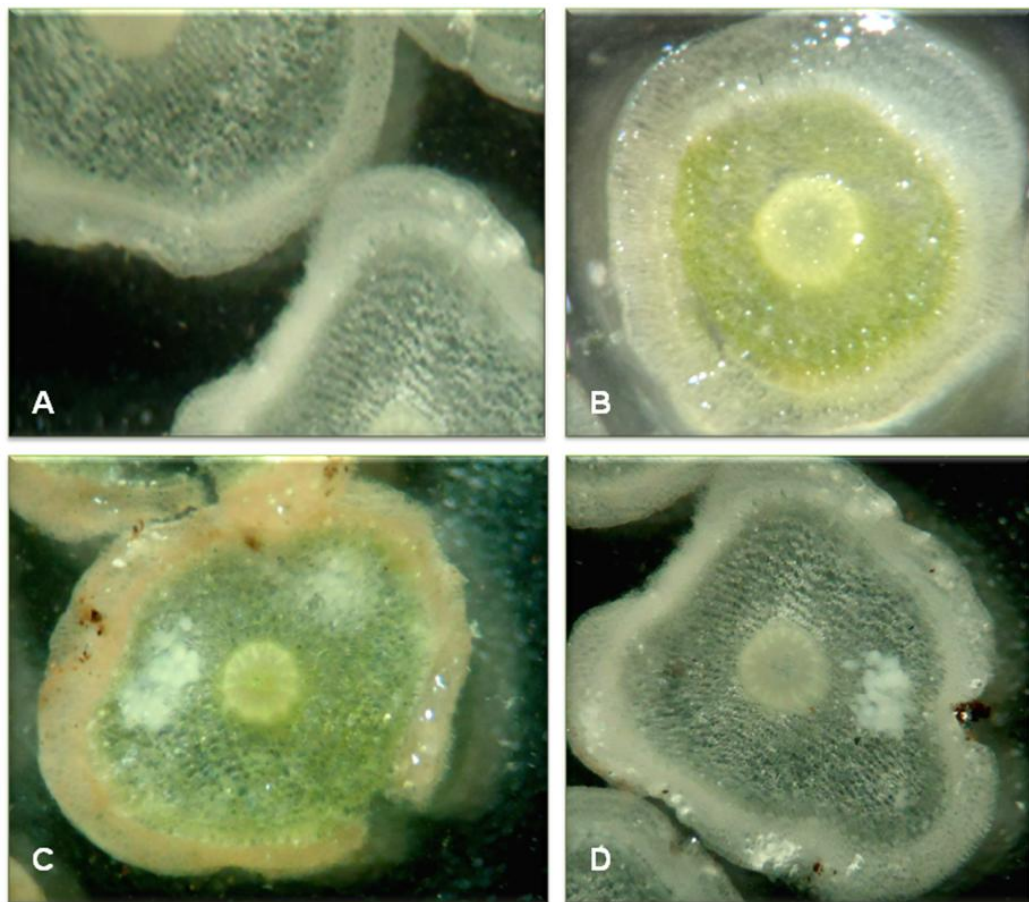


Figura 9 Cortes transversais de raízes de orquídeas sem tratamento onde mostra em (A,B) ausência de pelotons na região do córtex, enquanto que em (C,D) existe a presença de pelotons na região do córtex da raiz espécies analisadas.

Quanto à colonização por hifas fúngicas apresentada pela (figura 10) os pelotons estavam dispostos na área do córtex das raízes tanto para *B. tuberculata*

quanto para espécie *C. guttata*. Estas estruturas enoveladas de hifas estavam presentes em todos os estádios de desenvolvimento, podendo estar intactos ou degradados evidenciados com coloração de azul de tripano (A.). As Hifas micorrízicas também foram observadas na extensão da superfície externa do velame da raiz (B) (Richardson et al., 1993; Pereira et al., 2005b). Além do velame, foram observadas hifas fúngicas nas células de passagem da exoderme (ex), que são células de paredes mais delgadas (C) Desta forma, pode-se sugerir que os fungos, após infecção das raízes, passam preferencialmente por estas células de passagem para ter acesso a região do córtex (D).

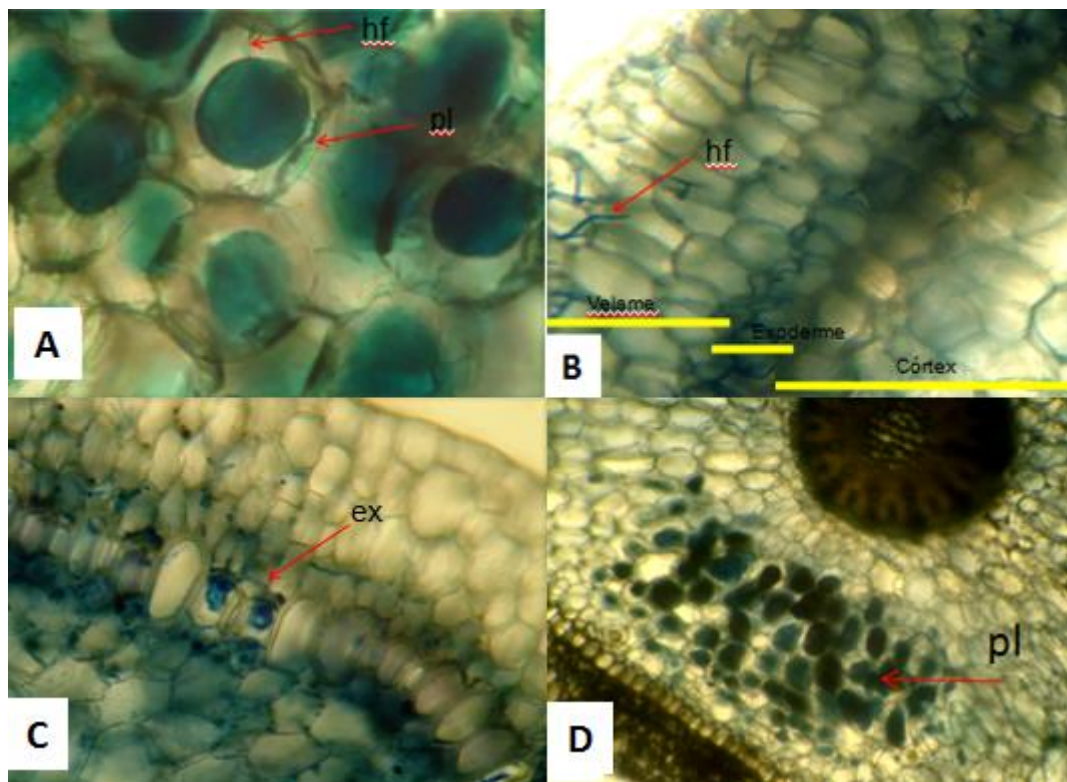


Figura 10 Cortes transversais de raízes de orquídeas com tratamento de azul de tripano, onde mostra em (A) pelotons (pl) em vários estádios de desenvolvimento, podendo estar intactos e degradados. Em (B) presença de hifas fúngicas (hf) na região do velame (vl); Em (C) hifas atravessando a camada da exoderme (ex) pelas células de passagem (cp) e finalmente em (D) pelotons localizados na região do córtex.

4.2 Isolamento e identificação dos isolados

A figura 11 apresenta resultados identificando características de fungos micorrízicos orquídoídes nos isolados das duas espécies de orquídeas, um de *C. guttata* (WSCG₁) e cinco de *B. tuberculata* (WSBT_{1,2,3,4}). Entre tais características todos apresentaram em cortes transversais de segmentos raízes a presença de pelotons na região externa do córtex (A) e após o crescimento desses fungos em meio de cultura BDA e CMA com posterior análise de visualização microscópica todos os isolados apresentaram também, presença de escleródios (B) constrição da hifa na região do septo, ramificação da hifa logo após o septo em ângulo reto (C) e presença de propagulos de resistência chamadas de células moniliódes nos isolados WSCG₁ e WSBT₁ respectivamente (D,E).

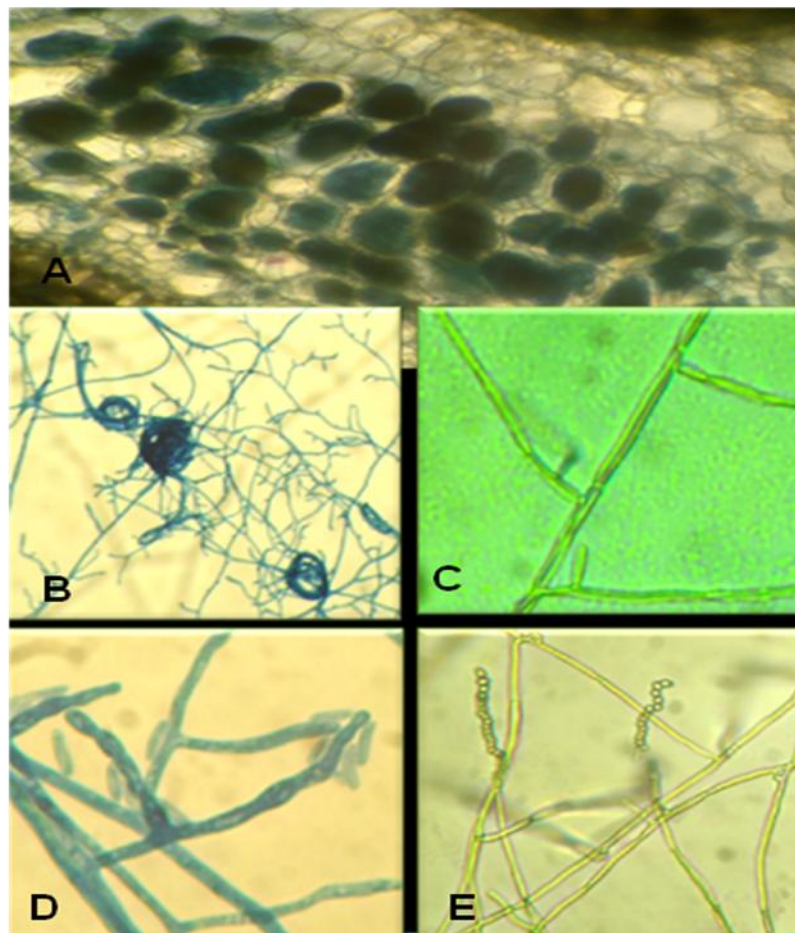


Figura 11 A. Presença de Pelotons; B-Presença de escleródios; C. Características de fungos Rhizoctoniódes com presença constrição da hifa na região do septo,

ramificação da hifa logo após o septo e em ângulo reto; D. Células moniliódes do isolado WSCG₁; E. Células moniliódes do isolado WSBT₁.

4.3 *B. tuberculata*

Pélotons intactos e degradados foram observados em raízes de *B. tuberculata*. A maior parte dos fragmentos de raízes estava densamente colonizada por pélotons, que ocupavam boa a região externa do córtex. Os fragmentos de raízes colonizadas foram facilmente diferenciados dos fragmentos não colonizados. Uma melhor visualização foi confirmada com coloração de azul de tripano nos segmentos de cortes de raízes e analisados em microscópio biológico invertido com aumento de 400X (Figura 12).

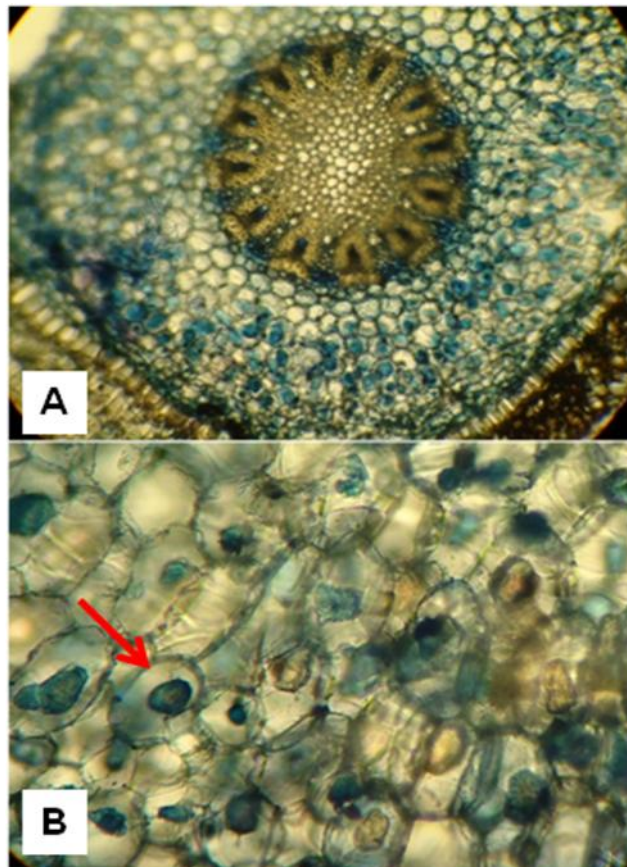


Figura 12 A figura mostra a colonização de fungos micorrízicos em raiz de *B. Tuberculata*. Observa-se uma maior colonização de pelotons em toda circunferência da região do córtex (A) e em (B). Visualização de pelotons na região cortical. Aumento de 400X.

4.4 *C. guttata*

A espécie *C. guttata* apresentou uma colonização de pelotons bem mais característica na região do córtex. Os Pelotons intactos e degradados foram observados mais concentrados na região do córtex onde a raiz tem contato com o substrato ou tronco de árvore. Para ter uma melhor visualização foi confirmado com coloração de azul de tripano nos segmentos transversais de cortes de raízes e analisados em microscópio com aumento de 400X como visto anteriormente (Figura 13).

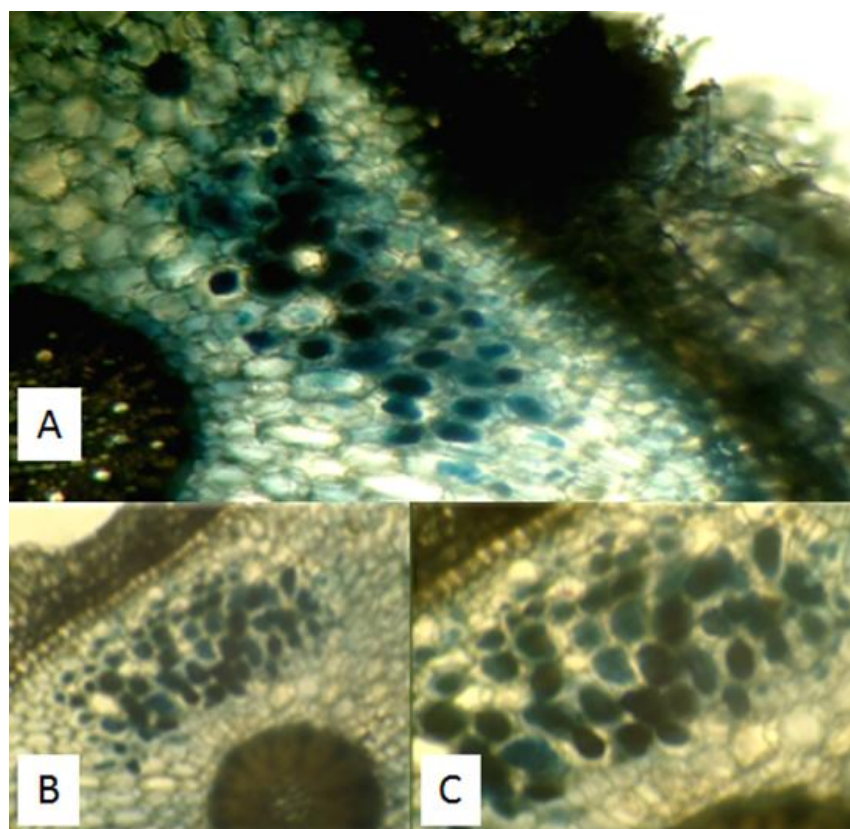


Figura 13 (A) - A figura demonstra em corte transversal de raiz de *C. Guttata* com tratamento de azul de tripano a colonização de pelotons e local de contato com o substrato sendo o local de infecção fúngica. (B,C) - Região do córtex onde estão mais concentrados os pelotons.

4.5 Caracterização Morfológica

4.5.1 Dados qualitativos

De acordo com parâmetros qualitativos dos isolados após 21 dias de incubação em meio BDA, Pode-se distinguir tres grupos de fungos: O primeiro grupo (WSBT_{1,3,4,5}) compreendem todos os isolados de cor creme e branca e com micélio aéreo presente e margens circulares. O segundo grupo (WSBT₂) foi formado por fungo de coloração marron escura, aspecto aveludado e micélio aéreo de aspecto cotonoso e margem bem definida sobre o meio de cultura e entre todos os isolados foi o morfotipo que obteve a menor taxa de crescimento. O último grupo (WSCG₁) compreende o isolado de cor creme, com aspecto aveludado, micélio aéreo presente com margen rendilhada e hifas marginais imersas no meio de cultura (Figura 14).



Figura 14 Fotos dos isolados de *C. guttata* (WSCG₁) e *B. tuberculata* (WSBT_{1,2,3,4,5}) após 21 dias de incubação em BOD.

4.5.2 Dados quantitativos

Para análise de taxas de crescimento do micélio fúngico em meios de culturas BDA e CMA a taxa de crescimento em mm h^{-1} foi determinada com base nas variações diárias dos diâmetros das colônias, em dois intervalos de tempo (72 horas e 21 dias), até a colônia atingir o tamanho total da placa.

4.6 Taxa de Crescimento diário (mm h^{-1}) do micélio fúngico em meio BDA e CMA após 72 horas.

De acordo com as taxas de crescimento apresentada em meio de cultura BDA e CMA após 72 horas o isolado WSBT₁ foi o que apresentou menor taxa de crescimento em meio de cultura CMA ($0,048\text{mm h}^{-1}$) e o isolado WSCG₁ obteve a menor taxa de crescimento em meio de cultura BDA $0,049\text{mm h}^{-1}$. O isolado WSBT₂ foi o que apresentou a menor taxa de crescimento nos dois meios de cultura. Sendo destacado o isolado WSBT₄ e WSBT₅ com maiores valores de taxa de crescimento mm h^{-1} como pode ser observado na (Tabela 3).

Tabela 3 Dados quantitativos: Taxas de crescimento (TC) e diâmetro após 72 horas (D) em meios BDA e CMA.

CÓDIGO	TC BDA (mm h^{-1})	TC CMA(mm h^{-1})	D BDA - cms	D CMA - cms
WSCG	0,0490	0,0515	1,607	1,643
WSBT 1	0,06993	0,0488	1,907	1,603
WSBT 2	0,04909	0,0456	1,607	1,557
WSBT3	0,05833	0,0388	1,740	1,460
WSBT4	0,08104	0,0845	2,067	2,117
WSBT5	0,06618	0,0838	1,853	2,107

4.7 Crescimento diário (mm h^{-1}) do micélio fúngico em meio BDA após 21 dias.

Os isolados apresentaram taxa de crescimentos variados após 21 dias de incubação em meio de cultura BDA. De acordo com teste Scott-not ficou demonstrado que os isolados WSCG₁ e WSCG representados por letras iguais na (figura 15) não apresentaram diferenças significativas para o crescimento micelial, enquanto que os demais isolados WSBT₂, WSBT₃, WSBT₄, WSBT₅ apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para o crescimento micelial representada na (figura 15) por letras distintas.

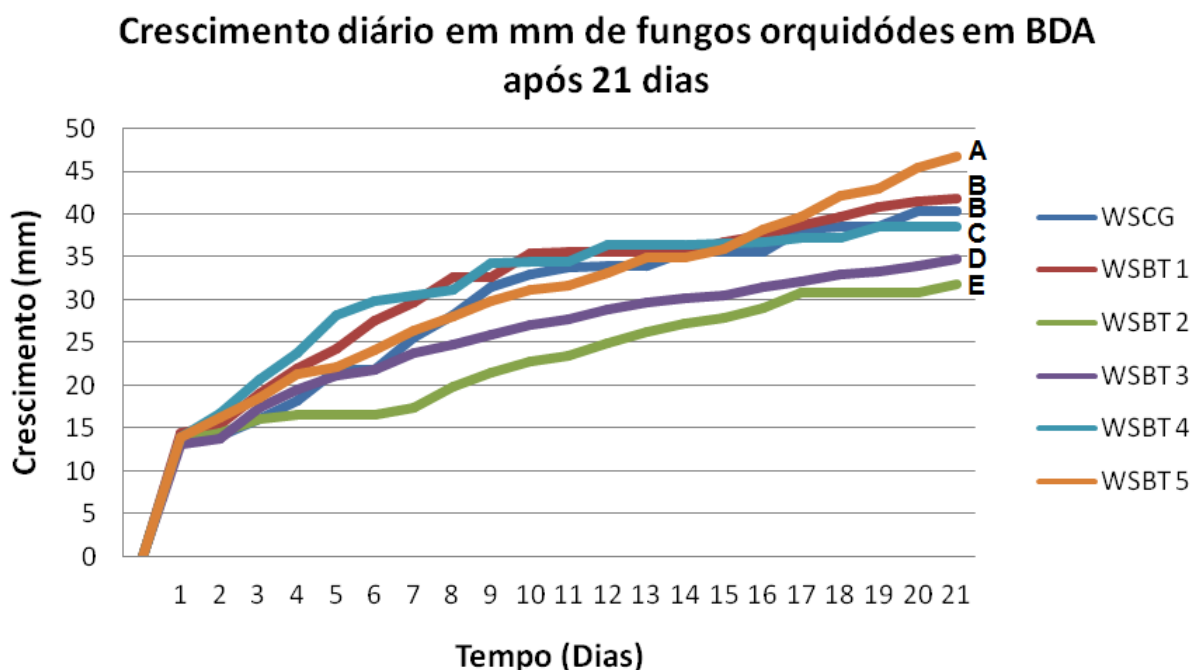


Figura 15 Taxa de crescimento diário em (mm h^{-1}) de micélio fúngico nos isolados WSCG₁, WSBT_{1,2,3,4,5}, em meio de cultura BDA após 21 dias de incubação das espécies de orquídeas estudadas. Médias seguidas de letras distintas apresentam diferenças significativas para o crescimento micelial pelo teste Scott-not ($p < 0,05$).

4.8 Crescimento diário (mm h^{-1}) do micélio fúngico em meio CMA após 21 dias.

No meio de cultura CMA após 21 dias de incubação os isolados apresentaram diferenças significativas para taxa de crescimento micelial para todos os isolados de acordo com teste Scott-not ($p < 0,05$) (Figura 16).

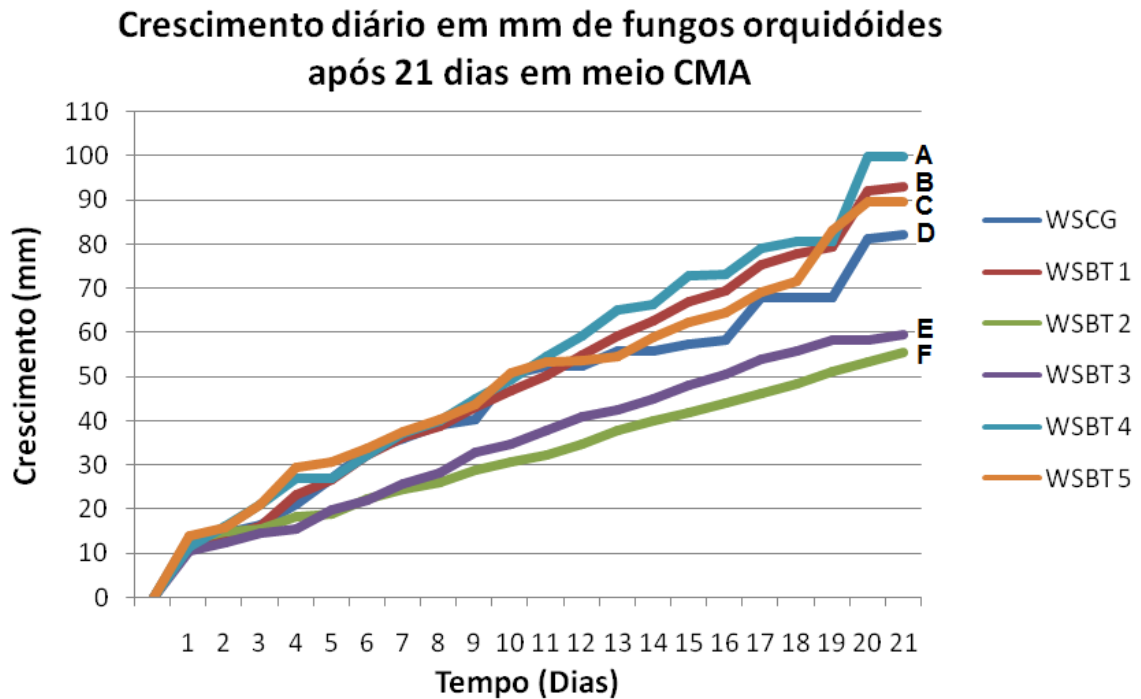


Figura 16 Crescimento diário em (mm h^{-1}) de micélio fúngico nos isolados WSCG₁, WSBT_{1,2,3,4,5}) em meio de cultura CMA após 21 dias de incubação das espécies de orquídeas estudadas. Médias seguidas de letras distintas apresentam diferenças significativas para o crescimento micelial pelo teste Scott-not ($p < 0,05$).

De acordo com resultados obtidos com base nas características de grupos anamórficos de fungos rizoctonióides, a análise dos isolados obtidos na pesquisa em questão mostrou-se positiva para todos os grupos WSCG₁ e WSBT₁, WSBT₂, WSBT₃ e WSBT₄ (Figura 8). O isolado WSBT₅ foi excluído por não apresentar as características de fungos rizoctonióides e maior incidência de contaminação e proliferação com formação de colônias no meio de cultura (Otero, 2007).

5. DISCUSSÃO

A técnica de isolamento a partir da incubação de fragmentos do córtex das raízes desinfestadas das espécies *B. tuberculata* e *C. guttata*, com observação prévia dos pélotons, permitiu a identificação de morfotipos com características de fungos orquidóides. Desta forma foi possível separar fragmentos com pouca ou nenhuma colonização visível com auxílio de estereoscópio (Otero; Ackerman; Bayman, 2002). Por isto, um passo importante no uso desta técnica foi o reconhecimento das características de fungos rizoctonióides observando a posição dos septos, ramificações das hifas em ângulo reto, presença de células monilióides e presença de escleródios, que pode ser realizada com auxílio da microscopia óptica sob aumento de 400x. Os métodos de isolamento a partir dos fragmentos de raízes privilegiam os fungos de crescimento rápido, podendo levar a um resultado precipitado do ponto de vista da diversidade de fungos existentes (Pereira, 2006).

Existem três formas de associação entre um fungo e a planta micorrizada. O metabolismo fotossintético é aquele em que a planta é autossuficiente, não necessitando de adquirir carbono do fungo e sim, somente água e sais minerais. O fungo também oferece à planta proteção contra fatores bióticos e abióticos do substrato. Já no metabolismo mixotrófico a planta não é capaz sozinha de suprir toda a sua necessidade de carbono, necessitando do fungo para complementar essa necessidade. Neste caso, a planta pode estar em condições ambientais em que a fotossíntese está em seu ponto de compensação luminoso ou mesmo abaixo. No metabolismo mico-heterotrófico a planta possui como fonte de carbono somente o que é oferecido pelo fungo, como acontece com as orquídeas aclorofiladas. Podem ocorrer variações dessa interação, dependendo das condições ecológicas e ambientais em que a relação vai se estabelecer (Selosse; Richard; Simard, 2006).

Nas interações ecológicas (fungo-hospedeiro) avaliada nas duas espécies *B. tuberculata* e *C. Guttata*, por exemplo, pode haver a produção de metabólitos secundários por parte dos fungos em resposta às condições ambientais bióticas e/ou abióticas sofridas pelo hospedeiro. Por sua vez, esses metabólitos muitas vezes desempenham funções adaptativas essenciais ao hospedeiro, tanto em relação ao ambiente, quanto em relação à proteção contra predação e parasitismo por outros seres. Tais relações ecológicas no ambiente, em geral, são de extrema importância

para o funcionamento e manutenção dos ecossistemas. As diferentes associações entre microrganismos e plantas, por exemplo, atuam no controle biológico de patógenos, influenciam na solubilização de minerais e contribuem para a estruturação ecológica dos ecossistemas (Petrini et al., 1992).

Quanto à forma de colonização ficou demonstrado que a espécie *B. tuberculata*, por ter hábito rupícola, ocorre maior colonização de pelotons em toda circunferência da raiz estando presentes na região mais externa do córtex. Tem como resultado a presença de diferentes morfotipos isolados em meio de cultura provenientes de fragmentos de raízes com pelotons (WSBT₁, WSBT₂, WSBT₃, WSBT₄ e WSBT₅). Vários pontos de colonização foram observados ainda em um mesmo segmento de raiz, este fato pode indicar que essas espécies são colonizadas por propágulos de fungos do solo, e não somente por fungos associados desde a germinação. Assim como diferentes espécies de fungos podem colonizar simultaneamente o mesmo sistema radicular (Zelmer et al., 1996). O fungo responsável pelo processo de germinação necessariamente não é o mesmo da fase adulta (McCormick et al., 2004). Isto indica que espécies rupícolas e terrestres são mais generalistas quanto a esta associação (Pereira et al., 2011; Peterson & Massicotte, 2004)

A colonização da espécie *C. guttata*, com hábito epífita nesta área de pesquisa, mostrou-se mais localizada em uma região do córtex, que por meio de cultura foi isolado apenas um morfotipo (WSCG) evidenciando que nas espécies epífitas a entrada de fungos nas raízes deve-se a fatores de injúria ou de contato com o substrato ou com o forófito em que a planta esteja apoiada. Trabalhos de vários autores entre eles (Otero et al., 2007; Rasmussen, 2002) descrevem bem esta preferência sugerindo que a infecção pode ocorrer em áreas diferenciadas ao longo de um mesmo segmento de raiz e este resultado também foi observado na análise de raízes de outras orchidaceae tropicais de hábito epífita (Pereira et al., 2005).

Portanto a associação micorrízica é um sistema biológico compartimentalizado, formado a partir da interação entre substrato, planta e fungo micorrízico. Por este motivo, fatores que afetam a biologia do fungo, as condições fisiológicas da planta ou a fertilidade do substrato influenciam a dinâmica da interação. Em um ambiente estressante, pobre em nutrientes ou com falta de água

em alguma época do ano, as plantas se beneficiam da associação micorrízica para suplementar a absorção de nutrientes e água (Smith; Read, 1997).

Entretanto, (Cameron et al., 2007) demonstraram pela primeira vez a passagem de carbono e de nitrogênio de plantas adultas de *Goodyera repens* para o fungo associado. Nesse trabalho também foi demonstrado que o fungo micorrízico continua a suprir com carbono as plantas adultas fotossintéticas. Estes resultados, diferentes dos estudos anteriores, podem ser atribuídos à maior atividade fisiológica tanto da planta quanto do fungo simbiote. O ambiente de cultivo estabelecido durante o experimento reproduziu melhor as condições naturais, otimizando a interação entre o fungo e a planta. As orquídeas variam quanto a sua “preferência” micorrízica (Otero et al., 2007). Uma relação de especificidade mais estreita pode ser um motivo da raridade e vulnerabilidade da espécie vegetal (Rasmussen, 2002). Em contraste, orquídeas largamente distribuídas são geralmente mais generalistas em suas preferências por fungos micorrízicos ou, especificamente associadas a um fungo muito bem distribuído, como acontece em várias relações mutualísticas (Vazquez et al., 2003;).

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

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

Podemos concluir que em relação às características morfológicas quantitativas e qualitativas apresentadas por todos isolados neste trabalho, com exceção do WSBT₅ que os morfotipos isolados são fungos rizotonióides tal como observados em outros trabalhos (Rasmussen, 2002; Pereira et al, 2005).

6. CONCLUSÕES

A espécie *C. guttata* possui hábito epífita e foi isolado apenas um morfotipo de fungo rizoctonióide (WSCG) demonstrando maior especificidade na relação planta – fungo e com isso a espécie está menos dependente desta associação, sendo que as plântulas epifíticas, que têm acesso imediato a luz, podem começar o processo fotossintético logo nos primeiros estádios de desenvolvimento, enquanto que estas mesmas plantas são altamente dependentes desta simbiose para a germinação de suas sementes na natureza por não apresentarem tecido de reserva no seu embrião.

Quanto à espécie *B. tuberculata* por ter hábito rupícola nesta área de estudo teve a maior variedade de morfotipos isolados (WSBT₁, WSBT₂, WSBT₃, WSBT₄) o que demonstra a uma maior dependência da relação fungo – planta. Fato este relatado por Rasmussen (2005), em orquídeas tropicais rupícolas e terrestres usualmente têm contato com solos muito intemperizados e de baixa fertilidade.

Existe ainda a necessidade de investigar as relações simbióticas entre os fungos endofíticos e a planta hospedeira e conferir as vantagens adaptativas e de sobrevivência da planta na natureza tais como tolerância aos estresses bióticos e abióticos e sua permanência em seu habitat.

7. REFERÊNCIAS

As citações e referências bibliográficas da dissertação foram realizadas seguindo as normas da ACTA BOTANICA BRASILICA disponíveis no site:

<http://www.acta.botanica.org.br>

- Alexopoulos, C.J.; Mins, C.W.; Blackwell, M. **Introductory Mycology**. 4 Ed. New York. John Wiley & Sons, 1996. 869.
- Allen, M. F. The ecology of mycorrhizae. Cambridge: **Cambridge University Press**, 1991. 184p.
- Araujo, D. S. D. 2000. Análise florística e fitogeográfica das restingas do do Rio de Janeiro. **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro.
- Arditti, J. **Fundamentals of orchid biology**. John Wiley & Sons, 1992.691 p.
- Arnold, A. Elizabeth et al. **Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?** Blackwell Publishing: Blackwell Synergy, Tucson, v. 3, n. 4, p.267-274, jul. 2000.
- Assis, A. M.; Faria, 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**, Maringá, v.27, n.2, p.255-260, 2005.
- Batista, J.A.N.; Bianchetti, L.B.; Pellizzaro, K.F. **Orchidaceae da Reserva Ecológica do Guará**, DF, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, 19 (2): 221-232,2005
- Bonnardeaux, Y.; Brundrett, M.; Batty, A.; Dixon, K.; Koch, J.; Sivasithamparam, K. Diversity of mycorrhizal fungi in terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. **Mycological Research. Cambridge**, v. 111, n. 1, p. 51-61, jan. 2007.

- Boldrini, R. F.; Santos, W. O.; Cruz Z. M. A.; Ramos A. C. Bases da associação micorrízica orquídeide. **Natureza on line**, 8 (3): 140-145. 2010.
- 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**. London, v. 99, n. 5, p. 831-834, 2007.
- Clay, Keith; SCHARDL, Christopher. Evolutionary Origins and Ecological Consequences of Endophyte Symbiosis with Grasses. **The American Naturalist**, Chicago, v. 160, n. , p.99-127, 2002.
- Collado, I. G., Hernandez, G. R; Prieto, M. V; Hanson, J. R. and Rebordinos, L. G. **Biologically active sesquiterpenoid metabolites from the fungus Botrytis cinerea**. **Phytochemistry**, v. 41, n. , p. 513–517, 1996.
- Cogniaux, A. Orchidaceae. Pp. 1-642 in Martius C.F.P. von., Eichler, A.W. & Urban, I., Flora Brasiliensis. Munchen, Wien, Leipzig, **Flora Brasiliensis** 3 (5). 1898-1902
- Cunha, M.F.B.; Forzza, R.C.. Orchidaceae no Parque Natural Municipal da Prainha, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, 21 (2): 383-400. 2007
- Currah, R. S.; Zelmer, C. D. A key and notes for the genera of fungi mycorrhizal with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. Reports of the Tottori **Mycological Institute**. Tottori, v. 30, p. 43-59, 1992.
- Dearnaley, J. D. W The fungal endophytes of *Erythrorchis cassythoides* – is this orchid saprophytic or parasitic? **Australasian Mycologist**. Sidney, v. 25, n. 2, p. 51-57, 2006.
- Dearnaley, J. **Further advances in orchid mycorrhizal research**. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 17, n. 6, p. 475-486, 2007.
- Dressler, R. L. 1981. **The Orchids: natural history and classification**. Harvard, Harvard University Press. p. 332.
- Elias, C.; Fernandes, E.A.D.N.; França, E.J.D.; Bacchi, M.A. 1997. Seleção de epífitas acumuladoras de elementos químicos na Mata Atlântica. **Biota Neotropica** jan/abr 2006.

Faria, T.R.; Rego, L.V.; Bernardi, A. & Molinari, H. Performance of different genotypes of Brazilian orchid cultivation in alternatives substrates. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, n.4, p.337-342, 2001.

Fraga, C. N..Ecologia, fitogeografia e conservação das Orchidaceae da restinga do Estado do Espírito Santo..**Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro. 2000

Fraga, C.N. & Menezes, L.F.T. Orchidaceae. Pp.33-34 in Secretaria Municipal do Meio Ambiente do Rio de Janeiro, eds. Espécies ameaçadas de extinção no do Rio de Janeiro: flora e fauna. **Fundo de Conservação Ambiental**. 2000.

Fraga, C. N. & Peixoto, A. L. Florística e ecologia das Orchidaceae das restingas do estado do Espírito Santo. **Rodriguésia** 55 (84): 5-20. 2004.

Garcia, V. G.; Onco, M. A. P.; Susan, V. R. Review. Biology and Systematics of the form genus Rhizoctonia. **Spanish Journal of Agricultural Research**. Spain, v. 4 n. 1, p. 55-79, 2006.

Godoy, R.Z.; Costa, C.G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero Cattleya Lindl. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v17 (n1), jan./ mar. 2003.

Gonzalez, G. V.; M.A. Portal, O. V; Rubio, O Susan. Review. Biology and Systematics of the form genus Rhizoctonia. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 4, p.55-79, 2006.

Giongo, C.; Waechter, J.L. Composição florística e estruturacomunitária de epífitos vasculares em uma floresta de galeria na Depressão Central do Rio Grande do Sul. **Revistabrasileira de Botânica**, São Paulo, v27(n3), ,jul./ set. 2004.

Giulietti, A. M.; Harley, R. M.; Queiroz, L. P.; Wanderley, M. G. L.; Van den Berg, C. **Biodiversity and conservation of plants in Brazil. Conservation Biology**. Massachusetts, v. 19, n. 3, p. 632-639, jun. 2005.

Hayakawa, S.; Uetake, Y.; Ogoshi, A. Identification of symbiotic Rhizoctonias from naturally occurring protocorms and roots of *Dactylorhiza aristata*. **Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University**. Hokkaido, Japan, v. 69, n. 2, p. 129-141, 1999.

Harrison, M. J. Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**. Oxford, v. 4, n. 1, p. 360-365, ago. 1998.

Hawksworth, David L. The magnitude of fungal diversity : the 1±5 million species estimate revisited. **Mycol. Res.**, Madrid, Spain, v. 105, n. 12, p.1422-1432, 14 dez. 2001.

Hawksworth, David L. **Fungal diversity and its implications for genetic resource collections**. Studies In Mycology, Madrid, v. 50, n. , p.9-18, 2004.

Harrison, M. J..**Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis**.Current opinion in plant Biology. 1998. 360-365.

IBAMA. Morro do Moreno. Disponível em: <http://www.morrodomoreno.com.br/mais_historia.asp> Acesso em 15 nov. 2009.

Joly, A. B. Botânica: **Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

Kristiansen, K. A.; Rasmussen, F. N.; Rasmussen, H. N.; Seedlings of *Neuwiedia* (Orchida-ceae: subfamily Apostasioideae) have typical orchidaceous mycotrophic protocorms. **American Journal of Botany**. Ohio, v. 88: n. 5, p. 956-959, 2001.

Machado, E. F. **História do patrimônio natural do Espírito Santo: Orquídeas:** livro documental. Rio de Janeiro: Documenta Histórica, 2008. p. 19-41.

Masuhara, G. & Katsuya, K. In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoema* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). **New Phytol.**, 127:711-718, 1994.

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

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

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

Molvray, M.; Kores, J. P. Character analysis of the seed coat in Spiranthoideae with special reference to the Diurideae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**. Ohio, v. 82, n. 11, p. 1443-1453, 1995.

Nogueira, R. E.; Pereira, O. L.; Kasuya, M. C. M.; Lanna, M. C. S.; Mendonça, M. P. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**. São Paulo, v. 19, n. 3, jul-set, 2005.

Oliveira, M. L. M. P.: 2000. Uma Possibilidade de Gestão Participativa, Recife-PE. 55p. Monografia (Curso de Especialização em Gestão e Controle Ambiental) **Escola Politécnica de Pernambuco** – Universidade de Pernambuco.

Otero, J. T.; Ackerman, J. D.; Bayman, P. Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. **American Journal of Botany**. Ohio, v. 89, n. 11, p. 1852-1858, 2002.

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

Otero, J. T., Flanagan, N. S., Herren E. A., Ackerman, J. D., Bayman P. Widespread mycorrhizal specificity correlates do mycorrhizal function in the neotropical epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, New York v. 94 No. 12, 2007.

Pabst, G. F. J.; Dungs, F. **Orchidaceae Brasilienses I**. Hildesheim: Kurt Schmiersow, 1975.

Pabst, G. F. J.; Dungs, F. **Orchidaceae Brasilienses II**. Hildesheim: Kurt Schmiersow, 1977.

Park, S.; Murthy, H. N.; Paek, K. **Rapid propagation of Phalaenopsis from floral stalk-derived leaves**. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, Wallingford, v. 36, n. 2, p. 168-172, mar-abr, 2002.

Pereira, M. C; Torres, P. D; Guimarães, R. A. F; Pereira, L. O; 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**. 2011

Pereira, U. Z.; Ribeiro, L. F. Caracterização de comunidades de Orchidaceae em fragmentos de Floresta Ombrófila Densa Montana, em diferentes estágios de regeneração em Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**. Santa Teresa, v. 2, n. 2, p. 52-60, 2004. Disponível em: <<http://www.naturezaonline.com.br>> . Acesso em: 20 out. 2009.

Pereira, M. C. Diversidade e especificidade de fungos micorrízicos de orquídeas associados a *Epidendrum secundum* em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-MG. 2006. 72p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa, 2006.

Pereira, O. L.; Kasuya, M. C. M.; Rollenberg, C. L.; Chaer, G. M. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizotonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. Viçosa, v. 29, n. 2, p. 191-197, 2005.

Pereira, O. J. & Assis, A. M. Florística da restinga de Camburí, Vitória, ES. **Acta Botânica Brasílica**. 14(1): 99-111. 2000.

Peterson, R. L.; Uetake, Y.; Zelmer, C. **Fungal symbioses with orchid protocorms**. Symbiosis, Revohot, v.25; p.29-55, 1998.

Peterson, R. L.; Massicote, H. B.; Melville, L. H. **Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology**. Ottawa: NRC Research Press, p 123-129. 2004.

Petrini, O; Sieber, T. N; Toti, L; Viret, O. Metabolite production and substrat utilization in endophytic. **Natural Toxins**, New York. V. 1.n. p. 185 – 196, 1992.

Rasmussen, H. N. **Recent developments in the study of orchid mycorrhiza**. **Plant and Soil**. Holanda, v. 244, n. 1-2, p. 149-163, 2002.

Rasmussen, H. N. **Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant**. Cambridge, Cambridge University Press, 2005.

Rasmussen, H. N.; Rasmussen, F. N. **Trophic relationships in orchid mycorrhiza – diversity and implications for conservation**. Lankesteriana, Costa Rica, v. 7, n. 1-2, p. 334-341, 2007.

Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 477-478.

Rizzini, C. T. 1997. Tratado **de fitogeografia do Brasil**. Âmbito Cultural Edições Ltda.

Ruschi, A. 1986. **Orquídeas do estado do Espírito Santo**. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura. 278p.

Saddi, E.M., Lopes, R.L. & Andreato, R.H.P. in press. **Floristics and conservation of Orchidaceae Rio das Pedras Reserve**. Selbyana.

Sylvia, D.M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P.G.; Zuberer, D.A. (1999) **Principles and applications of the soil microbiology**. New Jersey: Prentice Hall. 551p.

Selosse, M. A.; RICHARD, F.; SIMARD, S. W. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge.v.21 ,n.11,p. 621-628, 2006.

Souza, A. L; Souza, A. D. L; Astolfifilho, S; Pinheiro, M. L. B; Sarqui, M. I. M; Pereira, J. O. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich and *Strychnos cogens* bentham. **Scientific Electronic Library Online**, São Paulo, v. 34, n. 2, p.185-195, 2004.

Smith S. E.; Read, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. Cambridge: Academic Press, 1997. p. 350-357.

Sneh, B.; Burpee, L.; Ogoshi, A. (Ed.) **Identification of Rhizoctonia species**. Saint Paul: APS Press, 1991.

Strobel, Gary; Daisy, Bryn. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Montana, v. 67, n. 4, p.491-502, dez. 2003.

Strobel, Gary. **Harnessing endophytes for industrial microbiology**. Current Opinions in Microbiology, Californy, v. 9, n. , p. 240-244. 2006.

Tabarelli, M. Pinto, L. P., Silva, J. M. C., Hirota, M. & Bedê, L. 2005. **Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira**. Megadiversidade. v. 1, p. 132-138. 2005.

Trappe, J. M. Phylogenetic and Ecologic aspects of in the Angiosperms from na evolutionary standpoint. In: Safir, G.R. (ed). **Ecophysiology of VA Mycorrhizal plants**. Boca Raton, 1987. p. 5-25.

Trudell, S. A.; Rygiewicz, P. T.; Edmonds, R. L. Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. **New Phytologist**. Oxford, v. 160, n. 2, p. 391-401, nov. 2003.

Valadares, R. B. S.; Pereira, M. C.; Kasuya, M. C. M.; Cardoso, E. J. B. N. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos de *Gomezia* sp. (Orchidaceae) em uma floresta de araucária do estado de São Paulo. **Fertbio**. 2008. Disponível em: <http://www.biota.org.br/publi/banco/docs/18220_1219064892.pdf> Acesso em 29 out. 2009.

Van den Berg, C.; Azevedo, C. O. Orquídeas. In: JUNCÁ, F.; FUNCH, L. S.; ROCHA, W. Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina. Brasília: **Ministério do Meio Ambiente**, 2005. p. 195-208.

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

Yoder, J. A.; Zettler, L. W.; Stewart, S. L. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. **Plant Science**. Limerick, v. 156, n. 2, p. 145-150, 2000.

Zelmer, C. D.; Cuthbertson, L.; Currah, R. S. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. **Mycoscience**. Japão, v. 37, n. 4, p. 439-448, dez. 1996.

Zettler, L.W.; Burkhead, J.C & Marshall, J.A. **Use of mycorrhizal fungus from *Epidendrum conopseum* to germinate seed of *Encyclia tampensis* in vitro**. *Lindleyana*, v.14, p.102-105, 1999.

Zettler, L. W.; piskin, K. A.; Stewart, S. L.; Hartsock, J. J.; Bowles, M. L.; Bell, T. J. **Protocorm mycobionts of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Plantathera leucophaea* (Nutt.) Lindley and a technique to prompt leaf elongation in seedlings**. *Studies in Mycology*. Holanda, v. 53, n. 1, p. 163-171, 2005.

Zhu, G. S.; Yu, Z. N.; Gui, Y.; Liu, Z. Y. **A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi.** *Fungal Diversity*. 2008. 33(7): 123-137.