



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**PROSPECÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS E PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO EM ORQUÍDEAS**

**JOICE YURI MINAMIGUCHI**

Presidente Prudente – SP

2017

**PROSPECÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS E PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO EM ORQUÍDEAS**

**JOICE YURI MINAMIGUCHI**

Tese apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Agronomia-Área de Concentração: Produção Vegetal

Orientador: Dr. Nelson Machado Barbosa Neto

635.934  
M663p

Minamiguchi, Joice Yuri.

Prospecção de fungos micorrízicos e promoção de crescimento em orquídeas. / Joice Yuri Minamiguchi. – Presidente Prudente, 2017.

73 f.: il.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2017.

Bibliografia.

Orientador: Nelson Barbosa Machado Neto Prof. Dr.

1 Micorriza. 2 Germinação simbiótica. 3 Ambiente controlado. 4 Crescimento de plântula. 5 Metodologia de isolamento. I. Título.

**Campus I** Rua José Bongiovani, 700 · Cidade Universitária · CEP 19050 920 · Presidente Prudente SP · Tel|Fax: 18 3229 1000  
**Campus II** Rodovia Raposo Tavares, Km 572 · Bairro Limoeiro · CEP 19067 175 · Presidente Prudente SP · Tel|Fax: 18 3229 2000

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "PROSPECÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM ORQUÍDEAS"

AUTORA: JOICE YURI MINAMIGUCHI

ORIENTADOR: NELSON BARBOSA MACHADO NETO

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR em AGRONOMIA

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

**Prof. Dr. Fabio Fernando de Araújo**



UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

**Profa. Dra. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierrez**



UEM – Universidade Estadual de Maringá – Maringá(PR)

**Profa. Dra. Monica Rosa Bertão**




UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Assis(SP)

**Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto**



UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista - Presidente Prudente(SP)

**Prof. Dr. Silvério Takao Hosomi**



UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista - Presidente Prudente(SP)

Data da realização: 19 de dezembro de 2017.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todos os professores que passaram por minha vida, desde o primário até a pós graduação.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre presente em minha vida.

A mamãe Eva Pirajão Minamiguchi pelo carinho, amor e preocupação mesmo estando longe.

Ao papai Roberto Yutaka Minamiguchi pela compreensão quando mamãe viaja pra me ver.

Aos Meus irmãos Roberta Yumi Minamiguchi e Ronaldo Koiti Minamiguchi por dar suporte aos meus pais na minha ausência.

Ao Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto pela orientação, divisão de conhecimentos e compreensão.

Aos colegas de pós graduação pelo companheirismo e troca de conhecimentos.

A todos os funcionários do Bloco Q pelos "bom dia" e pela dedicação aos alunos. Em especial a técnica do laboratório de cultura de tecidos vegetais, Cristiane Aparecida Souza Caldeira, por muitas vezes não fazer apenas o papel de técnica mas de amiga.

A Edna Antonia Torquato de Agostini pela compreensão da vida acadêmica da pós graduação.

E em especial a minha sobrinha Isadora que me faz cada dia querer ser uma pessoa melhor para poder lhe dar um bom exemplo.

*"Quando não sabe doar, não está pronto pra receber"*

*Pai Joaquim de Angola*

## RESUMO

### Prospecção de fungos micorrízicos e promoção de crescimento em orquídeas

Sementes de orquídea praticamente não possuem reserva de energia e não são capazes de absorver as que possuem, necessitando de uma simbiose com fungos micorrízicos para que ocorra a germinação. Durante a fase aclorofilada do desenvolvimento do embrião, estes são dependentes da associação micorrízica, pois os fungos fornecem açúcares simples oriundos de *pelotons* digeridos pela planta. O objetivo deste trabalho foi isolar fungos micorrízicos de orquídeas cultivadas e silvestres, que pudessem promover a germinação e o desenvolvimento de plântulas de diferentes espécies. Raízes de nove espécies de orquídeas foram coletadas para o isolamento por *peloton*, quatro de ambiente natural, três oriundas de cultivo *in vitro* aclimatizadas e crescidas em um orquidário e de duas que nasceram espontaneamente no orquidário. Esta metodologia obteve o isolamento de nove fungos rizoctonióides anamorfos de duas espécies oriundas de ambiente natural, *Prescotia sp* e *Oeceoclades maculata* e de uma espécie espontânea no orquidário, *Arundina bambusifolia*. Nos vasos de três espécies *Vanda sp.*, *Cattleya tigrina* e *Cattleya walkeriana*, foram colocados pacotes de isca contendo sementes das mesmas. Esta metodologia obteve o isolamento de oito fungos rizoctonióides anamorfos de *Cattleya tigrina* e *Cattleya walkeriana*. Foram feitas as caracterizações morfológicas quantitativas e qualitativas dos 17 isolados obtidos pelas duas metodologias, e essas características foram usadas para a formação de grupos pelo método de agrupamento UPGMA. Esse método juntamente com as características morfológicas possibilitou a classificação de quatro gêneros de micorrizas, *Epulorhiza*, *Ceratorhiza*, *Moniliopsis* e *Rhizoctonia-like*. Os isolados foram separados em sete grupos diferentes, e um isolado de cada grupo foi utilizado para a germinação simbiótica de seis espécies de orquídeas, *Cattleya brevicaulis*, *Cattleya tigrina*, *Cattleya walkeriana*, *Cattleya labiata*, *Dendrobium signatum* e *Encyclia cordigera*. Posteriormente foi feita a confirmação da associação micorrízica, dos protocórmios resultantes da germinação simbiótica. Noventa dias após a semeadura, plântulas das seis espécies que germinaram foram transferidas para frascos, e 180 dias após a semeadura foram avaliadas variáveis de crescimento e de massa seca. A metodologia de isolamento por *peloton* promoveu o isolamento de micorrizas de plantas de ambiente natural e de uma espontânea em orquidário. A metodologia por isca foi capaz de promover o isolamento de micorrizas de plantas que nasceram e se desenvolveram em ambiente controlado. Dos sete inóculos, seis foram eficientes para promover a germinação de sementes das seis espécies testadas, mas somente cinco inóculos exibiram crescimento de plântulas. Um inóculo demonstrou ser não específico, apresentando melhor resultado melhorando o crescimento de plântulas em cinco das espécies avaliadas.

**Palavras-chave:** Micorriza. Germinação simbiótica. Ambiente controlado. Crescimento de plântula. Metodologia de isolamento.



## ABSTRACT

### Prospection of mycorrhizal fungi and growth promotion in orchids

Orchid seeds do not have practically reserve of energy and are not able to absorb what exists, necessitating a symbiosis with mycorrhizal fungi for germination to occur. During the achlorophyll stage of embryo development, these are the dependent on the mycorrhizal association, because fungi provide simple sugars to the plant from digested *pelotons*. The objective of this work was to isolate mycorrhizal fungi of orchid in cultivated and wild plants, that could promote the germination and development of seedlings of different species. Roots of nine species of orchids were collected for the isolation by *peloton*, four of natural environment, three from in vitro culture that developed and grew in greenhouse orchid and two who were born spontaneously in the greenhouse orchid. This methodology promoted the isolation of nine anamorphic rhizoctonioid from two species from a natural environment, *Prescotia* sp and *Oeceoclades maculata* and of a spontaneous species in greenhouse orchid, *Arundina bambusifolia*. In pots of three species of orchids, *Vanda* sp., *Cattleya tigrina* and *Cattleya walkeriana*, were placed baiting containing seeds of the same. This methodology obtained the isolation of eight anamorphic rhizoctonioid fungus from *Cattleya tigrina* and *Cattleya walkeriana*. Were made the quantitative and qualitative morphological characterizations of the 17 isolates obtained by the two methodologies, and these characteristics were used for the formation of groups by the grouping method UPGMA. This method together with the morphological characteristics made it possible to classify four genera of mycorrhiza, *Epulorhiza*, *Ceratorhiza*, *Moniliopsis* and *Rhizoctonia*-like. The isolates were separated into 7 different groups, and one isolate from each group was used for the symbiotic germination of six species of orchids, *Cattleya brevicaulis*, *Cattleya tigrina*, *Cattleya walkeriana*, *Cattleya labiata*, *Dendrobium signatum* and *Encyclia cordigera*. Posteriorly confirmation of the mycorrhizal association was made, of protocorm resulting from symbiotic germination. Ninety days after seeding, seedlings of the six species that germinated were transferred to flasks, and 180 days after seeding were evaluated growth and dry mass variables. The methodology of isolation by *peloton* promoted the isolation of mycorrhiza from plants of natural environment and from a spontaneous in greenhouse orchid, the baiting methodology was able to promote the isolation of mycorrhiza from plants that were born and developed in a controlled environment. Of the seven inoculum, six were efficient to promote the germination of the six species tested, but only five inoculum presented growth of seedlings. One inoculum is no specific, presenting better results, improving seedling growth in five of the evaluated species.

**Key words:** Mycorrhiza. Symbiotic germination. Controlled environment. Seedling growth. Isolation methodology.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- A: Segmento transversal de raiz de orquídea, B: colônia de fungo oriunda do *peloton*, C: crescimento de fungo esporulante (esquerda) e fungo não esporulante (direita) e D: colônia de fungo contaminada por bactéria.....28
- FIGURA 2- A: Voal e espuma cortados, B: sementes de orquídea espalhadas sobre a espuma, C: cola quente ao redor da espuma para o fechamento dos saquinhos, D: saquinhos colados e cortado o excesso de tecido, E e F: posicionamento das iscas nos vasos.....30
- FIGURA 3- A: Células monilioides (isolado A96), B: hifas enovelando no meio de cultura (isolado W1), C: Características da hifa (setas) usadas para a seleção dos fungos rizoctonióides anamorfos (hifa do isolado T2).....36
- FIGURA 4- A: Isolamento de sementes micorrizadas (seta) de *Cattleya walkeriana*, 70 dias após os ensaios com as iscas, B: Isolamento de sementes micorrizadas (seta) de *Cattleya tigrina*, 70 dias após os ensaios com as iscas, C: micélio crescendo (seta), após 2 dias do isolamento da semente em meio PDA (*Cattleya walkeriana*), D: micélio crescendo (seta), após 2 dias do isolamento da semente em meio PDA (*Cattleya tigrina*).....38
- FIGURA 5- Dendrograma de agrupamento baseado nas características quantitativas e qualitativas dos 17 isolados de espécies nativas e cultivadas, pelo método UPGMA.....41
- FIGURA 6- Representação dos isolados de cada grupo cultivados em meio PDA por 10 dias. A: Grupo 1 (isolado A96), B: Grupo 2 (P66), C: Grupo 3 (O30), D: Grupo 4 (O31), E: Grupo 5 (T1), F:Grupo 6 (T2) e G: Grupo 7 (W1).....43
- FIGURA 7- Grampo de conexão do isolado O30.....44
- FIGURA 8- Sementes mortas de *Cattleya walkeriana* inoculadas pelo isolado O31.....45
- FIGURA 9- Porcentagem de germinação de *Cattleya walkeriana* na presença de seis inóculos fúngicos mais o controle.....46

FIGURA 10- Porcentagem de germinação de <i>Cattleya tigrina</i> na presença de seis inóculos fúngicos mais o controle.....	47
FIGURA 11- Porcentagem de germinação de <i>Cattleya labiata</i> na presença de seis inóculos fúngicos mais o controle.....	48
FIGURA 12- Porcentagem de germinação de <i>Cattleya brevicaulis</i> na presença de seis inóculos fúngicos mais o controle.....	49
FIGURA 13- Porcentagem de germinação de <i>Encyclia cordigera</i> na presença de seis inóculos fúngicos mais o controle.....	50
FIGURA 14- Porcentagem de germinação de <i>Dendrobium signatum</i> na presença de seis inóculos fúngicos mais o controle.....	51
FIGURA 15- A: Plântula de <i>Cattleya walkeriana</i> cultivada em meio assimbiótico, B: Plântula de <i>Cattleya tigrina</i> inoculada com o isolado T2, C: Protocórmio de <i>Dendrobium signatum</i> inoculado com o isolado T1, D: Protocórmio de <i>Cattleya brevicaulis</i> inoculado com o isolado W1, E: Semente de <i>Cattleya brevicaulis</i> inoculada com o isolado O30, F: Infecção do isolado T2 na região interna basal do protocórmio de <i>Cattleya tigrina</i> , G: Protocórmio de <i>Cattleya walkeriana</i> inoculado com o isolado A96, H: Plântula de <i>Encyclia cordigera</i> inoculada com o isolado P66. A formação com cor azul de Trypan Blue confirma a infecção dos inóculos.....	52
FIGURA 16- A: Protocórmios de <i>Encyclia cordigera</i> germinadas no inóculo O30, aos 90 dias após a semeadura, B: Protocórmios e sementes de <i>Encyclia cordigera</i> germinadas no inóculo O30, aos 63 dias após a semeadura.....	53
FIGURA 17- Plântulas de <i>Cattleya brevicaulis</i> aos 180 dias após a semeadura inoculadas com o isolado A96 e controle.....	53
FIGURA 18 - Plântulas de <i>Dendrobium signatum</i> aos 180 dias após a semeadura inoculadas com o isolado T2 e no cultivo assimbiótico.....	56
FIGURA 19- Plântulas de <i>Encyclia cordigera</i> aos 180 dias após a semeadura inoculadas com os isolados T1, P66 e controle.....	56

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Porcentagem de sementes viáveis, nas amostras utilizadas nos ensaios de cultivo simbiótico.....	33
TABELA 2- Relação dos isolados obtidos pela metodologia de isolamento por <i>pelotons</i> .....	37
TABELA 3- Relação dos isolados obtidos pela metodologia de isolamento por isca.....	39
TABELA 4- Aspectos qualitativos dos 17 isolados obtidos de fungos micorrízicos após 10 dias de incubação no escuro a $28 \pm 2$ °C em meio PDA.....	39
TABELA 5- Aspectos quantitativos dos 17 isolados de fungos micorrízicos.....	40
TABELA 6- Classificação de gênero dos 17 isolados de espécies nativas e cultivadas.....	44
TABELA 7- Associação micorrízica entre as seis espécies de orquídea e os seis inóculos avaliados.....	51
TABELA 8- Avaliação de desenvolvimento de plântulas de orquídeas inoculadas com diferentes isolados, 180 dias após a semeadura.....	54

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
<b>3.1</b>	<b>Família Orchidaceae</b> .....	17
3.1.1	Gênero <i>Arundina</i> .....	18
3.1.1.1	<i>Arundina bambusifolia</i> .....	18
3.1.2	Gênero <i>Cattleya</i> .....	19
3.1.2.1	<i>Cattleya brevicaulis</i> .....	19
3.1.2.2	<i>Cattleya labiata</i> .....	19
3.1.2.3	<i>Cattleya tigrina</i> .....	20
3.1.2.4	<i>Cattleya walkeriana</i> .....	20
3.1.3	Gênero <i>Dendrobium</i> .....	20
3.1.3.1	<i>Dendrobium Signatum</i> .....	21
3.1.4	Gênero <i>Encyclia</i> .....	21
3.1.4.1	<i>Encyclia cordigera</i> .....	21
3.1.5	Gênero <i>Oeceoclades</i> .....	22
3.1.5.1	<i>Oeceoclades maculata</i> .....	22
3.1.6	Gênero <i>Prescottia</i> .....	22
<b>3.2</b>	<b>Fungos micorrízicos orquidoides</b> .....	22
<b>3.3</b>	<b>Germinação simbiótica de orquídeas e sua especificidade</b> .....	23
<b>3.4</b>	<b>Métodos de isolamento</b> .....	25
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	27
<b>4.1</b>	<b>Isolamento de fungos micorrízicos de orquídea</b> .....	27
4.1.1	Isolamento por <i>peloton</i> .....	27
4.1.1.1	Coleta.....	27
4.1.1.2	Isolamento.....	27
4.1.2.1	Isolamento dos endófitos .....	29
<b>4.2</b>	<b>Caracterização morfológica dos micélios isolados</b> .....	30
4.2.1	Caracterização qualitativa.....	31
4.2.2	Caracterização quantitativa.....	31
4.2.2.1	Condição nuclear e diâmetro da hifa vegetativa.....	31

4.2.2.2	Taxa de crescimento das colônias.....	31
4.3	<b>Diferenciação morfológica das células monilióides.....</b>	<b>32</b>
4.4	<b>Cultivo simbiótico e germinação.....</b>	<b>32</b>
4.4.1	Confirmação da associação micorrízica.....	34
4.5	<b>Crescimento das plântulas.....</b>	<b>34</b>
4.6	<b>Análise dos dados.....</b>	<b>34</b>
5	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
5.1	<b>Métodos de isolamento e identificação prévia.....</b>	<b>36</b>
5.2	<b>Caracterização morfológica, dados qualitativos, quantitativos e agrupamento dos isolados.....</b>	<b>39</b>
5.3	<b>Classificação.....</b>	<b>43</b>
5.4	<b>Germinação simbiótica e confirmação da associação micorrízica.....</b>	<b>45</b>
5.5	<b>Crescimento das plântulas.....</b>	<b>52</b>
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
6.1	<b>Metodologias de isolamento e classificação.....</b>	<b>57</b>
6.2	<b>Confirmação da associação micorrízica.....</b>	<b>59</b>
6.3	<b>Germinação assimbiótica e crescimento de plântulas.....</b>	<b>59</b>
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>63</b>
8	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>
9	<b>ANEXO.....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A família das orquídeas é a maior família em número de espécies do reino vegetal, e o Brasil possui 2.494 espécies. Algumas espécies de orquídeas possuem flores grandes e belas e por este motivo são amplamente reproduzidas e comercializadas. A coleta e destruição de seu habitat natural faz com que muitas espécies estejam em risco de extinção

Sementes de orquídeas são muito pequenas e não possuem quase nenhuma reserva de energia. Em ambiente natural a germinação somente ocorre quando associada a fungos micorrízicos orquidóides, os quais possuem especificidade para algumas espécies de orquídeas, especificidade é a gama de fungos ao qual a planta pode se associar.

Fungos que promovem a associação e germinação de sementes de orquídeas na maioria das vezes são pertencentes aos gêneros *Epulorhiza* e *Ceratorhiza*. Dificilmente o estado *in vitro* é teleomorfo, porém algumas características do estado anamorfo possibilitam a identificação, como a constrição da ramificação da hifa após o septo, presença de células monilioides e ramificação da hifa em angulo reto (90°). Aspectos morfológicos qualitativos e quantitativos de fungos micorrízicos quando cultivados *in vitro* como cor, tipo de margem, aspectos do micélio, velocidade de crescimento da hifa, diâmetro da colônia e da hifa, podem classificar os rizoctonióides anamorfos em gênero. Com o auxílio da técnica de agrupamento (UPGMA), os isolados podem ser divididos em grupos por características morfológicas em isolados homogêneos dentro de um grupo e grupos heterogêneos, verificando assim a diversidade existente dos isolados.

Algumas técnicas permitem o isolamento destes fungos em laboratório, para armazená-los com o propósito de futuras reintroduções de espécies de orquídeas. Estas micorrizas (simbiose entre planta-fungo) não somente promovem a germinação, mas proporcionam à planta benefícios nutricionais como o fornecimento de carbono, nitrogênio e fósforo, e a planta fornece carboidratos para o fungo micorrízico. Por isso é muito importante que o fungo não apenas seja capaz de promover a germinação, mas também promover o desenvolvimento até a produção das folhas fotossintéticas.

## 2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi isolar micorrizas orquidóides na região do Oeste paulista, de orquídeas nativas e de orquídeas oriundas de cultivo *in vitro* assimiótico e mantidas em casas de vegetação, as quais foram submetidas a tratos culturais. Objetivou-se também verificar se os isolados destas orquídeas foram capazes de promover a germinação de varias espécies e o crescimento de plântula.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Família Orchidaceae

A família Orchidaceae é a segunda maior família de plantas, atrás apenas de Asteraceae (margaridas e girassóis), que apresenta 736 gêneros e acima de 26.000 espécies (CHASE et al., 2015). Encontram-se no Brasil 220 gêneros de orquídeas e 2.494 espécies, das quais 64% são endêmicas, e mais de 1.500 espécies registradas encontram-se na Mata Atlântica (FLORA DO BRASIL 2020, 2017).

Orquídeas são plantas monocotiledôneas, herbáceas, não apresentam crescimento secundário de caules e raízes. O crescimento do caule pode ser monopodial ou simpodial e as raízes fasciculadas. As folhas em geral possuem nervuras paralelas e uma larga bainha e são suculentas. As flores são zigomorfas organizadas e possuem um plano trímero, na qual uma pétala mediana se difere das pétalas laterais que é denominada de labelo. O perianto petalóide contém peças livres, composto por seis elementos, três pétalas e três sépalas, as sépalas são bastante semelhantes às pétalas laterais. O ovário é ínfero contendo muitos óvulos e seu fruto é do tipo capsular. A floração pode ocorrer isolada, em cachos, racemos e raramente em espiga (SOUZA; LORENZI, 2005).

As orquídeas são consideradas perenes, pois podem viver por muitos anos, habitam diferentes meios, podendo ser terrestre, rupestres ou epífitas (FAY; CHASE, 2009). A polinização pode ser por vespas, mariposas, borboletas, moscas e alguns beija-flores, entretanto, cerca de 60% das espécies são polinizadas por abelhas (INGROUILLE, 1995).

A frutificação das orquídeas resulta em sementes muito pequenas, variando o tamanho de 0,28 a 10,09 mm, conseqüentemente o peso também é baixo, variando de 0,39 a 1,79 mg de massa (YAM; ARDITTI; CAMERON, 2009). Assim como sementes de outras plantas, as diminutas sementes de orquídeas são classificadas como “dust seeds” (sementes pó) (ERIKSSON; KAINULAINEN, 2011). Estas sementes são compostas por um embrião globular e desprovidas de endosperma ou cotilédones (ARDITTI, 1992). Lipídeos e corpos proteicos dentro do embrião formam as maiores reservas, sendo que sementes de orquídeas tendem a não acumular amido (ZENG et al., 2014). Assim os carboidratos necessários à

germinação devem ser providos por uma fonte externa e que suporte o crescimento do embrião, neste caso um simbiote (PETERSON; UETAKE; ZELMER, 1998; RASMUSSEN, 2002).

As espécies de orquídeas que apresentam flores grandes e belas, são amplamente cultivadas e comercializadas. Porém, sua beleza faz com que a coleta em ambiente natural as coloquem em risco de extinção várias espécies, como também a destruição de habitats e polinizadores (SWARTS; DIXON, 2009; YAM; ARDITTI; CAMERON, 2009; MARTINELLI; MORAES, 2013).

Estratégias de conservação *ex situ*, como o armazenamento de sementes, são iniciativas importantes para a conservação das espécies orquídeas, especialmente as ameaçadas, seja por coleta excessiva ou por perda de habitat onde se localizam os fungos micorrízicos (KOOPOWITZ, 2001; MACHADO-NETO; CUSTÓDIO, 2005a; SEATON; PRITCHARD, 2008; LI; PRITCHARD, 2009; SEATON et al., 2010), algumas espécies necessitam de fungos específicos para germinarem e se desenvolverem (BERTOLINI; DAMON; VELÁSQUEZ, 2011; RASMUSSEN, 2011).

Neste estudo serão abordadas espécies de orquídeas dos gêneros *Arundina*, *Cattleya*, *Dendrobium*, *Encyclia*, *Oeceoclades* e *Prescottia*, abaixo descritas.

### 3.1.1 Gênero *Arundina*

O gênero *Arundina* possui 29 espécies (GOVAERTS et al., 2017), em sua maioria são terrícolas (SINGH; DUGGAL, 2009). A espécie mais usada para ornamentação, principalmente em jardinagem, é a orquídea bambu (KLEIN et al., 2008).

#### 3.1.1.1 *Arundina bambusifolia*

Esta espécie é uma orquídea terrícola originária do Sudeste da Ásia, Sul da China e Himalaia, Malásia, Japão, Sri Lanka e ilhas do pacífico. Tem o hábito terrícola e em alguns países, os bulbos são usado na medicina, como bactericidas (SINGH; DUGGAL, 2009).

*Arundina bambusifolia* adaptou-se bem ao clima tropical brasileiro e, apresenta floração praticamente o ano todo (uma exceção na família Ochidaceae), tornando-se muito popular no paisagismo (KLEIN et al., 2008).

### 3.1.2 Gênero *Cattleya*

Orquídeas do gênero *Cattleya* são originárias da América Tropical e Subtropical, abrangendo do México ao Brasil (RAPOSO, 1993). Essas orquídeas são, na maioria das vezes, epífitas e em algumas raras ocasiões rupícolas. Todas as orquídeas deste gênero possuem o crescimento simpodial, crescendo rente ao substrato ou ao tronco. O pseudobulbo é um órgão de reserva e podem ser unifolioladas ou bifolioladas (TAKANE; YANAGISAWA; PIVETTA, 2010).

As espécies de *Cattleya* possuem flores belas e, por este motivo são cultivadas no mundo inteiro, dando a este gênero uma grande importância econômica (BECHTEL; CRIBB; LAUNERT, 1992). Este gênero possui 102 espécies distribuídas no Brasil, 95 sendo endêmicas (FLORA DO BRASIL 2020, 2017).

#### 3.1.2.1 *Cattleya brevicaulis*

*Cattleya brevicaulis* é uma orquídea epífita, endêmica, nativa do Brasil, com pseudobulbos clavados de 15-25 cm de altura e folhas estreitas. É possível que se encontre extinta no ambiente devido a destruição de habitats. A localização exata da espécie não é conhecida e as plantas foram descritas de material cultivado (Flora do Brasil 2020, 2017).

#### 3.1.2.2 *Cattleya labiata*

*Cattleya labiata* ocorre em altitudes entre 500 e 1.000 metros, predominantemente epífitas e podem ser encontradas na Caatinga e na Mata Atlântica, nos estados do Alagoas, Ceará, Paraíba e Pernambuco (MARTINELLI; MORAES, 2013).

Alguns orquidófilos denominam *Cattleya labiata* de "Rainha do Nordeste", devido a grande importância e participação na floricultura, ela já está introduzida a quase 200 anos e possui cerca de 12.000 híbridos (REIS et al., 2001).

Por este motivo esta espécie é amplamente visada pelos comerciantes e colecionadores e, juntamente com a destruição do habitat natural coloca esta espécie como vulnerável no Livro Vermelho da Flora do Brasil (MARTINELLI; MORAES, 2013).

#### 3.1.2.3 *Cattleya tigrina*

*Cattleya tigrina* é uma espécie epífita ou rupícola, ocorre na Mata Atlântica em locais úmidos e nas proximidades do litoral, nos Estados da Bahia, Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul (FLORA DO BRASIL 2020, 2017). Esta espécie possui grande valor ornamental, sendo visada por orquidófilos e colecionadores. Por ocorrer próximas ao litoral, em época de temporada turística se torna alvo de mateiros, sendo classificada como vulnerável no Livro Vermelho da Flora do Brasil (MARTINELLI; MORAES, 2013).

#### 3.1.2.4 *Cattleya walkeriana*

*Cattleya walkeriana* tem o hábito epífita ou rupícola, e ocorre em diferentes tipos de ambientes, assim como Floresta Rupícola, Estacional Semi decidual e Cerrado (MARTINELLI; MORAES, 2013). *Cattleya walkeriana* destaca-se pela beleza de suas flores, tamanho reduzido de seus órgãos vegetativos e possui um alto valor econômico, despertando assim o interesse de colecionadores (SILVA; MILANEZE-GUTIERRE, 2004).

Por sofrer muita exploração, muitas subpopulações já foram praticamente dizimadas em seu habitat natural, o mesmo habitat que sofre com o avanço do homem. Portanto, a espécie é considerada vulnerável no Livro Vermelho da Flora do Brasil, já que, nos últimos 10 anos sua população possuiu uma redução de cerca de 30% (MARTINELLI; MORAES, 2013).

#### 3.1.3 Gênero *Dendrobium*

O gênero *Dendrobium* possui cerca de 1.600 espécies, originária de toda Ásia oriental, Austrália e Nova Zelândia (SUÁREZ-GUERRA, TÉLLEZ-

BELTRÁN, 2015), são plantas que necessitam de uma temperatura entre 15 a 25 °C (LORENZI; SOUZA, 2008).

As espécies de *Dendrobium* podem ser encontradas como epífitas e terrícolas, possuem elevada importância comercial como ornamental e farmacêutica, assim, suas plantas estão sujeitas a exploração excessiva (XUE et al., 2010).

O pseudobulbo, a inflorescência, a cor e o tamanho das flores são bastante variáveis nas espécies deste gênero (LORENZI; SOUZA, 2008). Entretanto, por ter uma grande diversidade de espécies são adaptáveis a todos tipos de climas, assim, este é um dos gêneros mais comercializados tanto no Brasil quanto no exterior (FARIA; ASSIS; CARVALHO, 2010).

#### 3.1.3.1 *Dendrobium signatum*

As plantas desta espécie são encontradas em Burma, Tailândia, Laos e Vietnã em altitudes que vão de 200 a 1200 metros. Florescem do inverno ao verão com flores perfumadas de até 7,6 cm. Crescem em uma variada gama de ambientes à meia sombra (LAVARACK; HARRISW; STOCKER, 2000).

#### 3.1.4 Gênero *Encyclia*

O gênero *Encyclia* possui cerca de 150 espécies neotropicais (LEOPARDI-VERDE; CARNEVALI; ROMERO-GONZÁLEZ, 2017) que podem ser encontradas da Flórida ao Norte da Argentina e nas Índias Ocidentais (WITHNER et al., 2000; VAN DEN BERG; CARNEVALI, 2005). O Brasil possui 44 espécies deste gênero, quais 31 são endêmicas (FLORA DO BRASIL 2020, 2017).

Espécies deste gênero podem ser encontradas como epífita, rupícola ou terrícola. No Brasil pode ser encontrada nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul, habitando na Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Mata Amazônica (FLORA DO BRASIL 2020, 2017).

##### 3.1.4.1 *Encyclia cordigera*

*Encyclia cordigera* tem o habito epífita ou rupícola, e pode ser encontrada em diferentes países como México, Guatemala, Honduras, El Salvador,

Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia e Venezuela. Pode habitar em diferentes altitudes, variando de 100 a 350 metros (FOLDATS, 1969 apud RAMÍREZ; NIÑO; BERRÍO, 2017, p. 59) . A cor das flores desta espécie pode variar de sépalas e pétalas chocolate até café, labelo branco ou cor de rosa. Em alguns países esta espécie é considerada como vulnerável, devido ao extrativismo e destruição de seu habitat (PÉREZ, 2013 apud RAMÍREZ; NIÑO; BERRÍO, 2017, p. 59).

### 3.1.5 Gênero *Oeceoclades*

Este gênero possui cerca de 41 espécies terrícolas, as quais são originárias das regiões tropicais da África (GOVAERTS et al., 2017).

#### 3.1.5.1 *Oeceoclades maculata*

*Oeceoclades maculata* é a única espécie deste gênero que ocorre no Brasil, possui hábito terrícola e pode ser encontrada em todas regiões, habitando na Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Mata Amazônica (FLORA DO BRASIL 2020, 2017). É uma espécie ciófila, de porte herbáceo, com folhas coriáceas de cor verde clara maculada de verde escuro, possuindo inflorescência em racemo com cerca de 5 a 8 flores de cor creme esverdeado, com labelo branco e rosa (PABST; DUNGS, 1977).

### 3.1.6 Gênero *Prescottia*

*Prescottia* não ocorre apenas no Brasil entretanto, das 18 espécies aceitas (GOVAERTS et al., 2017), 13 podem ser encontradas no Brasil (FLORA DO BRASIL 2020, 2017), com hábito epífita, rupícola e terrícola. Tais espécies podem ser encontradas nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, habitando na Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Mata Amazônica (FLORA DO BRASIL 2020, 2017).

### 3.2 Fungos micorrízicos orquidóides

Micorrizas orquidóides são associações que naturalmente ocorrem somente nas Orchidaceae representados por espécies do gênero *Rhizoctonia*, anamorfo de vários gêneros e telemorfos de Basidiomycota, nos quais, destacam-se *Ceratobasidium* e *Thanatephorus* (Ceratobasidiaceae), *Tulasnella* (Tulasnellaceae) e *Sebacina* (Sebacinaceae) (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Segundo Boldrini et al. (2010) a maioria dos estudos sobre micorrizas orquidóides no Brasil tem se concentrado em espécies epífitas, principalmente da subtribo Oncidiinae e do gênero *Epidendrum* e grande parte dos isolados tem sido identificados como *Ceratorhiza* (Ceratobasidiaceae) e *Epulorhiza* (Tulasnellaceae).

Fungos rizoctonioides apresentam aspectos morfológicos que se caracterizam por apresentar: ciclo sexual difícil de observar, ausência de esporos assexuados, constrição da hifa na região do septo, ramificação da hifa em angulo reto após o septo, presença de células monilioides (cadeia de células entumecidas, propágulos assexuais de resistência), formação de escleródios e septo dolipórico complexo (GARCÍA; ONCO; SUSAN, 2006). Raramente apresentam fase sexual (telemorfos), tanto em campo quanto em laboratório, e então, a sistemática e taxonomia é feita com base nas fases anamorfias (assexuais) (OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002).

Com a chave dicotômica proposta por Currah e Zelmer (1992) é possível separar os gêneros de fungos micorrízicos mais comuns de orquídeas, *Epulorhiza*, *Ceratorhiza* e *Moniliopsis*, baseado na condição nuclear e em características morfológicas. Por meio de estabilidade de hifas, características culturais e células monilioides [estáveis em meio PDA (Potato: dextrose: agar) e CMA (Corn: Meal: Agar)] podem-se classificar novas espécies deste grupo (ZELMER; CURRAH, 1995). Currah, Zettler e McInnis (1997) propõem uma chave dicotômica para identificar espécies de *Epulorhiza*. Esses dois últimos autores complementam a chave de Currah e Zelmer (1992) e ajudam a classificação de fungos micorrízicos comuns em orquídea.

Características qualitativas e quantitativas destes fungos podem ser utilizadas para agrupamento, utilizando técnicas multivariadas, as quais permitem que se observe se há ou não diversidade entre os isolados (CRUZ, 2008).

### 3.3 Germinação simbiótica de orquídeas e sua especificidade

Como as sementes de orquídeas são muito pequenas e não possuem quase reserva de nutrientes (lipídeos e proteínas), a simbiose com as micorrizas é essencial para a germinação das sementes em ambiente natural. Esta associação começa na germinação e é mantida até a planta adulta (MOLVRAJ; KORES, 1995; RASMUSSEN, 2002). Após a associação, as sementes obtêm os nutrientes (açúcares simples) necessários para a germinação através da digestão dos *pelotons*, que são novos de hifas que se formam na célula do embrião (RASMUSSEN, 2002).

A infecção do fungo nas sementes ocorre com a entrada das hifas pela micrópila ou pequenas fissuras no tegumento da testa, atravessando a parede celular na região do suspensor do embrião e se estabilizando na parede cortical do protocórmio. A infecção também pode ocorrer nos rizóides ou nas células da protoderme, porém é mais incomum de acontecer (ARDITTI, 1992; RASMUSSEN, 1995; PETERSON; UETAKE; ZELMER, 1998).

Todas as orquídeas têm uma fase micoheterotrófica (protocórmio não são capazes de produzir carbono), por isso têm dificuldade de se propagar em ambiente natural. A simbiose das orquídeas com fungos micorrízicos orquidóides fornece e aumenta a absorção de nutrientes orgânicos e inorgânicos como a água afim de promover a germinação e impedir o protocórmio de sofrer dissecação, carbono, nitrogênio e fósforo (BOLDRINI et al., 2010). Na fase de planta, o fungo continua a colonizar as células do córtex da raiz (RASMUSSEN, 1995), fornecendo nitrogênio e fósforo em troca de carbono, pois a mesma ainda é dependente do fungo para o fornecimento destes compostos (CAMERON; LEAKE; READ, 2006; CAMERON et al., 2007).

Nas raízes das orquídeas a intensidade da colonização varia de acordo com a espécie. Em orquídeas terrícolas os *pelotons* podem ser encontrados em quase toda área do córtex da raiz, enquanto nas plantas epífitas a colonização do córtex encontra-se apenas nas regiões onde a raiz está em contato com o substrato. Os fungos que são compatíveis com a espécie podem colonizar a raiz entrando através dos pelos radiculares ou pelas células epidérmicas (ARDITTI, 1992; RASMUSSEN, 1995).



A especificidade micorrizica pode ser descrita como o conjunto de fungos em que uma espécie de orquídea consegue se associar (THOMPSON, 1994). A infecção inicial entre semente e fungo pode ser o evento que define a conexão entre eles (RASMUSSEN, 1995).

A associação micorrizica de orquídeas pode variar de altamente específica para ampla (não específico). Fungos não específicos são aqueles isolados de uma espécie de orquídea e que promovem a germinação de sementes de outras espécies de orquídea (OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004; RAFTER et al., 2016).

As sementes de orquídeas possuem um balanço minucioso de fitoalexinas (compostos antifúngico) que regulam a associação entre os simbioses durante a germinação e a formação dos *pelotons* (SHIMURA et al., 2007; RASMUSSEN, 1995). Quando existe incompatibilidade entre hospedeiro e micorriza a planta produz compostos que inibem o crescimento do fungo, acumulando compostos fenólicos nas células onde o fungo infectou (ARDITTI, 1992). Nas sementes, mesmo quando um fungo é capaz de infectar a semente, não são capazes de sustentar o embrião até a formação de folhas que fotossintetizam. Portanto a presença do fungo específico no ambiente onde a planta se desenvolve é essencial para seu desenvolvimento e a especificidade pode determinar as regiões de crescimento de determinadas espécies (ARDITTI, 1992; TAYLOR; BRUNS, 1999; MCKENDRICK et al., 2002).

Muitas espécies nativas de orquídeas do Brasil estão ameaçadas de extinção, porém a maior parte da reprodução é feita *in vitro* e de modo assimbiótico e este processo não garante a reintrodução com eficácia. Por este motivo é importante se conhecer quais e como se caracterizam micorrizas orquidóides brasileiras e seu potencial germinativo, para uma reintrodução de plântulas de espécies potencialmente mais eficaz de se desenvolver (PEREIRA, 2001; BOLDRINI et al., 2010).

### **3.4 Métodos de isolamento**

A maior parte dos trabalhos visam isolar endófitos das raízes, no qual necessitam que as raízes estejam livres de partículas externas contaminantes. Para a descontaminação é necessário usar um descontaminante, como peróxido de

hidrogênio, hipoclorito de sódio ou cálcio, cloreto de mercúrio ou etanol. Em laboratório se usa, na maioria das vezes, uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % com algumas gotas de detergente (Tween). As raízes são cortadas, retirado o velame, seccionadas e colocadas em meio específico para crescimento de fungos (CURRAH et al., 1997).

Outra metodologia que vem sendo utilizada refere-se ao isolamento de micorrizas por isca, na qual sementes são colocadas em "pacotinhos" e estes são colocados próximo às raízes das plantas de orquídeas *in situ*. Após alguns meses, esses inóculos são retirados e observado se houve germinação e crescimento de plântulas, as quais serão usadas para o isolamento das micorrizas. Este método foi descrito primeiramente por Rasmussen e Whigham (1993), em orquídea terrícolas.

Em plantas epífitas este método pode causar dissecação das sementes devido ao local onde se posiciona os "pacotinhos". Para contornar este problema foram adicionados substratos no local onde os "pacotinhos" são colocados (ZETTLER et al., 2011; ZI et al., 2014). Cruz-Higareda, Luna-Rosales e Barba-Alvarez (2015), adicionam a essa técnica "blocos" de espuma onde são colocadas as sementes, para uma melhor retenção de água e melhor mobilidade dos "pacotinhos", isto para o isolamento de micorrizas de orquídeas epífitas.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Isolamento de fungos micorrízicos de orquídea

#### 4.1.1 Isolamento por *peloton*

##### 4.1.1.1 Coleta

Para a metodologia de isolamento de micorriza por *peloton* foram usadas nove espécies de orquídea, sendo quatro nativas brasileiras, *Prescottia* sp., *Oeceoclodes maculata*, *Trichocentrum pumilum* e *Bletilla striata*. Estas espécies foram coletadas em março de 2016 no município de Regente Feijó SP, as margens da estrada Municipal de Regente Feijó (Latitude: 22°19'32.2"S Longitude: 51°15'38.5"W) e altitude média de 504 metros.

As demais espécies estiveram mantidas, cultivadas em um orquidário particular localizado no município de Taciba SP foram *Arundina bambusifolia* e *Epidendrum* sp., que se propagam espontaneamente, e as espécies *Vanda* sp., *Cattleya tigrina* e *Cattleya walkeriana* que são plantas oriundas de cultivo *in vitro* e mantidas sob tratos culturais por quinze anos.

##### 4.1.1.2 Isolamento

O meio de cultura utilizado para o isolamento foi o meio PDA, utilizou-se o 39 g.L<sup>-1</sup> do reagente OXOID® Potato Dextrose Agar (15 gramas de Agar, 20 gramas de Dextrose e 4 gramas de extrato de batata que equivalem a 200 gramas de batata cozida). O pH foi ajustado para 5,7 e autoclavado por 20 minutos a 121 °C e pressão, de 1,5 atm. Após autoclavagem cerca de 15 mL de meio foi disperso em placas de Petri de seis cm, sob condições de câmara de fluxo laminar, sendo então as placas seladas com filme plástico.

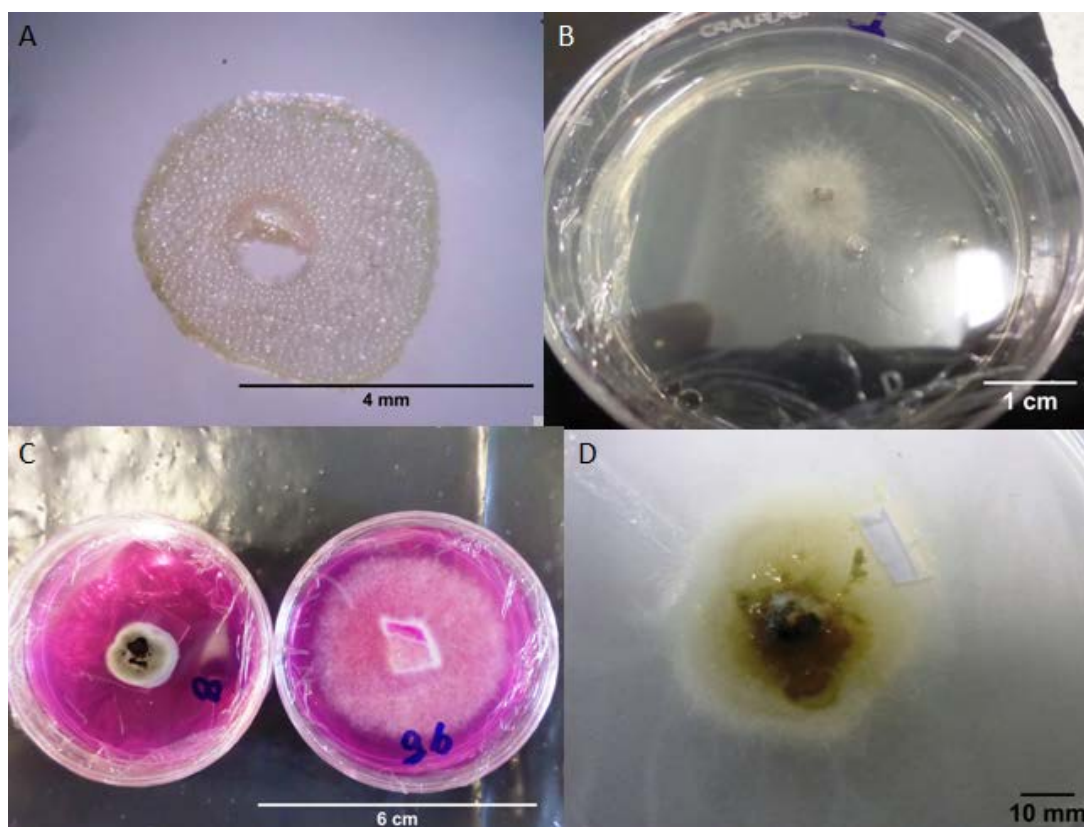
Foram retiradas duas raízes vigorosas por planta, de dois indivíduos de cada espécie e mantidas em placas de Petri com papel filtro umedecido com água destilada até chegar ao laboratório.

As raízes com aproximadamente 5 cm foram lavadas em água corrente com detergente neutro, e levadas para câmara de fluxo laminar. A desinfecção foi

realizada em hipoclorito de sódio (NaClO) comercial a 20% acrescido de  $100 \mu\text{L.L}^{-1}$  de Tween 80, por 1,5 minutos e lavadas por quatro vezes em água destilada e esterilizada. Com auxílio de bisturi e pinças, foi retirado o velame e a coifa e da parte restante foram feitos segmentos transversais com aproximadamente 2 mm cada (FIGURA 1A).

Nas placas em que houve crescimento de micélio (FIGURA 1B), foram realizados repiques para meio PDA contendo antibióticos (Estreptomicina  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ , Ampicilina  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  e Cloranfenicol  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) os quais foram adicionados após a autoclavagem com o meio ainda quente (FIGURA 1D). Posteriormente as colônias foram transferidas para meio PDA contendo  $500 \mu\text{L.L}^{-1}$  do corante Rosa Bengala, o qual inibe o crescimento de fungos esporulantes (FIGURA 1C). Colônias com características de micorrizas orquidóides foram mantidas em meio PDA no escuro a  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  conforme sugerido por Pereira (2009) e Valadares (2009).

FIGURA 1 - A: Segmento transversal de raiz de orquídea, B: colônia de fungo oriunda do *peloton*, C: crescimento de fungo esporulante (esquerda) e fungo não esporulante (direita) e D: colônia de fungo contaminada por bactéria



Fonte: Próprio autor.

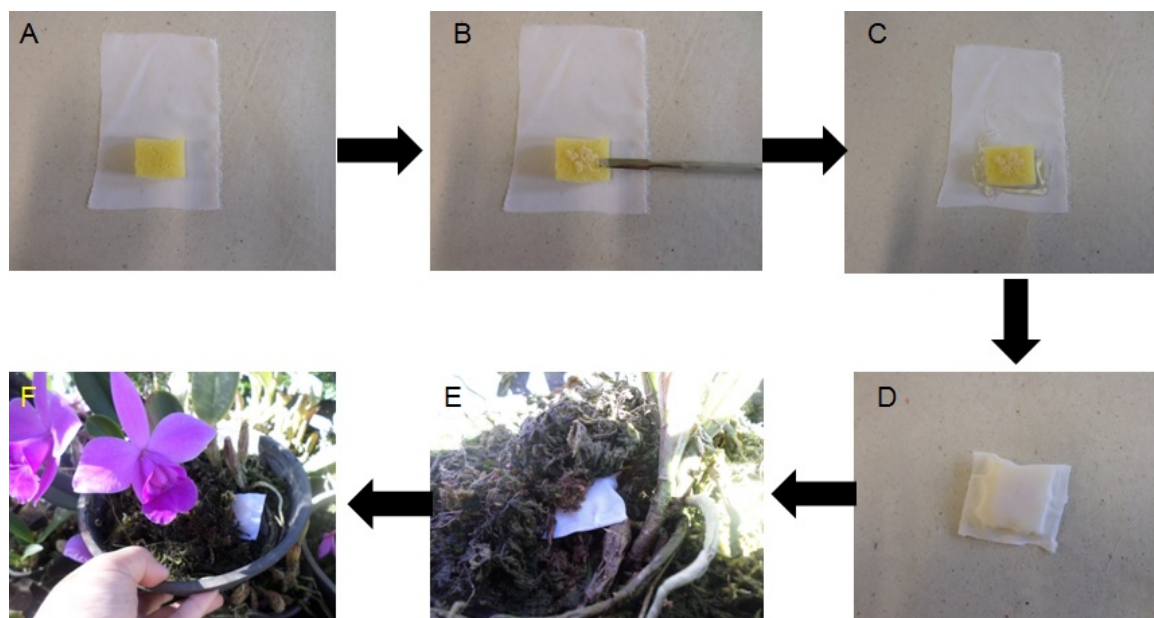
#### 4.1.2 Isolamento de micorriza por isca

As iscas foram colocadas em cinco vasos de cada espécie, sendo que as espécies foram: *Vanda* sp., *Cattleya tigrina* e *Cattleya walkeriana*. Estas três espécies são oriundas de germinação e cultivo *in vitro* e encontram-se em crescimento em casa telada em um orquidário particular, em Taciba SP, sendo submetidas a todos os tratamentos culturais como adubações minerais e aplicação de produtos de controle fitossanitário.

Para confeccionar os saquinhos com isca foi seguida a proposta adaptada de Cruz-Higareda, Luna-Rosales e Barba-Alvarez (2015). Foi utilizado um tecido sintético, o Voal e uma espuma que foi cortada em cerca de 3 cm por 3,5 cm e 1 cm de espessura (FIGURA 2A). Cerca de 10 mg de sementes foram colocadas e espalhadas sobre a espuma (FIGURA 2B). Foram utilizadas sementes de *Vanda* sp., *Cattleya tigrina* e *Cattleya walkeriana* provenientes do Banco de Sementes de Orquídeas da UNOESTE (sementes obtidas por polinização cruzada entre indivíduos diferentes). Antes de serem colocadas nos saquinhos, as mesmas foram submetidas ao teste de tetrazólio para verificar a viabilidade das sementes, segundo Hosomi et al. (2011).

Os saquinhos foram fechados com cola quente (FIGURA 2C), sendo cortado o excesso de tecido (FIGURA 2D). Em seguida as iscas foram levadas ao orquidário e colocados nos vasos (FIGURA 2E e 2F).

FIGURA 2 - A: Voal e espuma cortados, B: sementes de orquídea espalhadas sobre a espuma, C: cola quente ao redor da espuma para o fechamento dos saquinhos, D: saquinhos colados e cortado o excesso de tecido, E e F: posicionamento das iscas nos vasos



Fonte: Próprio autor.

#### 4.1.2.1 Isolamento dos endófitos

Após 70 dias do início do ensaio de isolamento de fungos micorrízicos com auxílio de isca, as iscas foram retiradas e levadas ao laboratório para observação. Com auxílio da lupa binocular e seringa de uma mL com agulha, as sementes que apresentavam germinação foram separadas. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentaram embrião entumecido.

A desinfecção foi feita em hipoclorito de sódio (NaClO) comercial a 20% adicionados de  $100 \mu\text{L.L}^{-1}$  de Tween 80 por 1,5 minutos e após lavadas duas vezes em água destilada e esterilizada. As sementes então foram transferidas para placas de Petri contendo meio PDA. Quando observado o crescimento dos micélios, foram repicados para o meio PDA com Rosa Bengala e meio PDA com antibióticos (os mesmos citados acima). Colônias com características de micorrizas orquidóides foram mantidas em meio PDA no escuro a  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  conforme sugerido por Pereira (2009) e Valadares (2009).

## 4.2 Caracterização morfológica dos micélios isolados

### 4.2.1 Caracterização qualitativa

As características dos isolados foram analisados a partir de colônias cultivadas em meio PDA por 10 dias, no escuro, a  $28 \pm 2$  °C. As colônias foram analisadas quanto a coloração (branco, amarelo ou creme), aspecto (aveludado, grumoso, aveludado-grumoso ou pulverulento), micélio aéreo (presente, abundante ou escasso), zoneamento (circular ou rendilhado) e margem (imersa ou emersa), adaptado de Cunha (2012).

### 4.2.2 Caracterização quantitativa

#### 4.2.2.1 Condição nuclear e diâmetro da hifa vegetativa

A condição nuclear (uninucleado, binucleado e multinucleado) e diâmetro da hifa vegetativa foram determinados em preparação microscópicas, adicionado 500 µL de meio PDA sobre a lâmina e em uma das extremidades colocado um disco de cinco mm de diâmetro contendo o isolado (discos de meio PDA repicado de placas contendo o micélio fúngico cultivado). A lâmina foi posicionada em placa de Petri contendo papel filtro umedecido com três mL de água destilada autoclavada e a placa selada com filme plástico.

Após três dias foram adicionado  $50 \mu\text{L.L}^{-1}$  da solução de coloração ( $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$  de SYBR GREEN® diluído 1000x em  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a  $10 \text{mM.L}^{-1}$ , 18% de glicerol e  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de Calcofluor White), sendo a mesma mantida por cinco minutos no escuro e posteriormente lavada. Para a visualização foi utilizado um microscópio ótico (Motic BA410) com câmera de vídeo digital acoplada (Moticam 480, modelo Q715CVDA-580). Para a captura das imagens com escala foi utilizado o programa Motic Images Plus 2.0. Para a mensuração do diâmetro das hifas foi usado o programa ImajeJ 1.6.0, adaptado de Valadares (2009).

#### 4.2.2.2 Taxa de crescimento das colônias

Para determinação da taxa de crescimento das colônias, foram repicados discos de 5 mm de diâmetro e colocados ao centro das placas de Petri. Foi analisado o crescimento em meio PDA e CMA. O meio CMA foi preparado com 15 g.L<sup>-1</sup> de agar, 1 L de caldo resultante do cozimento de 30 g.L<sup>-1</sup> de farelo de milho, pH 5,7 e autoclavado por 20 minutos com pressão de 1,5 atm. Aproximadamente 15 mL de meio foi disperso em placa de Petri de seis cm de diâmetro em câmara de fluxo laminar, adaptado de Nogueira et al. (2005).

A avaliação foi realizada após 72 e 120 horas de cultivo, sendo que foram mantidas no escuro a  $28 \pm 2$  °C (ZELMER; CURRAH, 1995). Para avaliação foram realizadas triplicatas, sendo traçadas duas linhas em cada placa (três placas por isolado), formando quatro campos e a partir do disco foi medido, com o auxílio de uma régua, o crescimento do micélio da colônia (VALADARES, 2009).

#### 4.3 Diferenciação morfológica das células monilióides

Com o auxílio de lâmina de barbear foram realizados cortes finos do meio (horizontal), os quais foram colocados em lâminas e coradas com o azul de algodão. Entretanto devido à ausência de um microscópio invertido, a visualização de células monilióides no meio onde o micélio formou uma "camada mais espessa" não foi possível. Somente nos meios CMA e agar-aveia foi possível observar essas estruturas. Entretanto, alguns isolados não formam células monilióides em meio CMA e agar-aveia. Então a classificação foi realizada pela diferenciação morfológica das células, adaptado de Nogueira et al. (2005).

Para a visualização das células foi utilizado um microscópio ótico (Motic BA410) com câmera de vídeo digital acoplada (Moticam 480, modelo Q715CVDA-580) e para a captura das imagens escaladas foi utilizado o programa Motic Images Plus 2.0.

#### 4.4 Cultivo simbiótico e germinação

Foram utilizadas seis espécies de orquídeas para o cultivo simbiótico: *Cattleya brevicaulis*, *Cattleya labiata*, *Cattleya tigrina*, *Cattleya walkeriana*, *Encyclia*



*cordigera* e *Dendrobium signatum*. Todas as sementes foram provenientes do Banco de Sementes de Orquídea da UNOESTE (sementes obtidas por polinização cruzada entre indivíduos diferentes). As sementes de *Cattleya walkeriana* estavam armazenadas a sete anos e as demais por três meses.

Foi verificada a viabilidade das sementes (TABELA 1) com o teste de tetrazólio, segundo Hosomi et al. (2011).

TABELA 1- Porcentagem de sementes viáveis, nas amostras utilizadas nos ensaios de cultivo simbiótico

<b>Espécie</b>	<b>Sementes viáveis</b>
<i>Cattleya walkeriana</i>	80%
<i>Cattleya tigrina</i>	65%
<i>Cattleya brevicaulis</i>	50%
<i>Cattleya labiata</i>	90%
<i>Encyclia cordigera</i>	95%
<i>Dendrobium signatum</i>	90%

Fonte: Próprio autor

As espécies foram então semeadas na presença de seis isolados sendo eles: P66, A96, O30, T1, T2 e W1 e no controle (germinação assimbiótica) o qual foi conduzido em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) à meia concentração dos sais, acrescido de 10 g.L<sup>-1</sup> de agar, pH ajustado para 5,7 e autoclavado por 20 minutos com pressão de 1,5 atm, cerca de 15 mL de meio foi disperso em placa de Petri de 6 cm de diâmetro sob condições de câmara de fluxo laminar.

Para o cultivo dos isolados, foi utilizado o meio agar-aveia (DIXON, 1987), acrescido de 2 g.L<sup>-1</sup> de aveia em flocos comercial e 10 g.L<sup>-1</sup> de agar, pH ajustado para 5,7 e autoclavado por 20 minutos com pressão de 1,5 atm, cerca de 15 mL de meio foi disperso em placa de Petri de 6 cm de diâmetro sob condições de câmara de fluxo laminar. Foram colocado discos de 5 mm contendo os isolados no meio e, após 25 dias, foram semeadas as espécies.

Para a desinfecção foram separadas cerca de 10 mg de sementes. Na câmara de fluxo laminar foi feita a desinfecção com dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) 5 g.L<sup>-1</sup> acrescido de 100 µL.L<sup>-1</sup> de Tween 80. Posteriormente as sementes foram lavados por duas vezes com água destilada autoclavada. A semeadura foi realizada de acordo com Machado Neto e Custódio (2005b) e as placas foram seladas com filme plástico. Foram selecionados três campos de aproximadamente

de 8 mm de diâmetro por placa de Petri, e então contadas as sementes germinadas e não germinadas e, realizado a média de cada placa. Semanalmente os mesmos campos foram analisadas quanto a porcentagem de germinação durante o período de 9 semanas. Foram consideradas germinadas as sementes que romperam a testa conforme proposto por Seaton e Hailes (1989).

#### 4.4.1 Confirmação da associação micorrízica

Após 60 dias de cultivo simbiótico das sementes, protocórmios e plântulas foram retirados e colocados em microtubos e expostos a 1,5 mL da solução de fixação FAA (3 mL de formol, 5 mL de ácido acético glacial e 200 mL de etanol a 50%), e mantidos no dessecador de vidro ligado na bomba a vácuo (Tecnal TE-058) por 24 horas. Após este período os protocórmios foram mantidos em álcool 70%. Esta etapa possibilitou a descoloração total dos protocórmios, não necessitando realizar o processo de descoloração com NaOH a 90 °C por duas horas como relatam os autores Phillips e Hayman, (1970). Para a coloração da infecção dos micélios fúngicos nos protocórmios e plântulas foi usado o corante Trypan blue na concentração de 0,05%, mantidos em banho-maria a 90 °C por uma hora e a seguir foram observados e fotografados com auxílio de uma câmera digital (SANSUNG ST2014F) acoplada manualmente na lupa binocular (adaptado de PHILLIPS; HAYMAN, 1970).

#### 4.5 Crescimento das plântulas

Ao final de 90 dias do cultivo simbiótico das sementes, na câmara de fluxo laminar, cinco protocórmios de cada placa foram transferidos para frascos contendo 50 mL do meio agar-aveia, (o controle foi conduzido no mesmo meio utilizado para a germinação). Os frascos foram selados com filme plástico e colocados na câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas a  $25 \pm 3$  °C.

Após mis 90 dias (180 dias após a sementeira) as plântulas foram medidas quanto ao comprimento da parte aérea e comprimento da maior raiz, e a seguir levadas à estufa de secagem a 65°C por 48 horas, e determinada a massa seca da parte aérea, da raiz e massa seca total.

#### **4.6 Análise dos dados**

Os dados obtidos a partir das análises quantitativas dos fungos micorrízicos e de crescimento de plântulas foram submetidos ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. O teste estatístico para a análise da germinação foi o teste de Tukey com 5% de probabilidade (DMS), e os dados expressos em média com o erro padrão. Para as análises de variância foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

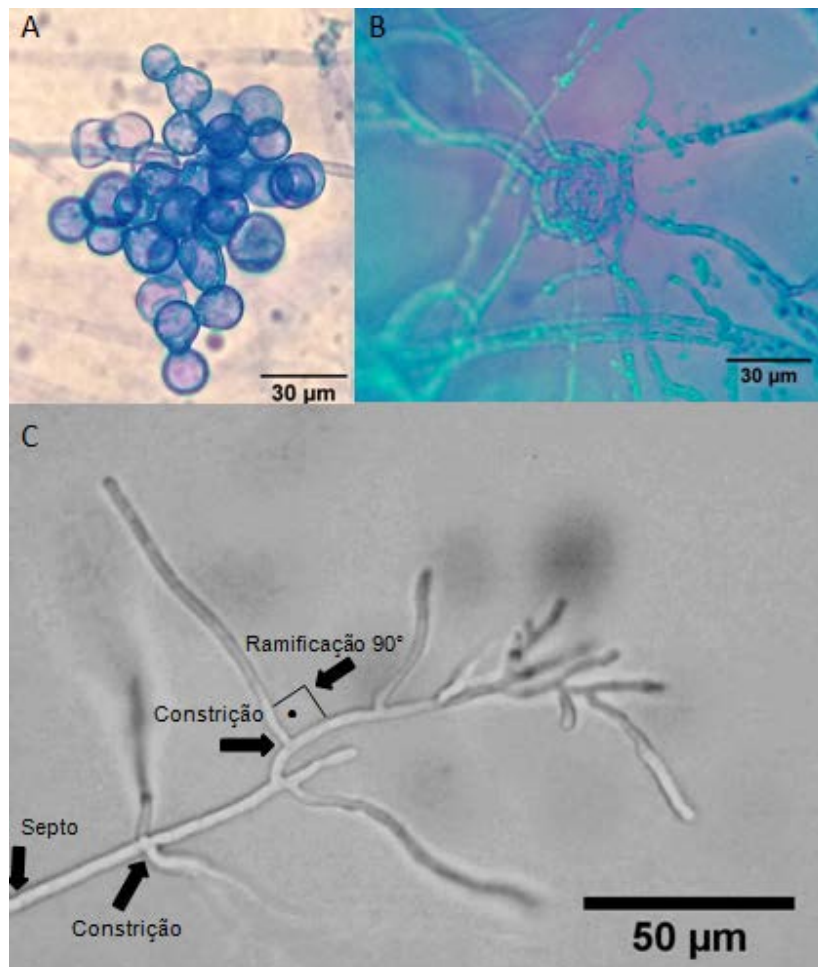
Para a análise de agrupamento foi utilizado o método UPGMA, com a base na distância genética de Mahalanobis e o algoritmo de Near Neighbour Joining. Para esta análise foi usado o programa PC-ORD 4.0. O delineamento experimental foi conduzido inteiramente ao acaso.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Métodos de isolamento e identificação prévia

A análise das características dos fungos rizoctonióides foram observadas (FIGURAS 3 A, B e C), evidenciou que dos 98 isolados obtidos pelo método de isolamento por *pelotons*, sendo nove classificados como rizoctonióides anamorfos. Estes foram isolados das plantas terrícolas *Arundina bambusifolia* (planta espontânea dentro do orquidário), *Prescottia* sp. e *Oeceoclodes maculata* (coletadas em ambiente natural). Das plantas terrícolas apenas a *Bletilla striata* não foi possível o isolamento de simbiosites.

FIGURA 3 - A: Células monilioides (isolado A96), B: hifas enovelando no meio de cultura (isolado W1), C: Características da hifa (setas) usadas para a seleção dos fungos rizoctonióides anamorfos (hifa do isolado T2)



Fonte: Próprio autor

Não foi possível observar morfotipos anamorfos através do método de isolamento por *peloton* nas plantas epífitas do orquidário proveniente de cultivo *in vitro* (*Cattleya walkeriana*, *Cattleya tigrina* e *Vanda* sp.), na planta espontânea no orquidário (*Epidendrum* sp.), bem como em *Trichocentrum pumilum* que foi coletada em ambiente natural (TABELA 2).

TABELA 2 - Relação dos isolados obtidos pela metodologia de isolamento por *pelotons*

<b>Espécie</b>	<b>Total de isolados</b>	<b>Rizoctonióides anamorfos</b>	<b>Código do isolado</b>
<i>Prescotia</i> sp.	14	6	P55, P56, P57 P63, P66, P65
<i>Oeceoclodes maculata</i>	16	2	O30, O31
<i>Arundina bambusifolia</i>	11	1	A96
<i>Trichocentrum pumilum</i>	20	0	x
<i>Bletilla striata</i>	17	0	x
<i>Epidendrum</i>	7	0	x
<i>Vanda</i> sp.	4	0	x
<i>Cattleya tigrina</i>	4	0	x
<i>Cattleya walkeriana</i>	5	0	x
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>9</b>	

Fonte: Próprio autor

Os parâmetros usados para classificação de fungos rizoctonióides pela metodologia por isca (FIGURAS 3 A B e C), foram os mesmos usados pela metodologia anterior. Aos setenta dias os pacotinhos com isca apresentaram sementes micorrizadas com coloração verde e massa expandida (FIGURAS 4 A e B), as quais foram eficazes no isolamento de fungos rizoctonióides (FIGURAS 4 C e D).

FIGURA 4 - A: Isolamento de sementes micorrizadas (seta) de *Cattleya walkeriana*, 70 dias após os ensaios com as iscas, B: Isolamento de sementes micorrizadas (seta) de *Cattleya tigrina*, 70 dias após os ensaios com as iscas, C: micélio crescendo (seta), após 2 dias do isolamento da semente em meio PDA (*Cattleya walkeriana*), D: micélio crescendo (seta), após 2 dias do isolamento da semente em meio PDA (*Cattleya tigrina*)



Fonte: Próprio autor.

A metodologia de isca se mostrou eficaz para o isolamento de morfotipos anamorfos para plantas oriundas de cultivo *in vitro* e cultivadas em orquidário (*Cattleya walkeriana*, *Cattleya tigrina* e *Vanda* sp.) totalizando oito isolados (TABELA 3).

TABELA 3 - Relação dos isolados obtidos pela metodologia de isolamento por isca

Espécie	Total de isolados	Rizoctonióides anamorfos	Código do isolado
<i>Vanda</i> sp.	3	0	x
<i>Cattleya tigrina</i>	8	3	T1, T2, T3
<i>Cattleya walkeriana</i>	10	5	W1, W2, W3, W4, W5
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>8</b>	

Fonte: Próprio autor

Apenas 9,18% dos isolados pela metodologia por *peloton* foram classificados como morfotipos anamorfos em comparação aos 38,09% do isolamento por isca. Não foram obtidos isolados de *Vanda* sp.

## 5.2 Caracterização morfológica, dados qualitativos, quantitativos e agrupamento dos isolados

Após 10 dias de incubação dos isolados em meio PDA a  $28 \pm 2$  °C no escuro, os isolados foram classificados de acordo com os aspectos qualitativos (TABELA 4).

TABELA 4 - Aspectos qualitativos dos 17 isolados obtidos de fungos micorrízicos após 10 dias de incubação no escuro a  $28 \pm 2$  °C em meio PDA

Código do isolado	Cor	Aspecto	Micélio Aéreo	Zoneamento	Margem
<b>P55</b>	Creme	Aveludado	Presente	Circular	Emersa
<b>P56</b>	Creme	Aveludado	Presente	Circular	Emersa
<b>P57</b>	Creme	Aveludado	Presente	Circular	Emersa
<b>P63</b>	Creme	Aveludado	Presente	Circular	Emersa
<b>P65</b>	Creme	Aveludado	Presente	Circular	Emersa
<b>P66</b>	Creme	Aveludado	Presente	Circular	Emersa
<b>A96</b>	Branco	Aveludado	Abundante	Circular	Emersa
<b>T1</b>	Creme	Avel/Grumoso	Escasso	Circular	Imersa
<b>T2</b>	Creme	Avel/Grumoso	Escasso	Rendilhado	Imersa
<b>T3</b>	Creme	Avel/Grumoso	Escasso	Rendilhado	Imersa
<b>W1</b>	Branco	Aveludado	Presente	Circular	Imersa
<b>W2</b>	Branco	Aveludado	Presente	Circular	Imersa
<b>W3</b>	Branco	Aveludado	Presente	Circular	Imersa
<b>W4</b>	Branco	Aveludado	Presente	Circular	Imersa
<b>W5</b>	Branco	Aveludado	Presente	Circular	Imersa
<b>O30</b>	Creme	Aveludado	Abundante	Circular	Emersa
<b>O31</b>	Amarelo	Pulverulento	Abundante	Circular	Emersa

Fonte: Próprio autor

Dados quantitativos diferiram significativamente quanto ao diâmetro da hifa vegetativa, diâmetro da colônia em meio PDA e CMA e velocidade de crescimento da hifa em meio PDA e CMA (TABELA 5). Sendo identificada pela chave de identificação proposta por Currah et al. (1997).

TABELA 5 - Aspectos quantitativos dos 17 isolados de fungos micorrízicos

Código do isolado	Condição Nuclear	Diâmetro da Hifa PDA* ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro da Colônia		Crescimento da Hifa	
			PDA* (mm)	CMA* (mm)	PDA* ( $\text{mm.h}^{-1}$ )	CMA* ( $\text{mm.h}^{-1}$ )
P55	Uninucleada	4,36b	11,00d	35,76c	0,073c	0,245b
P56	Uninucleada	4,20b	13,10c	33,73e	0,087c	0,234c
P57	Uninucleada	4,36b	09,43e	36,40b	0,065c	0,252a
P63	Uninucleada	4,63b	10,60d	33,26e	0,073c	0,234c
P65	Uninucleada	4,34b	13,00c	37,66a	0,085c	0,261a
P66	Uninucleada	4,36b	12,73c	32,66e	0,080c	0,224d
A96	Binucleada	5,92a	17,00b	34,66d	0,118b	0,241b
T1	Uninucleada	4,16b	05,16f	06,50h	0,032d	0,045g
T2	Uninucleada	3,58c	04,16f	02,00j	0,029d	0,013h
T3	Uninucleada	3,42c	04,60f	02,16j	0,032d	0,016h
W1	Uninucleada	4,55b	02,43g	02,16j	0,016d	0,015h
W2	Uninucleada	4,03b	02,33g	02,16j	0,016d	0,015h
W3	Uninucleada	4,17b	02,83g	02,33j	0,020d	0,016h
W4	Uninucleada	4,12b	02,66g	02,16j	0,019d	0,015h
W5	Uninucleada	4,52b	02,43g	03,40i	0,016d	0,023h
O30	Binucleada	2,98c	12,00c	29,33f	0,134b	0,203e
O31	Multinucleada	3,92b	48,33a	19,16g	0,331a	0,127f

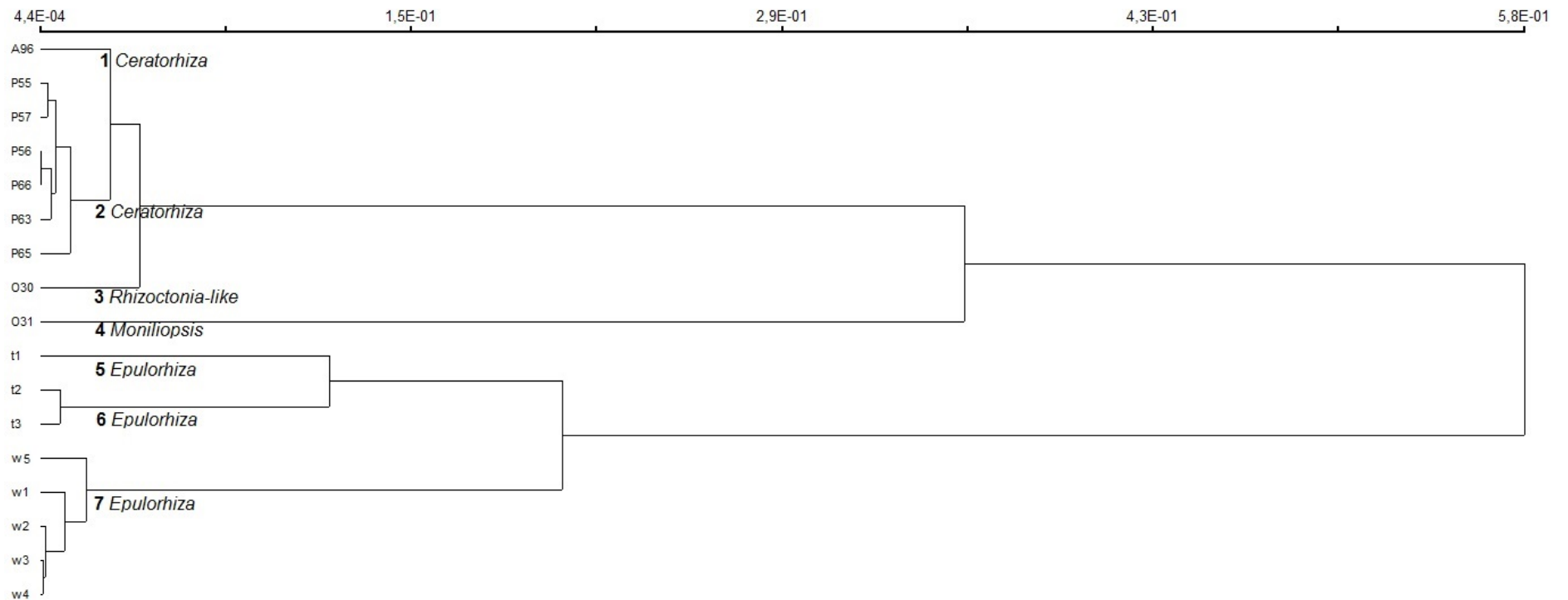
Fonte: Próprio autor

Nota: \*Meios de cultura PDA (Potato Dextrose Agar) e CMA (Corn Meal Agar). Letras distintas na vertical diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Dados qualitativos e quantitativos foram usados para formar um dendrograma no qual observou-se a formação de sete grupos (FIGURA 5).



FIGURA 5 - Dendrograma de agrupamento baseado nas características quantitativas e qualitativas dos 17 isolados de espécies nativas e cultivadas, pelo método UPGMA



Fonte: Dendrograma gerado pelo programa PC-ORD 4.0, adaptada pelo autor.

No primeiro grupo encontra-se o isolado A96, de crescimento rápido (diâmetro da colônia e crescimento da hifa  $\text{mm.h}^{-1}$ ), binucleado, cor branca, hifas de diâmetro grande ( $> 5 \mu\text{m}$ ), margem emersa e circular.

O grupo 2 é representado pelos isolados P55, P56, P57, P63, P65 e P66. Possuem a cor creme, aspecto aveludado, micélio aéreo presente, zoneamento circular e margem emersa. O crescimento é relativamente rápido, possui um diâmetro de hifa mediano ( $> 4 \mu\text{m}$ ) entretanto é uninucleado. A condição nuclear e características do micélio aéreo é o que mais o distingue dos grupos 1, 3 e 4.

No terceiro grupo encontra-se o isolado O30, o que difere este do grupo 1 por sua cor (creme) e diâmetro da hifa menor ( $< 3 \mu\text{m}$ ). Esses dois grupos se caracterizam pelo crescimento relativamente rápido, binucleados e seu aspecto, margem e zoneamento são iguais.

No grupo 4 temos o isolado O31, com um diâmetro da hifa mediano ( $< 4 \mu\text{m}$ ), sua cor (amarelo), aspecto (pulverulento) e condição nuclear (multinucleado) se diferenciam de todos os outros grupos.

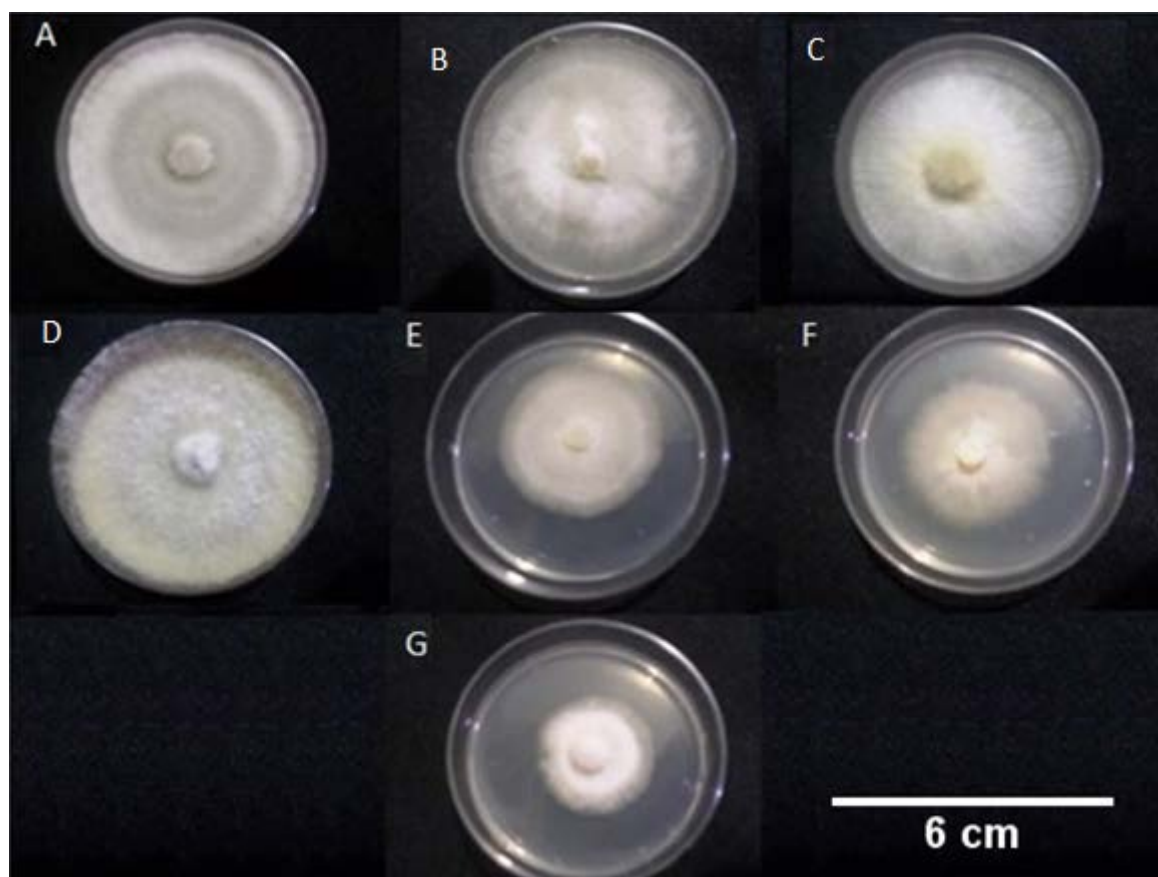
No grupo 5 temos o isolado T1, de crescimento mediano, mais lento do que todos os grupos citados anteriormente. Possui micélio aéreo escasso, aveludado-grumoso, margem imersa características diferentes dos grupos 1, 2, 3 e 4. Apresenta cor creme zoneamento circular, uninucleado e possui um diâmetro de hifa mediano ( $> 4 \mu\text{m}$ ).

O grupo 6 é representado pelos isolados T2 e T3 que possuem micélio aéreo escasso, aveludado-grumoso e margem imersa características diferentes dos grupos 1, 2, 3 e 4. Se difere do grupo 5 pelo crescimento um pouco mais lento, zoneamento rendilhado e diâmetro da hifa menor ( $< 4 \mu\text{m}$ ).

No grupo 7 temos como representantes os isolados W1, W2, W3, W4 e W5. Possuem cor branca, micélio presente em meio de cultura, aspecto aveludado, zoneamento circular e margem imersa. Seus dados de crescimento são os mais baixos em meio PDA e CMA, uninucleado e diâmetro da hifa mediano ( $> 4 \mu\text{m}$ ). Sua cor, aspecto, diâmetro da hifa e zoneamento o diferem do grupo 6.

A análise do dendrograma (Figura 5), evidenciou que os 7 grupos se dividem principalmente em crescimento rápido (FIGURAS 6 A, B, C e D) e crescimento lento (FIGURAS 6 E, F e G).

FIGURA 6 - Representação dos isolados de cada grupo cultivados em meio PDA por 10 dias. A: Grupo 1 (isolado A96), B: Grupo 2 (P66), C: Grupo 3 (O30), D: Grupo 4 (O31), E: Grupo 5 (T1), F: Grupo 6 (T2) e G: Grupo 7 (W1)



Fonte: Próprio autor

### 5.3 Classificação

Segundo a chave dicotômica (ANEXO A) adaptada de Currah e Zelmer (1992), Currah et al. (1997) e Currah, Zettler e Mcinnis (1997), os isolados anamorfos representam quatro gêneros diferentes (TABELA 6). O grupo 1 e grupo 2 não apresentam margem imersa, células multinucleada, rizomorfos ausente e grampo de conexão. São colônias de crescimento rápido, se encaixando, assim, no gênero *Ceratorhiza*.

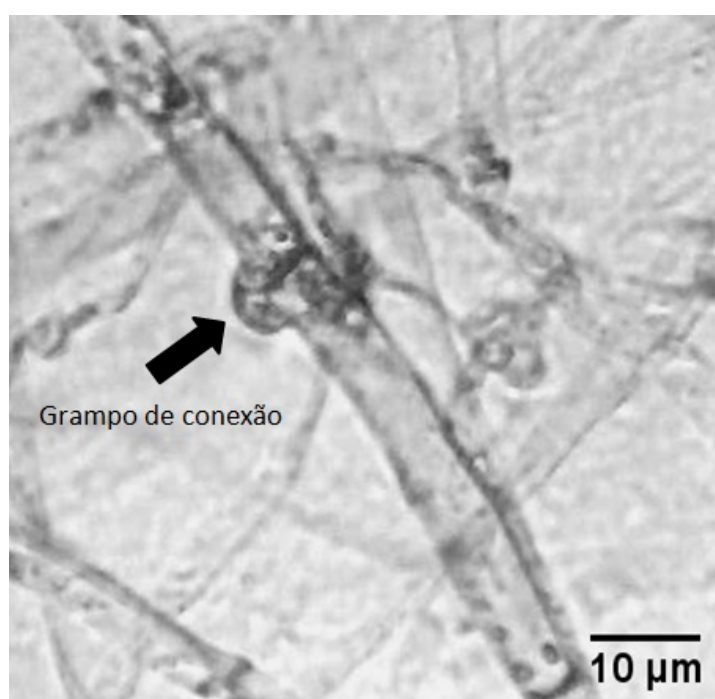
TABELA 6 - Classificação de gênero dos 17 isolados de espécies nativas e cultivadas

Grupos	Código dos isolados	Gêneros pertencente
1	A96	<i>Ceratorhiza</i>
2	P55, P56, P57, P63, P65, P66	<i>Ceratorhiza</i>
3	O30	<i>Rhizoctonia-like</i>
4	O31	<i>Moniliopsis</i>
5	T1	<i>Epulorhiza</i>
6	T2, T3	<i>Epulorhiza</i>
7	W1, W2, W3, W4, W5	<i>Epulorhiza</i>

Fonte: Próprio autor

No grupo 3 está o isolado O30, que não apresenta margem imersa, células multinucleada, rizomorfos ausente e células monilióides. Apresenta grampo de conexão (FIGURA 7) e crescimento rápido. O fato de ter o crescimento rápido, ser de fácil cultivo em meio de cultura e não enrugam o meio de cultura, descarta a possibilidade deste isolado pertencer ao gênero *Melanotus*. Como este isolado se manteve anamorfo, a sua classificação usando apenas características morfológicas e culturais é complicada (CURRAH; ZETTLER; MCINNIS, 1997). Por este motivo ele foi denominado de *Rhizoctonia-like*.

FIGURA 7 - Grampo de conexão do isolado O30



Fonte: Próprio autor

No Grupo 4 o isolado O31 não apresenta margem imersa, rizomorfos e grampo de conexão ausente. Sua colônia é de crescimento rápido e é multinucleada se encaixando assim no gênero *Moniliopsis*.

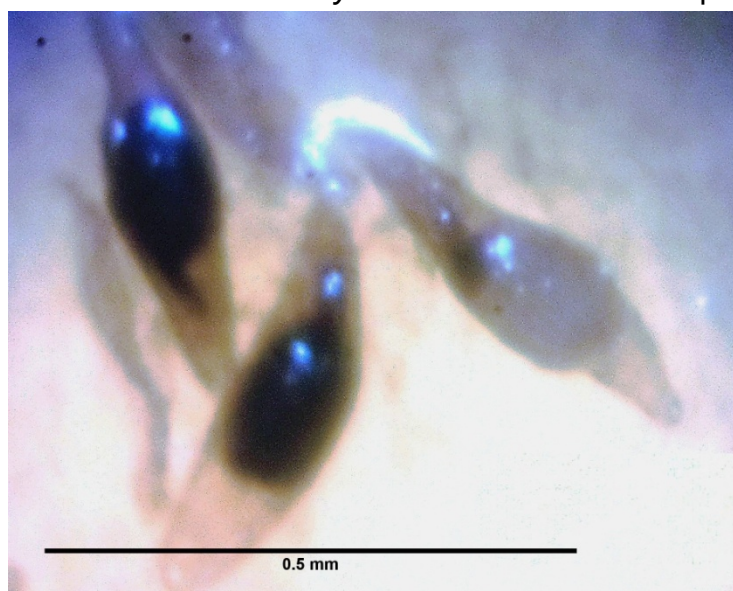
Os grupos 5 (T1), 6 (T2 e T3) e 7 (W1, W2, W3, W4 e W5) foram classificados como *Epulorhiza*, não apresentam células multinucleada, rizomorfos ausente e grampo de conexão. Apresentam margem imersa e de crescimento bem lento.

#### 5.4 Germinação simbiótica e confirmação da associação micorrízica

Para a inoculação das sementes foi usado um representante de cada grupo dos isolados (A96, P66, O30, O31, T1, T2 e W1) e análise da germinação de seis espécies de orquídea epífitas, de três gêneros distintos.

O inóculo O31 não promoveu a germinação, matando as sementes (FIGURA 8).

FIGURA 8 - Sementes mortas de *Cattleya walkeriana* inoculadas pelo isolado O31



Fonte: Próprio autor

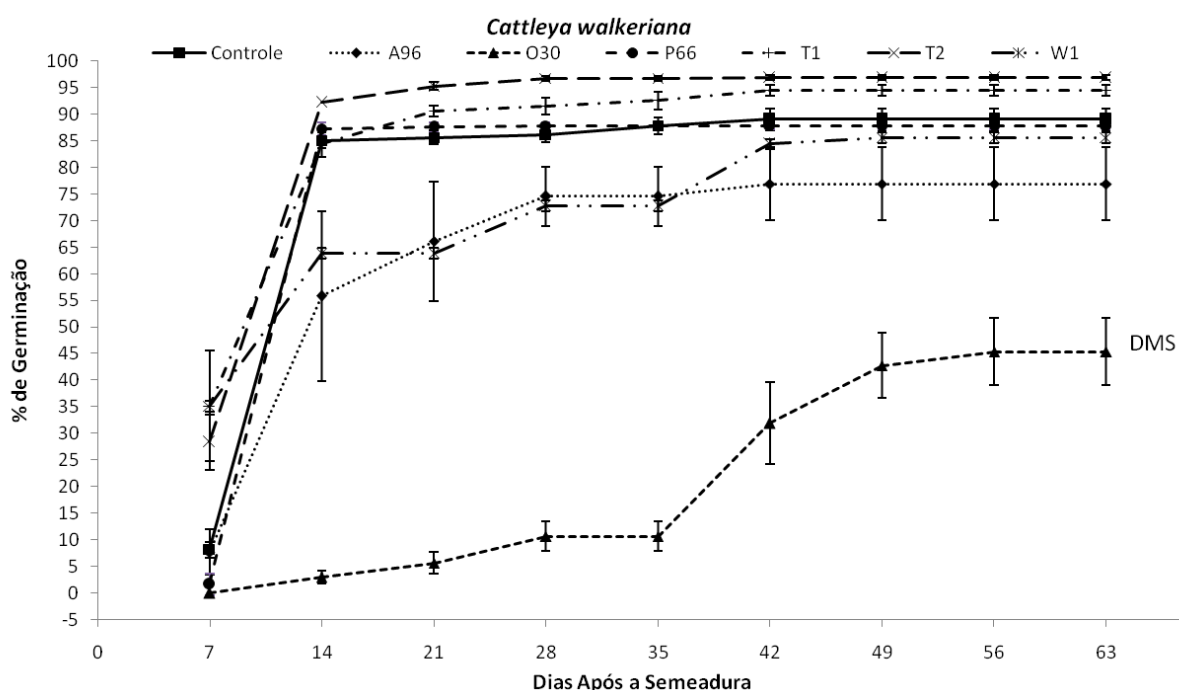
O controle e os demais tratamentos, estabilizaram a germinação de *Cattleya walkeriana* aos 42 dias após a germinação, enquanto o inóculo O30 estabilizou apenas aos 56 dias.

Os inóculos W1 e T1 na primeira semana promoveram uma germinação mais alta que o controle, em 26,97%. Entretanto, no decorrer dos dias, a

germinação assimbiótica não diferiu estatisticamente da germinação simbiótica dos mesmos.

O inóculo que promoveu a mais alta taxa de germinação nas sementes de *Cattleya walkeriana* foi o T2, e comparado ao controle apresentou uma germinação mais alta, em 7,84%. Os inóculos P66, T1, T2, W1 e o controle não diferiram na germinação a partir dos 42 dias após a semeadura. O inóculo A96 apresentou uma germinação mais baixa, em 19,95% comparado ao inóculo T2. O inóculo O30 apresentou o resultado mais baixo em germinação, comparado ao inóculo T2, promoveu um decréscimo de 51,5% (FIGURA 9).

FIGURA 9 - Porcentagem de germinação de *Cattleya walkeriana* na presença de seis inóculos fúngicos mais o controle



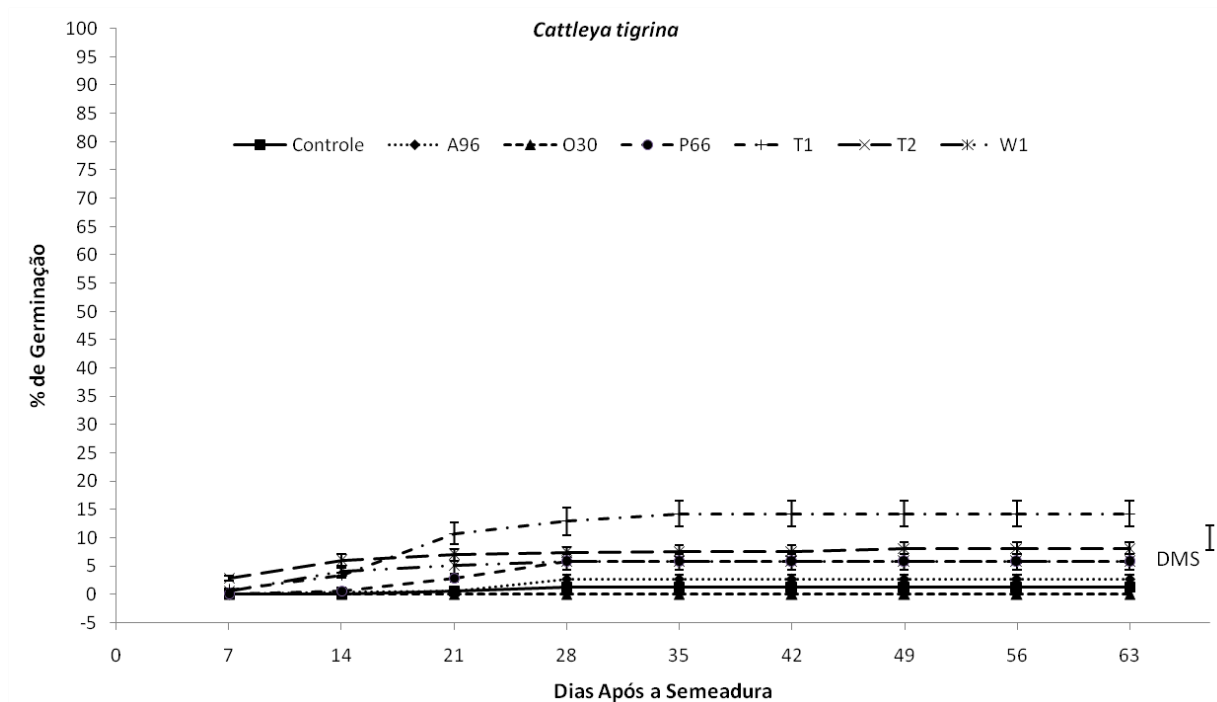
Fonte: Próprio autor

As sementes de *Cattleya tigrina* apresentam a germinação estabilizada após 28 dias nos inóculos A96, P66, W1 e no controle. O inóculo T1 atingiu a germinação máxima aos 35 dias e o inóculo T2 aos 49 dias após a semeadura. O cultivo assimbiótico apresentou o começo da germinação apenas aos 21 dias após a semeadura. O inóculo T2 apresentou na primeira semana uma porcentagem de germinação mais alta que os demais inóculos.

O inóculo O30 não promoveu a germinação nas sementes de *Cattleya tigrina*, entretanto as sementes aparentemente não estavam mortas.

Exceto o inóculo O30, todas as sementes que germinaram em condições simbióticas apresentaram melhor resultado do que na condição assimbiótica. O inóculo que apresentou uma melhor porcentagem de germinação foi o inóculo T1, comparado ao controle, promoveu uma germinação maior em 13%, se destacando dos demais inóculos. Mesmo que o inóculo T2 tenha sido o segundo melhor na taxa de germinação de *Cattleya tigrina*, a diferença entre o inóculo T1 e T2 é de 6,17%. O inóculo W1 e P66 não diferiram estatisticamente entre si. O inóculo A96 foi o que promoveu o mais baixo resultado, dentre os inoculantes que promoveram a germinação, com uma diferença de 11,65% mais baixa na germinação comparado ao inóculo T1 (FIGURA 10).

FIGURA 10 - Porcentagem de germinação de *Cattleya tigrina* na presença de seis inóculos fúngicos mais o controle

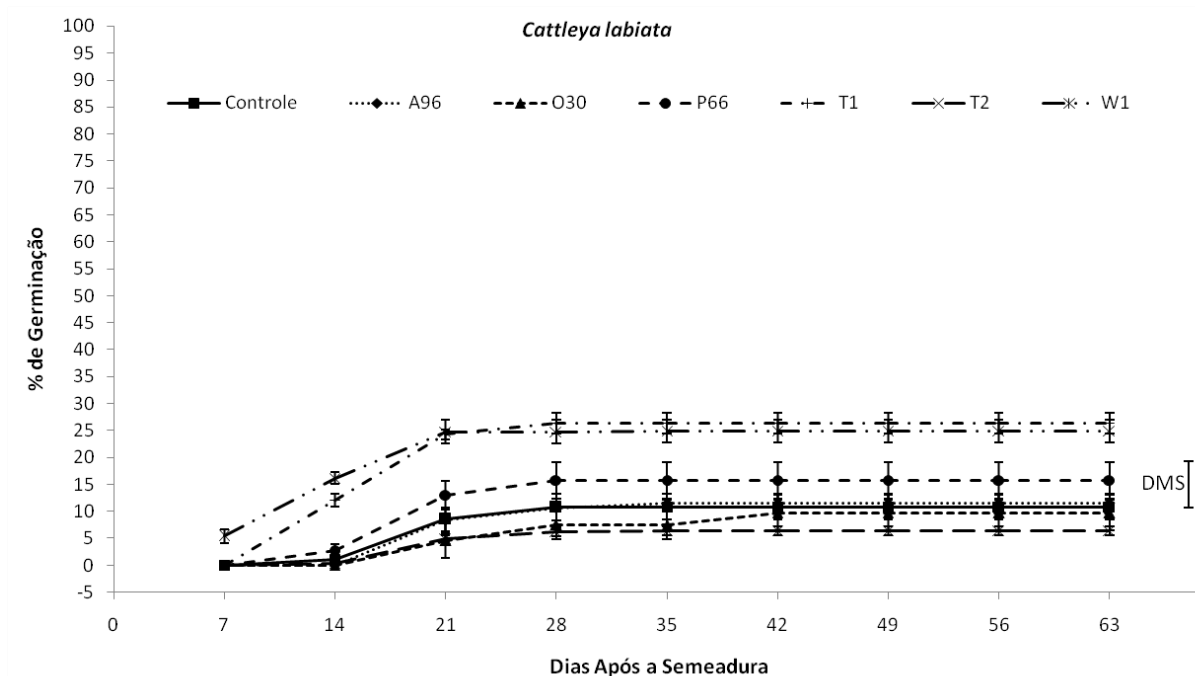


Fonte: Próprio autor

Os inóculos W1, P66 e T1 em sementes *Cattleya labiata* estabilizaram sua germinação em 28 dias; os inóculos A96, T2 e o controle aos 35 dias e o inóculo O30 aos 42 dias após a semeadura. O inóculo W1 foi o único que apresentou o início da germinação aos sete dias, A96 e O30 aos vinte e um dias e os demais aos 14 dias.

O inóculo T1 foi o que melhor promoveu a germinação de sementes de *Cattleya labiata* quando comparado ao controle apresentou uma porcentagem de germinação mais alta em 15,48%. A diferença entre a porcentagem de germinação do inóculo W1 e T1 foi de apenas 1,4%. O inóculo P66 promoveu uma porcentagem de germinação mais baixa, em 10,6% quando comparado ao inóculo T1, o qual, promoveu uma porcentagem de germinação mais alta, em 4,88% quando comparado ao controle. Os inóculos O30, A96 e T2 não diferiram do controle pela DMS (FIGURA 11).

FIGURA 11 - Porcentagem de germinação de *Cattleya labiata* na presença de seis inóculos fúngicos mais o controle



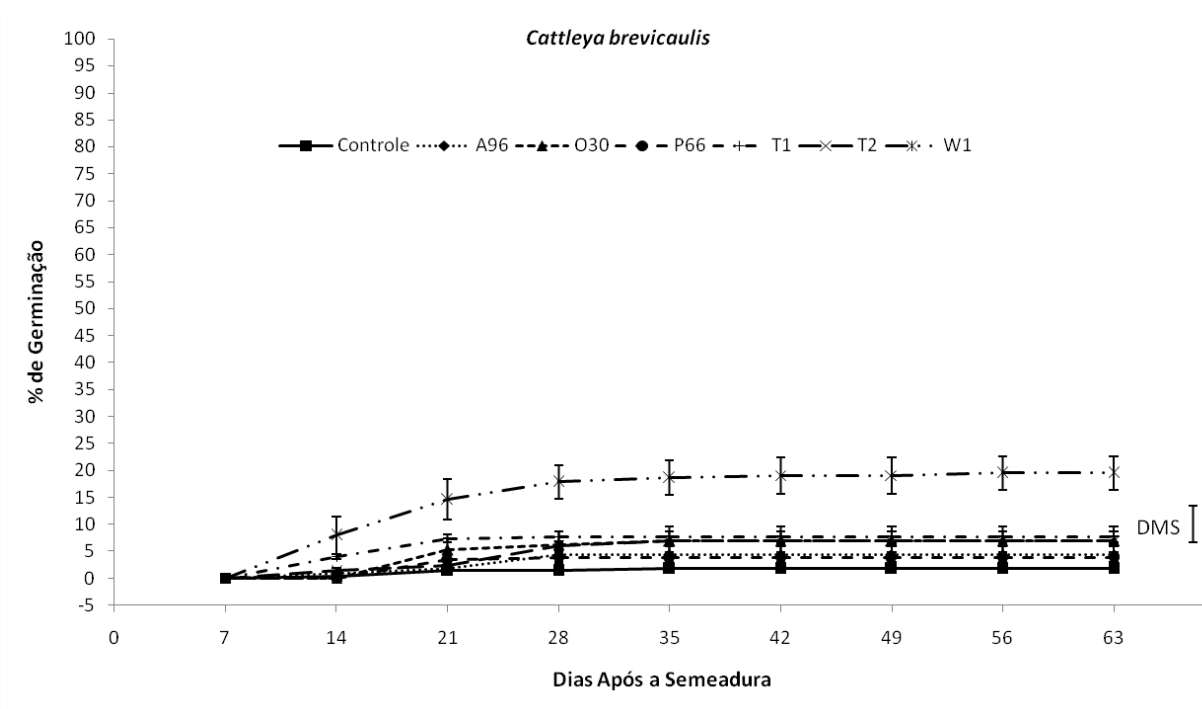
Fonte: Próprio autor

Sementes de *Cattleya brevicaulis* estabilizaram a germinação aos 28 dias com os inóculos A96, P66 e T1; aos 35 dias no controle e o inóculo O30, e somente aos 42 dias sob a ação do inóculo W1.

O cultivo assimbiótico para *Cattleya brevicaulis* foi o que apresentou resultado mais baixo em porcentagem de germinação, 1,77%. O cultivo simbiótico com o inóculo W1 apresentou porcentagem mais alta, em 17,73% comparado ao controle. Os demais inóculos e o controle, não diferiram pela DMS (FIGURA 12).



FIGURA 12 - Porcentagem de germinação de *Cattleya brevicaulis* na presença de seis inóculos fúngicos mais o controle



Fonte: Próprio autor

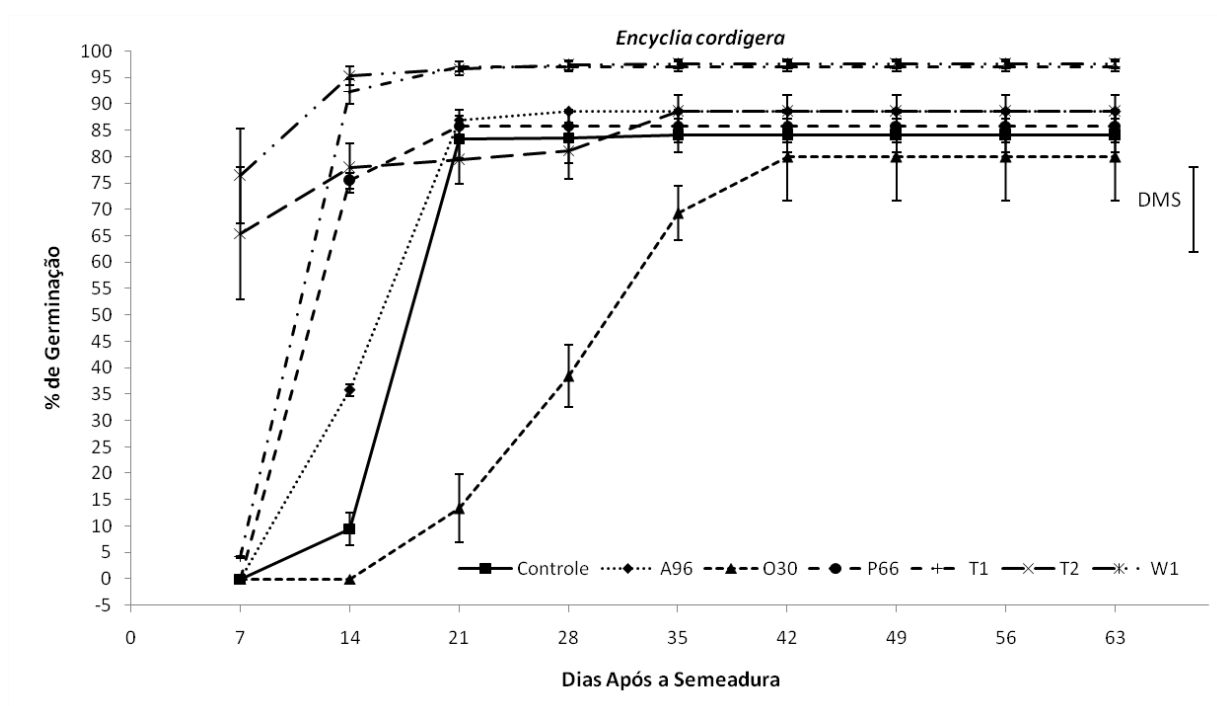
A germinação de *Encyclia cordigera* sob influência do inóculo T1 se estabilizou aos 21 dias, sob W1 e A96 aos 28 dias, sob T2 e controle aos 35 dias e o inóculo O30 somente aos 42 dias.

Na primeira semana o inóculo W1 promoveu 76,36% de germinação, T2 65,45% e T1 4,13%, enquanto o controle e os demais inóculos não germinaram. Aos 14 dias o inóculo T1 quase se igualou ao inóculo W1.

Exceto pelo inóculo O30, o controle foi o que mostrou a porcentagem mais baixa germinação. O inóculo que apresentou a mais alta porcentagem de germinação foi o W1, entretanto, o inóculo T1 possuiu apenas 0,48% a menos em seu resultado. Comparado ao controle, o cultivo com o inóculo W1 foi mais alto, em 13,47%.

O controle e os inóculos T2, P66, A96 e O30 não diferiram pela DMS (FIGURA 13).

FIGURA 13 - Porcentagem de germinação de *Encyclia cordigera* na presença de seis inóculos fúngicos mais o controle



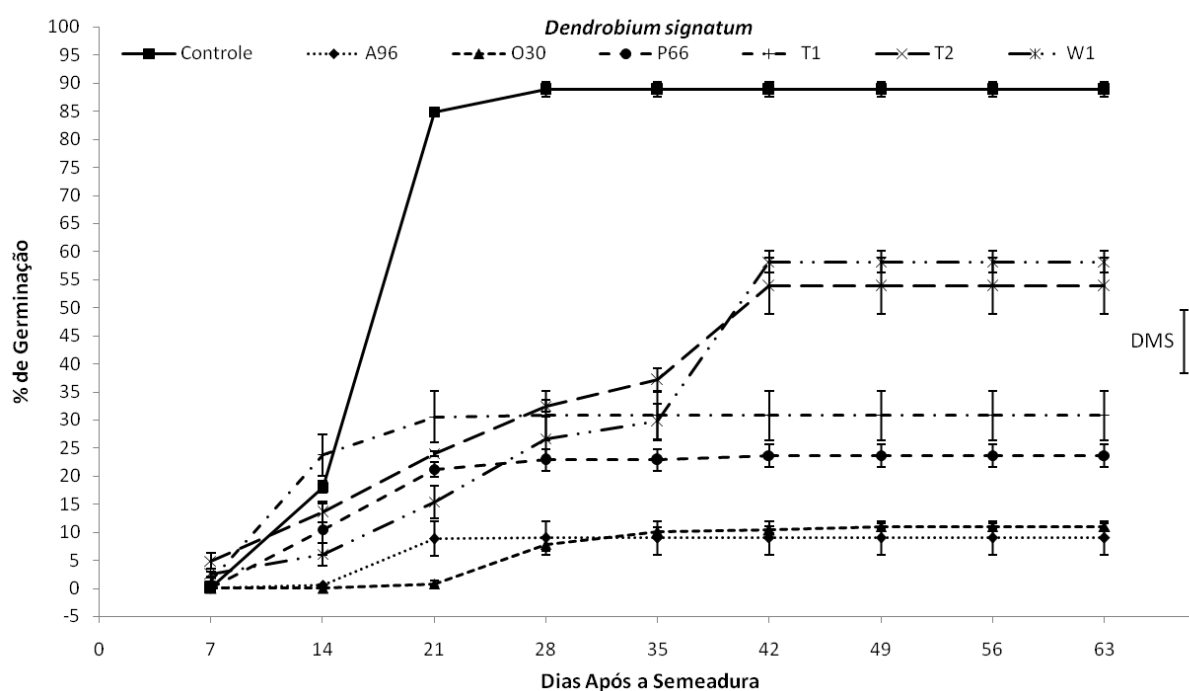
Fonte: Próprio autor

As sementes de *Dendrobium signatum* estabilizaram a germinação nos inóculos A96, P66, T1 e no controle aos 28 dias; em T1 aos 35 dias; em T2 e W1 aos 42 dias e em O30 aos 49 dias após a semeadura.

Para as sementes de *Dendrobium signatum* o controle foi o que apresentou a mais alta taxa de germinação, 88,85%. Em seguida os cultivos simbióticos T2 e W1, com uma diferença muito pequena entre os dois (T2 germinou 4,34% a menos comparado ao W1). Comparado ao controle, o isolado W1 apresentou uma germinação mais baixa, em 30,66%.

A menor porcentagem de germinação foi do isolado A96 e, comparado a este, o controle apresentou uma germinação superior em, 79,88% (FIGURA 14).

FIGURA 14 - Porcentagem de germinação de *Dendrobium signatum* na presença de seis inóculos fúngicos mais o controle



Fonte: Próprio autor

Dentre os cultivos simbióticos apenas o inóculo O30 (FIGURA 15 E) não apresentou a confirmação da associação micorrízica (TABELA 7).

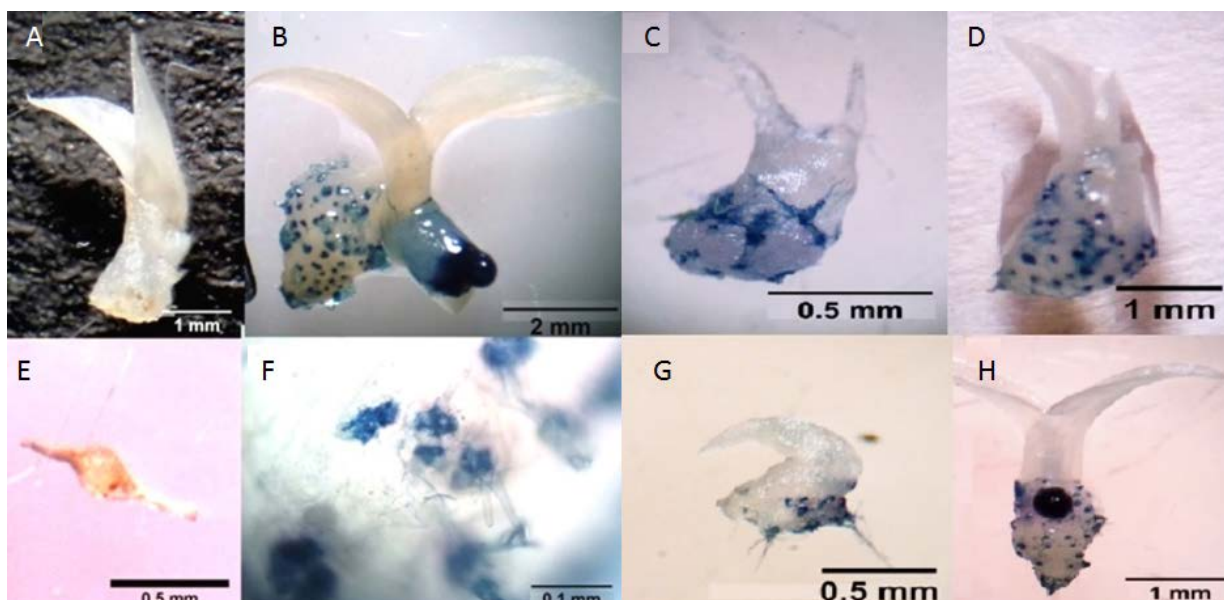
TABELA 7 - Associação micorrízica entre as seis espécies de orquídea e os seis inóculos avaliados

Espécie	Inóculo					
	A96	P66	O30	T1	T2	W1
<i>Cattleya walkeriana</i>	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
<i>Cattleya tigrina</i>	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
<i>Cattleya brevicaulis</i>	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
<i>Cattleya labiata</i>	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
<i>Encyclia cordigera</i>	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
<i>Dendrobium signatum</i>	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim

Fonte: Próprio autor

Foi observado que a colonização dos isolados fúngicos A96, P66, W1, T1 e T2 nos protocórmios das espécies se concentram na região basal, colonizando as células na superfície (FIGURAS 15 B, C, D, G e H) e internamente (FIGURA 15 F). A colonização pode ser observada, bem como, em protocórmios maiores (FIGURA 15 B) e menores (FIGURAS 15 C e G).

FIGURA 15 - A: Plântula de *Cattleya walkeriana* cultivada em meio assimbiótico, B: Plântula de *Cattleya tigrina* inoculada com o isolado T2, C: Protocórmio de *Dendrobium signatum* inoculado com o isolado T1, D: Protocórmio de *Cattleya brevicaulis* inoculado com o isolado W1, E: Semente de *Cattleya brevicaulis* inoculada com o isolado O30, F: Infecção do isolado T2 na região interna basal do protocórmio de *Cattleya tigrina*, G: Protocórmio de *Cattleya walkeriana* inoculado com o isolado A96, H: Plântula de *Encyclia cordigera* inoculada com o isolado P66. A formação com cor azul de Trypan Blue confirma a infecção dos inóculos



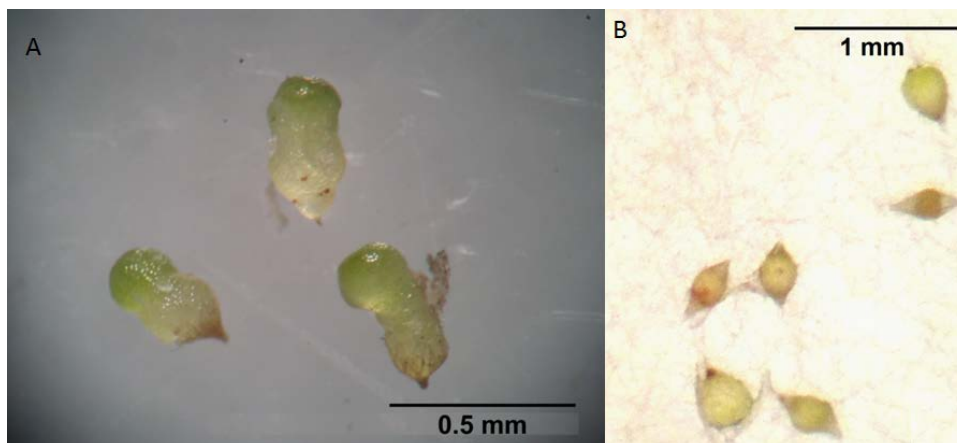
Fonte: Próprio autor

Nota: Todas as amostras foram submetidas ao teste aos 90 dias após a sementeira

## 5.5 Crescimento das plântulas

O isolado O30 promoveu a germinação de cinco das seis espécies testadas, entretanto, não promoveu o desenvolvimento de protocórmios, aos 180 dias após a sementeira, das mesmas (FIGURA 16).

FIGURA 16 - A: Protocórmios de *Encyclia cordigera* germinadas no inóculo O30, aos 90 dias após a semeadura, B: Protocórmios e sementes de *Encyclia cordigera* germinadas no inóculo O30, aos 63 dias após a semeadura



Fonte: Próprio autor

Após 90 dias de cultivo em placa de Petri e após, com mais 90 dias em frascos contendo os mesmos meio de cultura utilizados para a germinação, *Cattleya brevicaulis* desenvolveram-se melhor quando comparadas ao controle, quando inoculada com o isolado A96, apresentando parte aérea com média de 0,88 cm (FIGURA 17), comprimento da maior raiz de 2,03 cm (controle não apresentou raízes), massa seca de parte aérea de 1,82 mg, massa seca de raiz de 1,8 mg e massa seca total de 3,61 mg.

FIGURA 17 - Plântulas de *Cattleya brevicaulis* aos 180 dias após a semeadura inoculadas com o isolado A96 e controle



Fonte: Próprio autor

Os demais isolados não diferiram estatisticamente do controle em acúmulo de massa, entretanto, todos apresentam maior crescimento de parte aérea.

O inóculo T1 e o controle não apresentaram crescimento do sistema radicular (TABELA 8).

TABELA 8 - Avaliação de desenvolvimento de plântulas de orquídeas inoculadas com diferentes isolados, 180 dias após a semeadura

Espécie	Inóculo	Comprimento (cm)		Massa Seca (mg)		Total	% de germinação final
		Parte aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz		
<b><i>Cattleya brevicaulis</i></b>	Controle	0,22 c	0,00 c	0,48 b	0,00 b	0,48 b	1,77
	A96	1,10 a	2,03 a	2,30 a	1,80 a	4,09 a	4,45
	P66	0,57 b	0,44 b	0,48 b	0,22 b	0,71 b	3,75
	T1	0,37 c	0,00 c	0,39 b	0,00 b	0,39 b	7,69
	T2	0,33 c	0,24 c	0,21 b	0,12 b	0,33 b	6,97
	W1	0,44 b	0,54 b	0,53 b	0,36 b	0,90 b	19,5
<b><i>Cattleya labiata</i></b>	Controle	0,44 b	0,90 c	0,75 c	0,91 c	1,65 c	10,89
	A96	0,51 b	0,17 d	0,28 d	0,10 d	0,38 d	11,46
	P66	0,10 c	0,00 d	0,01 d	0,00 d	0,01 d	15,77
	T1	0,47 b	0,27 d	0,36 d	0,07 d	0,43 d	26,37
	T2	0,99 a	2,02 a	2,25 a	3,05 a	5,31 a	6,42
	W1	0,83 a	1,74 b	1,55 b	1,87 b	3,43 b	24,97
<b><i>Cattleya tigrina</i></b>	Controle	0,30 c	0,00 b	0,43 c	0,00 b	0,43 b	1,27
	A96	0,00 d	0,00 b	0,00 c	0,00 b	0,00 b	2,62
	P66	0,00 d	0,00 b	0,00 c	0,00 b	0,00 b	5,74
	T1	0,36 c	0,12 b	1,01 b	0,32 b	1,33 b	14,27
	T2	0,54 b	0,98 a	1,69 a	2,42 a	4,12 a	8,1
	W1	0,73 a	1,09 a	1,79 a	1,43 a	3,23 a	5,73
<b><i>Cattleya walkeriana</i></b>	Controle	0,57 a	1,86 a	1,65 b	4,11 a	5,76 a	89,03
	A96	0,25 b	0,67 b	0,43 c	0,59 b	1,03 c	76,92
	P66	0,35 b	0,66 b	0,33 c	0,67 b	1,01 c	87,84
	T1	0,37 b	0,60 b	0,59 c	0,87 b	1,47 c	94,44
	T2	0,76 a	1,33 a	3,29 a	4,12 a	7,41 a	96,87
	W1	0,54 a	1,47 a	1,30 b	2,44 a	3,75 b	85,59
<b><i>Dendrobium signatum</i></b>	Controle	0,59 b	0,46 b	1,89 a	0,83 a	2,72 b	88,85
	A96	0,39 b	0,26 c	0,63 b	0,16 b	0,79 c	8,97
	P66	1,00 a	0,45 b	1,38 b	0,90 a	2,29 b	23,63
	T1	0,43 b	0,25 c	1,75 b	0,28 b	1,05 c	30,77
	T2	1,03 a	0,74 a	2,91 a	0,96 a	3,87 a	53,85
	W1	0,33 b	0,12 d	0,59 b	0,05 b	0,64 c	58,19
<b><i>Encyclia cordigera</i></b>	Controle	0,43 b	1,88 a	0,61 d	1,54 b	2,16 c	84,08
	A96	0,33 b	0,42 b	0,13 d	0,26 c	0,39 d	88,51
	P66	0,63 b	1,65 a	1,39 b	3,32 a	3,71 b	85,81
	T1	0,63 b	1,23 a	0,98 c	1,88 b	2,85 c	97,07
	T2	1,14 a	1,55 a	2,81 a	2,99 a	5,81 a	88,55
	W1	0,46 b	2,00 a	0,43 d	1,92 b	2,35 c	97,55

Fonte: Próprio autor

Nota: Controle conduzido no meio MS e isolados no meio agar-aveia. Letras distintas na vertical diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Plântulas de *Cattleya labiata* exibiram melhor resultado nas variáveis de crescimento e massa seca quando inoculadas com os isolados T2 seguido pelo isolado W1. Comparado ao cultivo assimbiótico, o inóculo T2 apresentou maior comprimento de parte aérea, de 0,55 cm, e comprimento da maior raiz de 1,12 cm. O inóculo W1 apresentou maior comprimento de parte aérea (comparado ao controle) de 0,39 cm e da maior raiz de 0,84 cm. O acúmulo de massa seca também foi maior para estes dois inóculos. A massa seca total das plântulas inoculadas com o isolado T2, comparada a controle, foi maior em 3,66 mg e W1 em 1,78 mg. Apenas o inóculo T1 não promoveu crescimento de raízes e todos os demais inóculos mostraram um desempenho menor que o controle quanto aos parâmetros relacionados com as plântulas.

Os inóculos A96 e P66 não promoveram crescimento nas plântulas de *Cattleya tigrina*. O controle não apresentou crescimento de raiz. O inóculo que promoveu o melhor comprimento de parte aérea foi o isolado W1, com 0,43 cm a mais que o controle e maior comprimento de raiz de 1,36 cm, a massa seca de parte aérea foi maior em 1,36 mg. O inóculo T2 apresentou um menor crescimento de raiz comparado ao W1, entretanto, a massa seca de raiz foi o que apresentou maior resultado. O acúmulo de massa seca total foi maior para o isolado T2, com 3,69 mg, seguido pelo inóculo W1 com 2,8 mg a mais que o controle.

Plântulas de *Cattleya walkeriana* apresentaram maior comprimento de parte aérea quando inoculadas com o isolado T2, seu comprimento foi maior em 0,19 cm comparado ao controle. O melhor resultado de comprimento da maior raiz foi no cultivo assimbiótico, seguido pelo inóculo W1, menor em 0,36 cm. Mesmo que o isolado T2 tenha apresentado um resultado menor em comprimento de raiz de 0,53 cm comparado ao controle, seu acúmulo de massa seca de raiz foi maior em 0,01 mg. O acúmulo de massa seca de parte aérea e massa seca total foi maior também para o inóculo T2, sendo 1,64 e 1,69 mg respectivamente, a mais que o controle.

O inóculo que apresentou melhor resultado para o crescimento de plântulas de *Dendrobium signatum* em todas as variáveis foi o inóculo T2. Neste, o crescimento de parte aérea foi maior em 0,44 cm e comprimento de raiz em 0,28 cm comparado ao controle (FIGURA 18), e o acúmulo de massa seca total foi maior em 1,15 mg.

FIGURA 18 - Plântulas de *Dendrobium signatum* aos 180 dias após a sementeira inoculadas com o isolado T2 e no cultivo assimbiótico

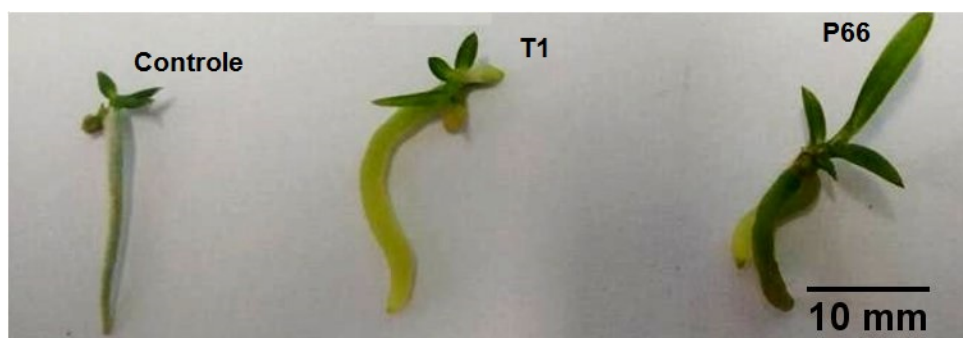


Fonte: Próprio autor

O inóculo que melhor promoveu crescimento da parte aérea para as plântulas de *Encyclia cordigera* foi o T2, com 0,71 cm, a mais que, o controle. O inóculo que promoveu maior crescimento de raiz foi o isolado W1, com 0,12 cm maior que a controle. O inóculo que apresentou maior massa seca de raiz, comparado ao controle foi o inóculo P66, com 1,78 mg, seguido pelo inóculo T2 com 1,45 mg. As mais altas taxas de massa seca de parte aérea e massa seca total foi do inóculo T2, com 2,2 mg e 3,65 mg, respectivamente, a mais que o controle.

Raízes de plântulas de *Encyclia cordigera* apresentaram uma média maior de comprimento, enquanto os inóculos P66 e T1 apresentam menor comprimento. Entretanto, a massa seca de raízes das plântulas que cresceram em meio de cultura com inóculos fúngicos possuem taxas mais altas e apresentam raízes mais espessas, quando comparado ao controle (FIGURA 19).

FIGURA 19 - Plântulas de *Encyclia cordigera* aos 180 dias após a sementeira inoculadas com os isolados T1, P66 e controle



Fonte: Próprio autor



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Metodologias de isolamento e classificação

A metodologia por *peloton* de orquídeas oriundas de Mata Atlântica (*Prescottia* sp. e *Oeceoclodes maculata*) promoveu, no Oeste Paulista, apenas o isolamento de fungos anamorfos do gênero *Ceratorhiza* (*Prescottia* sp.), *Moniliopsis* e *Rhizoctonia*-like (*Oeceoclodes maculata*), provavelmente devido ao fato destes gêneros terem o crescimento mais rápido em meio de cultura (CURRAH; ZELMER, 1992).

Entretanto raízes de plantas de *Arundina bambusifolia* que nasceram espontaneamente dentro do orquidário, possibilitaram o isolamento de um fungo micorrízico orquidóide (*Ceratorhiza*), indicando assim a presença deste gênero no orquidário. *Prescottia* sp., *Arundina bambusifolia* e *Oeceoclodes maculata* são espécies de habito terrícola (ROCHA, 2008; FLORA DO BRASIL 2020, 2017), orquídeas de habito epifítico oriundas do ambiente natural e do orquidário não possibilitaram isolados de rizoctonióides anamorfos por esta metodologia.

No Brasil, o gênero *Ceratorhiza* foi encontrado em Campos ruprestes do Quadrilátero Ferrífero mineiro em plantas de *Bifrenaria tyrianthina* e *Oncidium blanchetii* (NOGUEIRA, 2004), em regiões de Mata Atlântica mineira em plantas de *Campylocentrum organense*, *Bulbophyllum* sp, *Isochilus lineares* e *Maxillaria marginata* (PEREIRA et al., 2005a, PEREIRA et al., 2005b), em Mata Atlântica de Campos do Jordão em plantas de *Coppensia doniana* (VALADARES et al., 2012). Linhares (2006) não encontrou este gênero no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro em Minas gerais.

A metodologia de isolamento de micorrizas orquidóides por isca possibilitou o isolamento de micorrizas orquidóides do gênero *Epulorhiza* de duas espécies epífitas, *Cattleya tigrina* e *Cattleya walkeriana*, mesmo em plantas oriundas de cultivos em estufa com os tratamentos culturais adequados. Tratamentos culturais, como aplicação de fungicida, podem ser o motivo pelo qual não foi possível o isolamento de fungos micorrízicos pela metodologia por *peloton*, pois a taxa de colonização dos fungos nas raízes pode estar mais baixa, porém, este trabalho mostra que existe a simbiose mesmo neste tipo de ambiente.

A distância entre o local onde foram coletadas as raízes das orquídeas que possibilitaram o isolamento por *peloton* e o local onde fica o orquidário é de apenas 12 quilômetros. Visto que, a infecção destas plantas por fungos micorrízicos tenha ocorrido pelo ambiente externo, provavelmente este gênero é encontrado na região do Oeste Paulista, porém, a metodologia de isolamento por *peloton*, usada, não foi eficaz para isolar o gênero *Epulorhiza* no local.

Metodologias usando pacotes de isca tem sido bem sucedidas, Zi et al. (2014) foram bem sucedidos ao isolar micorriza do gênero *Epulorhiza* na China. Cruz-Higareda, Luna-Rosales e Barba-Alvarez (2015) isolaram micorrizas que germinaram sementes com sucesso no México. Gale et al. (2010), no Japão, isolaram micorrizas que promoveram germinação. Khamchatra et al. (2016) na Tailândia isolaram, por este método, micorrizas do gênero *Epulorhiza*. Este método tem se mostrado eficiente para o isolamento de micorrizas orquidóides, entretanto, todos os trabalhos têm usado esta técnica *in situ*, para plantas espontâneas em seu ambiente natural.

Trabalhos que utilizam a metodologia de isca para o isolamento de micorrizas orquidóides costumemente permanecem *in situ* por um período maior de 70 dias. Collins et al. (2007) deixou os pacotinhos de isca por 5 meses, Wang et al. (2011) por 8 meses e Khamchatra et al. (2016) por 7 meses. Este trabalho apresenta resultados positivos com apenas 70 dias, mesmo não apresentando formação de protocórmios, com a ajuda da espuma, a visualização das sementes em estágio um foi facilitada (FIGURAS 4 A e B), e estas, foram eficientes para o isolamento de fungos micorrízicos orquidóides (FIGURAS 4 C e D) de *Cattleya tigrina* e *Cattleya walkeriana*.

O número de espécies de micorrizas orquidóides é indeterminado e poucas espécies têm sido descritas, em razão das dificuldades encontradas para identificação dos isolados (TAYLOR et al., 2002). A identificação do gênero, para o isolado O30, não foi possível somente com as características morfológicas quantitativas e qualitativas.

A análise de agrupamento (UPGMA) foi eficaz para subdividir os isolados em 7 grupos, usando dados qualitativos e quantitativos associados para formar um dendrograma (TABELA 4 e 5 FIGURA 5). Esta técnica tem como separar grupos com características homogêneas entres isolados do mesmo grupo e indicar máxima heterogeneidade entre os grupos (CRUZ; REGAZZI, 1994). Vários trabalhos

com micorrizas orquidóides tem utilizado esta técnica na separação de grupos entre os isolados micorrízicos, entretanto, foram usados apenas as características qualitativas para a análise de agrupamento (VALADARES, 2009; LINHARES, 2006) ou qualitativa e quantitativas separadamente (PEREIRA, 2009; CARVALHO; PEREIRA, 2017).

## 6.2 Confirmação da associação micorrízica

Não foi constatada visualmente a colonização de fungos pelo isolado O30 o qual não promoveu o crescimento das plântulas. Entretanto o mesmo não ocasionou a morte das sementes como o isolado O31 (FIGURA 8), apresentou apenas massa embrionária expandida e coloração verde (FIGURA 16 A e B) característico do estágio um de desenvolvimento (SEATON; HAILES, 1989).

## 6.3 Germinação assimbiótica e crescimento de plântulas

É importante ressaltar não somente a germinação das sementes nos inóculos testados, mas também no seu desenvolvimento, fungos compatíveis são aqueles que conseguem promover a germinação e promover o crescimento mais avançados dos estádios das plântulas (BONNARDEAUX et al., 2007).

*Cattleya tigrina* apresentou uma porcentagem de germinação maior quando inoculada com fungos do gênero *Epulorhiza* T1 e T2 (FIGURA 10), sendo que estes inóculos foram isolados da mesma espécie (TABELA 3). Entretanto o crescimento das plântulas foi maior quando as mesmas foram inoculadas com os isolados T2 e W1. O isolado W1 (*Epulorhiza*) não diferiu na germinação em relação ao isolado P66 (*Ceratorhiza*), mas no crescimento e acúmulo de massas secas o inóculo pertencente ao gênero *Epulorhiza* foi melhor que do gênero *Ceratorhiza*. Os isolados de *Ceratorhiza* não promoveram o desenvolvimento de protocórmios de *Cattleya tigrina*. O isolado W1 retirado de outra espécie (*Cattleya walkeriana*) promoveu germinação e crescimento de plântulas em *Cattleya tigrina* (TABELA 8). Valadares (2009) isolou fungos micorrízicos de *Coppensia doniana* que promoveram a germinação de suas próprias sementes, entretanto estes mesmos isolados não promoveram germinação em *Oncidium flexuosum*.

Sementes de *Cattleya walkeriana*, em cultivo simbiótico, sob a ação dos isolados T2, T1 (*Epulorhiza*) germinaram melhor que em cultivo assimbiótico (FIGURA 9), entretanto seu crescimento e acúmulo de matéria seca foi maior que o cultivo assimbiótico somente em relação ao isolado T2 (TABELA 8). O isolado T2 foi obtido a partir da *Cattleya tigrina*, mostrando assim, que a especificidade pode não ocorrer exatamente com os isolados da mesma espécie. Otero; Ackerman e Bayman (2004) fizeram a germinação simbiótica de fungos micorrízicos de orquídea retirados de *Tolumnia variegata* e *Ionopsis utricularioides*, micorrizas isoladas de *Tolumnia variegata* promoveu a germinação de sementes de *Ionopsis utricularioides* e micorrizas isoladas de *Ionopsis utricularioides* promoveu a germinação de sementes de *Tolumnia variegata*.

*Cattleya labiata* apresentou maior porcentagem de germinação nos inóculos T1 e W1 (*Epulorhiza*) e sua pior porcentagem de germinação foi no inóculo T2 (*Epulorhiza*) (FIGURA 11). Entretanto, para o crescimento das plântulas o inóculo que melhor apresentou dados de crescimento e massas secas foi o inóculo T2 (TABELA 8) enquanto o inóculo que apresentou maior germinação (T1) não apresentou um bom desenvolvimento de plântulas. O fato desta espécie ter apresentado um desenvolvimento melhor no isolado que pior germinou pode ter ocorrido pela hipótese de que germinação inicial das sementes pode ser induzida por uma porção mais ampla de micobiontes do que é exigida para um maior crescimento (BIDARTONDO, 2005).

Todos os inóculos promoveram uma maior porcentagem de germinação em *Cattleya brevicaulis* do que no cultivo assimbiótico (FIGURA 12). O inóculo que proporcionou uma maior porcentagem de germinação foi o inóculo W1 (*Epulorhiza*), porém para seu crescimento (TABELA 8, FIGURA 17 A) foi o inóculo A96 (*Ceratorhiza*). Outras duas espécies de *Cattleya* citadas acima também apresentaram resultados diferentes para inóculos em germinação e desenvolvimento de plântulas, entretanto *Cattleya brevicaulis* dentre as quatro espécies de *Cattleya* foi a única que mostrou um resultado melhor em crescimento associada a uma *Ceratorhiza* Pereira et al. (2005c) demonstraram a germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* em isolado de *Ceratorhiza* (hospedeiro *Oncidium flexuosum*) e em três isolados de *Epulorhiza* (hospedeiro outras espécies), entretanto o isolado que promoveu o desenvolvimento até o estágio cinco foi apenas aquele do gênero *Ceratorhiza*, isolado da mesma espécie doadora das sementes.

Sementes de *Encyclia cordigera* mostraram uma porcentagem de germinação maior nos inóculos W1 e T1 (FIGURA 13), mas seu crescimento de plântula apresentou melhor resultado nas variáveis de crescimento e massas secas no cultivo simbiótico com o inóculo T2 (TABELA 8). Zettler; Burkhead e Marshall (1999) usaram dois isolados micorrízicos de *Epidendrum conopseum* para a germinação de sementes de *Encyclia tampensis*, e demonstraram que os dois isolados promoveram a germinação, mas somente um foi capaz de sustentar o embrião até o estágio cinco. Neste trabalho, dos seis inóculos que promoveram a germinação, cinco foram capazes de promover o desenvolvimento de plântulas de *Encyclia cordigera*, dentre esses cinco isolados apenas o isolado A96 demonstrou variáveis com resultados inferiores ao da germinação assimbiótica.

Dentre as seis espécies de orquídea analisadas, *Dendrobium signatum* foi a única que apresentou a porcentagem de germinação maior no cultivo assimbiótico (FIGURA 14). Dentre os cultivos simbióticos, os que mostraram uma maior porcentagem de germinação foram os isolado W1 e T2. O desenvolvimento das plântulas, tanto crescimento quanto em massa seca foi maior quando inoculada com o isolado T2 (TABELA 8, FIGURA 18). Swangmaneecharern, Serivichyaswat e Nontachaiyapoom (2012) germinaram sementes de quatro espécies de orquídea do gênero *Dendrobium* em cinco isolados de *Epulorhiza* retirados de *Paphiopedilum* sp., *Dendrobium* sp. e *Cymbidium* sp., obtendo resultados diversos, nos quais, o isolado retirado de *Cymbidium* sp. não promoveu desenvolvimento de protocórmio para nenhuma das quatro espécies testadas, isolados de *Paphiopedilum* sp. e *Dendrobium* sp. promoveram germinação e desenvolvimento de protocórmio nas quatro espécies de *Dendrobium* sp. e quatro das cinco espécies mostraram melhor desenvolvimento em cultivo simbiótico comparado ao assimbiótico.

Comparando porcentagem de germinação e crescimento de plântulas, a especificidade da germinação não foi necessariamente a mesma. Exceto *Cattleya walkeriana*, as outras cinco espécies mostraram melhor desenvolvimento de plântulas em inóculos diferentes, aquele cujos resultados fora mais alto quanto a germinação. Bertolini, Damon e Velázquez (2011) observaram que sementes *Rhynchostele bictoniensis* possui uma germinação mais alta em cultivo assimbiótico mas apresentam oxidação, entretanto protocórmios cultivados em meio simbiótico inoculado com isolados retirados de *Rhynchostele uroskineri* e *Rhynchostele grande*, promovem protocórmios mais saudáveis.

Cinco das seis espécies de orquídeas avaliadas mostraram melhor desenvolvimento de plântula na presença do isolado T2 (*Epulorhiza*), somente *Cattleya brevicaulis* apresentou melhor desenvolvimento no isolado A96 (*Ceratorhiza*). Todas as espécies avaliadas são de hábito epifítico e o inóculo T2 foi isolado de uma planta epifítica. Entretanto, *Cattleya brevicaulis* é uma planta epifítica e o inóculo A96 foi isolado de uma planta terrestre. Com isso podemos observar que a especificidade de orquídeas vai além das necessidades para a germinação das sementes, pois os fungos por mais que colonizem as células do embrião e promovam a germinação, não são capazes de sustentar o protocórmio até o início de sua autotrofia (ARDITTI, 1992; PEREIRA et al., 2005c).

O isolado T2 apresentou-se um fungo menos específico (não específico) com melhor desenvolvimento de plântula para cinco das seis espécies avaliadas, comprovando a compatibilidade deste fungo com outras espécies de orquídeas.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia por isca foi capaz de promover o isolamento de micorrizas orquidóides, do gênero *Epulorhiza*, de plantas oriundas de laboratório e cultivadas em orquidário (cinco isolados de *Cattleya walkeriana* e três isolados de *Cattleya tigrina*) indicando que as condições de cultivo em orquidário mantém a associação micorrízica ativa.

A metodologia por *peloton* foi capaz de isolar somente micorrizas do gênero *Ceratorhiza*, *Moniliopsis* e *Rhizoctonia-like*, de plantas que se desenvolve espontaneamente em ambiente controlado (um isolado de *Arundina*) e silvestres (seis isolados de *Prescottia* sp. e dois isolados de *Oeceoclades maculata*).

Dentre os isolados testados para a germinação (A96, P66, O30, O31, T1, T2 e W1) em 6 espécies de orquídeas (*Cattleya brevicaulis*, *Cattleya tigrina*, *Cattleya labiata*, *Cattleya walkeriana*, *Encyclia cordigera* e *Dendrobium signatum*), apenas o inóculo O31 (*Moniliopsis*) não promoveu germinação, matando as sementes. O inóculo O30 (*Rhizoctonia-like*) não promoveu a germinação somente nas sementes de *Cattleya tigrina*.

Dentre os inóculos, a porcentagem de germinação das espécies avaliadas foi superior quando inoculadas por micorrizas do gênero *Epulorhiza* (T1, T2 e W1).

Dos seis inóculos que promoveram a germinação, o inóculo O30 não foi capaz de promover a formação de plântulas em todas as espécies avaliadas. Os inóculos A96 e P66 (*Ceratorhizas*) não promoveram o desenvolvimento de plântulas de *Cattleya tigrina*.

*Cattleya brevicaulis* apresentou maior porcentagem de germinação quando inoculada pelo isolado T1 e desenvolvimento superior de plântulas quando inoculada pelo isolado A96.

*Cattleya tigrina* apresentou maior porcentagem de germinação quando inoculada pelo isolado T1 e desenvolvimento superior de plântulas quando inoculada pelo isolado T2.

*Cattleya labiata* apresentou maior porcentagem de germinação quando inoculada pelo isolado T1 e desenvolvimento superior de plântulas quando inoculada pelo isolado T2.

*Cattleya walkeriana* apresentou maior porcentagem de germinação quando inoculada pelo isolado T2 e desenvolvimento superior de plântulas quando inoculada pelo mesmo isolado. A conservação no banco de sementes de orquídea da UNOSTE foi eficiente para *Cattleya walkeriana*.

*Encyclia cordigera* apresentou maior porcentagem de germinação quando inoculada pelo isolado W1 e desenvolvimento superior de plântulas quando inoculada pelo isolado T2.

*Dendrobium signatum* apresentou maior porcentagem de germinação no cultivo assimbiótico e desenvolvimento superior de plântulas quando inoculada pelo isolado T2.

O teste de germinação não foi o suficiente para determinar a eficácia do fungo micorrízico, visto que, das seis espécies testadas, cinco apresentaram maior desenvolvimento de plântula no inóculo diferente daquele com maior porcentagem de germinação.

O teste de desenvolvimento de plântulas é importante para uma possível reintrodução de espécie em seu habitat natural, pois as plântulas micorrizadas, com, acúmulo de massas, configura-se maiores chances de sobreviver no ambiente natural sob condições de estresse hídrico.



## 8 CONCLUSÕES

Fungos micorrízicos orquidóides foram isolados de plantas cultivadas em ambiente controlado e seus isolados promovem maior interações benéficas para a germinação e para o desenvolvimento de plântulas de *Cattleya walkeriana*, *Cattleya tigrina*, *Cattleya labiata*, *Dendrobium signatum* e *Encyclia cordigera* .

O isolado T2 é um fungo não específico, provavelmente do gênero *Epulorhyza*, e importante para o desenvolvimento de plântulas de orquídeas epífitas em condições simbióticas.

Existem isolados que não agem positivamente na germinação, mas que podem promover melhor desenvolvimento das plântulas.

## REFERÊNCIAS

- ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 691p.
- BECHTEL, H.; CRIBB, P.; LAUNERT, E. **The manual of cultivated orchid species**. 3. ed. Cambridge: The Mit Press, 1992.
- BERTOLINI, V.; DAMON, A.; VELÁSQUEZ, A. N. R. Symbiotic germination of three species of epiphytic orchids susceptible to genetic erosion, from Soconusco (Chiapas, Mexico). **European Journal of Environmental Sciences**, v. 1, p. 60-68, 2011.
- BIDARTONDO, M. I. The evolutionary ecology of mycoheterotrophy. **New Phytologist**, v. 167, p. 335-352, 2005.
- BOLDRINI, R. F. et al. Bases da associação micorrízica orquídoide. **Natureza on line**, v. 8, n. 3, p. 140-145, 2010.
- BONNARDEAUX, Y. et al. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. **Mycological research**, v. 111, n. 1, p. 51-61, 2007.
- CAMERON, D. D. et al. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **Annals of Botany**, v. 99, n. 5, p. 831-834, 2007.
- CAMERON, D. D.; LEAKE, J. R.; READ, D. J. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **New Phytologist**, v. 171, n. 2, p. 405-416, 2006.
- CARVALHO, S. B. G; PEREIRA, M. C. Fungos endofíticos em raízes de *Prosthechea pachysepala* (Orchidaceae) da Serra do Cipó/MG. **Natureza online**, v.15, n.1, p.050-058, 2017.
- CHASE, M.W. et al. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.177, p.151-174, 2015.
- COLLINS, M. et al. Colonisation of jarrah forest bauxite-mine rehabilitation areas by orchid mycorrhizal fungi. **Australian journal of botany**, v. 55, n. 6, p. 653-664, 2007.
- CRUZ, C. D. Programa Genes: **Diversidade genética**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2008. 278p.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 390p, 1994.
- CRUZ-HIGAREDA, J. B.; LUNA-ROSALES, B. S.; BARBA-ALVAREZ, A. A novel seed baiting technique for the epiphytic orchid *rhychostele cervantesii*, a means to

acquire mycorrhizal fungi from protocorms. **Lankesteriana**, v. 15, n. 1, p. 67-76, 2015.

CUNHA, M. F. B. **Associação micorrízica e propagação simbiótica de espécies de *Hadrolaelia* e *Hoffmannseggella* (Orchidaceae)**. 2012. 89f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2012.

CURRAH, R. S. et al. Fungi from orchid mycorrhizas. In: **Orchid biology**. Netherlands: Springer, 1997. p. 117-170.

CURRAH, R. S.; ZELMER, C. 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 (Japan)**, 1992.

CURRAH, R. S.; ZETTLER, L. W.; MCINNIS, T. M. *Epulorhiza inquilina* sp. nov. from *Platanthera* (Orchidaceae) and a key to *Epulorhiza* species. **Mycotaxon**, v. 61, p. 338-342, 1997.

DIXON, K. **Raising terrestrial orchids from seed**. Modern orchid growing for pleasure and profit. Adelaide: Orchid Club of South Australia, 1987. p. 47-100.

ERIKSSON, O.; KAINULAINEN, K. The evolutionary ecology of dust seeds. Perspectives in **Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 13, n. 2, p. 73-87, 2011.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul. Educs, 638p, 2010.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; CARVALHO, J. F. R. P. **Cultivo de orquídeas**. Londrina: Mecenias, 208p, 2010.

FAY, M. F.; CHASE, M. W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21<sup>st</sup> century, **Annals of Botany**, v. 104, n. 3, p. 359-364, 2009.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

**FLORA DO BRASIL 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12077>>. Acesso em: 22 Fev. 2017.

FOLDATS, E. **Flora de Venezuela (Orchidaceae)**. Caracas: Instituto Botánico de Caracas, 1969. v. XV, 550 p.

GALE, S. W. et al. Constraints on establishment in an endangered terrestrial orchid: a comparative study of *in vitro* and *in situ* seed germinability and seedling development in *Nervilia nipponica*. **Botanical journal of the Linnean Society**, v. 163, n. 2, p. 166-180, 2010.

GARCÍA, V.G.; ONCO, M. A. P.; SUSAN, V. R. Review: Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.4, n. 1, p.55-79, 2006.

GOVAERTS, R. et al. World Checklist of Orchidaceae. **Facilitated by the Royal Botanic Gardens**, Kew. Published on the Internet; <http://apps.kew.org/wcsp/qsearch.do> / acessado 14 fev 2017.

HOSOMI, S. T. et al. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 178-189, 2011.

INGROUILLE, M. **Diversities and evolution of land plants**. 3 ed. London: Chapman e Hall. 1995.

KHAMCHATRA, N. et al. Using *in situ* seed baiting technique to isolate and identify endophytic and mycorrhizal fungi from seeds of a threatened epiphytic orchid, *Dendrobium friedericksianum* Rchb. f.(Orchidaceae). **Agriculture and Natural Resources**, v. 50, n. 1, p. 8-13, 2016.

KLEIN, E. H. S. et al. Occurrence of CymMV in orchids of the genus *Arundina* in the State of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 14, n. 2, p. 221-223, 2008.

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

LAVARACK, B., HARRISW., STOCKER, G. **Dendrobium and Its Relatives**. Timber Press, 2000.

LEOPARDI-VERDE, C. L.; CARNEVALI, G.; ROMERO-GONZÁLEZ, G. A. A phylogeny of the genus *Encyclia* (Orchidaceae: Laeliinae), with emphasis on the species of the Northern Hemisphere. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 55, n. 2, p. 110-123, 2017.

LI, D. Z.; PRITCHARD, H. W. The science and economics of *ex situ* plant conservation. **Trends in plant science**, v. 14, n. 11, p. 614-621, 2009.

LINHARES, D. O. **Caracterização morfológica de micorrizas de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* nativas do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (MG)**. 2006. 46f. Tese (Mestrado) -Universidade Federal de Viçosa, UFV. Viçosa. 2006.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas Ornamentais no Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1120p, 2008.

MACHADO-NETO, N. B. M.; CUSTÓDIO, C. C. A medium for non-commercial sowing of orchid seed. **Selbyana**, v. 26, p. 316-317, 2005a.

MACHADO-NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C.C. Orchid conservation through seed banking: Ins and outs. **Selbyana**, v. 26, p. 229-235. 2005b.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. Andrea Jakobsson / Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1100p, 2013.

MCKENDRICK, S. L. et al. Symbiotic germination and development of mycoheterotrophic orchid *Neotia nidusavis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina spp.* **New Phytologist**, v. 154, n. 3, p. 233-47, 2002.

MOLVRAY, M.; KORES, P. J. Character analysis of the seed coat in Spiranthoideae and Orchidoideae, with special reference to the Diurideae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, p. 1443-1454, 1995.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NOGUEIRA, R. E. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de orquídeas**. 2004. 43f. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, UFV. Viçosa. 2004.

NOGUEIRA, R. E. et al. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 3, p. 417-424, 2005.

OTERO, J. T.; ACKERMAN, J. D.; BAYMAN, P. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 8, p. 2393-2404, 2004.

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

PABST, G. F.J.; DUNGS, F. **Orchidaceae brasilienses**. Hildesheim: Brucke-Verlag K. Schmersow 418p.-illus., col. illus.. En, Ge, Por Icones. Geog, v. 4, 1977.

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

PEREIRA, O. L. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécies de orquídeas neotropicais**. 2001. 55f. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, UFV. Viçosa. 2001.

PEREIRA, O. L. et al. Indução in vitro da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 2, p. 199-206, 2005c.

PEREIRA, O. L. et al. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 2, p. 191-197, 2005a.

- PEREIRA, O. L. et al. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. **Canadian Journal of Botany**, v. 83, n. 1, p. 54-65, 2005b.
- PETERSON, R. L.; UETAKE, Y.; ZELMER, C. Fungal symbioses with orchid protocorms. **Symbiosis**, v. 25, n. 1-3, p. 29-55, 1998.
- PHILLIPS, J. M; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British mycological Society**, v. 55, n. 1, p. 158-161, 1970.
- RAFTER, M. et al. Non-specific symbiotic germination of *Cynorkis purpurea*. **Mycorrhiza**, v. 26, n. 6, p. 541-552, 2016.
- RAMÍREZ, M.; NIÑO, S.; BERRÍO, T. Anatomía de la raíz de *Encyclia cordigera* (Kunth) Dressler (ORCHIDACEAE). **Revista Unellez de Ciencia y Tecnología**, v. 34, p. 58-61, 2017.
- RAPOSO, J. G. C. M. F. **A etimologia a serviço dos orquidófilos**. São Paulo: Ave Maria. 308 p, 1993.
- RASMUSSEN, H. N. Methods of studying field germination and seedling physiology: present potential and drawbacks. **European Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 2, p.55-59, 2011.
- RASMUSSEN, H. N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. **Plant and soil**, v. 244, n. 1, p. 149-163, 2002.
- RASMUSSEN, H. N. **Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant**. Cambridge University Press, 1995.
- RASMUSSEN, H. N.; WHIGHAM, D. F. Seed ecology of dust seeds *in situ*: a new study technique and its application in terrestrial orchids. **American Journal of Botany**, p. 1374-1378, 1993.
- REIS, J. N. P. Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar?. In: IX **Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica**, 2011, Brasília. Políticas Públicas e a Perspectiva da Economia Ecológica. Brasília - DF: Sociedade Brasileira de Economia Ecológica. p. 28-29. 2001.
- ROCHA, J. R. **ABC do Orquidófilo**. São Paulo: Agronômica Ceres, 424 p, 2008.
- SEATON, P. T. et al. *Ex situ* conservation of orchids in a warming world. **The botanical review**, v. 76, n. 2, p. 193-203, 2010.
- SEATON, P. T.; HAILES, N. S. J. Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seed. **Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 17-29, 1989.

SEATON, P.T.; PRITCHARD, H. W. Life in the freezer. **Orchids**, v. 77, p.762-773, 2008.

SHIMURA, H. et al. An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae). **Phytochemistry**, v. 68, n. 10, p. 1442-1447, 2007.

SILVA, C. I.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 91-100, 2004.

SINGH, A.; DUGGAL, S. Medicinal orchids-an overview. **Ethnobotanical leaflets**, v. 2009, n. 3, p. 3, 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Instituto Plantarum, 2005.

SUÁREZ GUERRA L, TÉLLEZ BELTRÁN G. *Dendrobium* tropical classic. Nuevo híbrido de orquídea para Cuba. **Cultivos Tropicales**, v. 36, p. 132-132, 2015.

SWANGMANEECHARERN, P.; SERIVICHYASWAT, P.; NONTACHAIYAPOOM, S. Promoting effect of orchid mycorrhizal fungi *Epulorhiza* isolates on seed germination of *Dendrobium* orchids. **Scientia horticultrae**, v. 148, p. 55-58, 2012.

SWARTS, N. D.; DIXON, K. W . Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany**, v. 104, n. 3, p. 543-556, 2009.

TAKANE, R. J.; YANAGISAWA, S. S.; PIVETTA, K. F. L. **Cultivo moderno de orquídeas: Cattleya e seus híbridos**. Fortaleza: UFC, 2010. 179 p.

TAYLOR, D. L. et al. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: **Mycorrhizal ecology**. Springer Berlin Heidelberg, p. 375-413, 2002.

TAYLOR, D. L.; BRUNS, T. D. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza macula* and *C. mertensiana*. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 10, p. 1719-1732, 1999.

THOMPSON, J.N. **The coevolutionary process**. University of Chicago Press, 1994. 387p.

VALADARES, R. B. **Diversidade micorrízica em *Coppensia doniana* (Orchidaceae) e filogenia de fungos micorrízicos associados à subtribo Oncidiinae**. 2009. 94f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Botucatu-SP, 2009.

VALADARES, R. B. et al. Narrow fungal mycorrhizal diversity in a population of the orchid *Coppensia doniana*. **Biotropica**, v. 44, n. 1, p. 114-122, 2012.

VAN DEN BERG, C.; CARNEVALI, G. *Encyclia Hook. Genera orchidacearum*, v. 5, p. 232-236, 2005.

WANG, H. et al. In situ seed baiting techniques in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and *Dendrobium nobile* Lindl.: the endangered Chinese endemic *Dendrobium* (Orchidaceae). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 9, p. 2051-2059, 2011.

WITHNER, C. L. et al. **The *Cattleyas* and their relatives**. Volume VI: The South American *Encyclia* species. Portland: Timber Press, 2000. 194p.

XUE, D. et al. The linkage maps of *Dendrobium* species based on RAPD and SRAP markers. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 37, n. 3, p. 197-204, 2010.

YAM, T. W.; ARDITTI, J.; CAMERON, K. M. The Orchids Have Been a Splendid Sport” - an alternative look at Charles Darwin’s contribution to orchid biology. **American Journal of Botany**, v. 96, 2128–2154, 2009.

ZELMER, C. D.; CURRAH, R. S. *Ceratorhiza pernacatena* and *Epulorhiza calendulina* spp. nov.: mycorrhizal fungi of terrestrial orchids. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p. 1981-1985, 1995.

ZENG, S. et al. Seed biology and in vitro seed germination of *Cypripedium*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 358-371, 2014.

ZETTLER, L. W. et al. Protocorms of an epiphytic orchid (*Epidendrum amphistomum* A. Richard) recovered in situ, and subsequent identification of associated mycorrhizal fungi using molecular markers. **European Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 2, 2011.

ZETTLER, L. W.; BURKHEAD, J. C.; MARSHALL, J. A. Use of a mycorrhizal fungus from *Epidendrum conopseum* to germinate seed of *Encyclia tampensis* in vitro. **LINDLEYANA-WEST Palm Beach**, v. 14, p. 102-105, 1999.

ZI, X. M. et al. In situ seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae). **Mycorrhiza**, v. 24, n. 7, p. 487-499, 2014.



## 9 ANEXO

ANEXO A - Chave dicotômica para classificação de fungos anamorfos associados às raízes de orquídeas: Basidiomycota, adaptado de Currah e Zelmer (1992), Currah et al. (1997) e Currah; Zettler e Mcinnis (1997)

1. Micélio mousse cinzento, cinza esverdeado ou preto.....***Mycelium radics atrovirens*** (ver também ***Phialocephala*** e ***Leptodontidium***)
1. Micélio creme, amarelo, marrom, castanho avermelhado ou roxo avermelhado..... **2**
2. Formação de rizomorfos dentro e sobre o meio de cultura .....***Armillaria*** (ver também ***Xerotus*** e ***Marasmius***)
2. Rizomorfos nunca presentes..... **3**
3. Grampos de conexão ausentes.....**4**
3. Grampos de conexão presentes..... **6**
4. Células individuais das hifas binucleadas..... **5**
4. Células individuais das hifas multinucleadas ..... ***Moniliopsis***
5. Em meio PDA, colônia de cor creme ou branca, crescimento lento e geralmente submersa no meio, frequentemente apresentando-se ceroso ou mucóide, ou se cottonoso, margem de crescimento imerso e muito lento, diâmetro das hifas aéreas pequenas e geralmente < 4 µm..... ***Epulorhiza***
5. Em PDA, colônia de cor creme, amarelada ou marrom, fofo ou floculento, diâmetro de hifas aéreas grandes, geralmente > 4 µm.....***Ceratorhiza***
6. Micélio branco no início e desenvolvendo uma crosta roxa avermelhada de grandes células ..... ***Erythromyces***
6. Micélio branco, marrom claro ou castanho, mas nunca roxo avermelhada..... **7**
7. Células monilíoides presentes com grampos de conexão.....***Sistotrema***
7. Células monilíoides ausentes .....***Melanotus***, ***Marasmius*** e outros (***Fomes*** sp., ***Corticium catonii*** ver também ***Melanotus***)