

Bases da associação micorrízica orquídoide

Bases of the orchidoid mycorrhizal association

Romulo F Boldrini^{1,2}, Wolmen O Santos^{1,3}, Zilma MA Cruz^{1,3,4} e Alessandro C Ramos^{1,3,5}

¹Centro Universitário Vila Velha - UVV. Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Ed. Biomédicas, Boa Vista, 29102-770 Vila Velha, ES, Brasil. ²Graduação em Ciências Biológicas, romulo_fb@hotmail.com; ³Mestrado em Ecologia de Ecossistemas, wolmen_cbiouv@gmail.com; ⁴Professor Titular I, bolsista de Produtividade FUNADESP, zilma@uvv.br; Professor Titular I, bolsista de Produtividade FUNADESP, alessandro.uvv@gmail.com

Resumo A família Orchidaceae é a maior dentre todas as monocotiledôneas. Suas espécies têm despertado alto interesse econômico e científico. Por possuírem sementes diminutas e com poucas reservas, em ambiente natural as orquídeas associam-se simbioticamente com fungos micorrízicos e dependem totalmente destes simbiosites para que tenha condições de germinar e se desenvolver. Estes fungos penetram nas células das raízes e formam estruturas características denominadas pelotons, que fornecem açúcares simples para o embrião. Todas as orquídeas são dependentes de fungos micorrízicos em algum estágio de vida e algumas dependem destes fungos em todos os estágios do ciclo de vida. Estes endossimbiontes fornecem ou potencializam a absorção de nutrientes orgânicos e inorgânicos pelas orquídeas. As micorrizas que se associam às Orchidaceae são do grupo *Rhizoctonia*-like, cujas fases sexuais (teleomorfos) são raramente encontradas no campo ou em laboratório. Deste modo, a taxonomia e sistemática destes fungos são feitas com base nas fases assexuais (anamorfos). Análises moleculares, como o sequenciamento da região ITS, também são empregadas na diferenciação de gêneros e espécies fúngicas. As micorrizas orquídoides também tem sido utilizada em estudos sobre eficiência na promoção da germinação de sementes em laboratório, que podem resultar em programas de reintrodução de espécies ameaçadas.

Palavras-chave: *Rhizoctonia*-like, Orchidaceae, micorrizas orquídoides, simbiose micorrízica.

Abstract The orchid family is the greatest of all monocots. Its species have attracted high economic and scientific interest. Because they have small seeds with few reserves, nature orchids are associated symbiotically with mycorrhizal fungi and totally depend on their symbionts for a position that germinate and develop. These fungi penetrate the root cells and form characteristic structures called

pelotons that provide simple sugars to the embryo. All orchids are dependent on mycorrhizal fungi in some life stage and some rely on these fungi at all life cycle stages. These endosymbionts provide or potentiate the absorption of organic and inorganic nutrients by orchids. The mycorrhizal fungi that are associated to the Orchidaceae are *Rhizoctonia*-like group whose sexual stage (teleomorph) are rarely found in field or laboratory. Thus, the fungi taxonomy and systematics are made on the basis of asexual stages (anamorphs). Molecular analysis, such as sequencing the ITS region, are also employed in the genera and fungal species differentiation. The orchid mycorrhizae has also been used in studies of efficiency in the seed germination promotion in the laboratory, which can result in reintroduction programs for endangered species.

Keywords: *Rhizoctonia*-like, Orchidaceae, orchid mycorrhizae, mycorrhizal symbiosis.

Introdução

Orchidaceae é a maior família de Monocotiledôneas do mundo e estima-se que tenha entre 17.000 e 30.000 espécies em 980 gêneros (Pabst e Dungs 1975, Pabst e Dungs 1977, Giulietti *et al.* 2005). A família possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em todos os continentes, ocorrendo em campos, desertos e em várias fitofisionomias distintas, desde o nível do mar até acima de 4.500 metros (Pereira e Ribeiro 2004).

Apresentam maior diversidade nas regiões tropicais, concentrando-se nas áreas de montanhas com maior umidade, especialmente nos trópicos americanos e Sudeste asiático (Van Den Berg e Azevedo 2005). Nos trópicos há um predomínio das formas epífitas e rupícolas,

enquanto que nas regiões fora dos trópicos predominam as terrestres (Joly 2002). Acredita-se que a família Orchidaceae foi submetida a uma rápida especiação e diversificação, possibilitando a ocupação desta vasta gama de habitats (Smith e Read 1997).

As orquídeas têm atraído a atenção de muitos cientistas, floricultores e produtores amadores, pela sua diversidade de cores e formas florais e seus mecanismos de polinização especializados. Estão entre as plantas mais apreciadas e com alto valor comercial, sendo cultivadas como plantas ornamentais para a indústria de floricultura, com seus híbridos de flores vistosas, e de alimentos, como as do gênero *Vanilla* de cujos frutos e sementes extraem-se matéria prima para o aromatizante alimentício natural conhecido como baunilha (Joly 2002, Peterson *et al.* 2004, Raven *et al.* 2007).

Na produção comercial, as plantas são submetidas a uma técnica que induz divisões do tecido meristemático, produzindo uma infinidade de clones de forma rápida e eficiente. Cerca de 60.000 híbridos de orquídeas já foram registrados, geralmente envolvendo dois ou mais gêneros (Raven *et al.* 2007).

No Brasil, que detém o terceiro lugar em número de espécies de orquídeas, atrás apenas da Colômbia e do Equador, foram reportadas 2.650 espécies, agrupadas em 205 gêneros. Vale ressaltar que o endemismo das Orchidaceae brasileiras é expressivo, com 35 gêneros e 1.800 espécies (Giulietti *et al.* 2005). Nos gêneros que ocorrem no Brasil, se destacam como de maior valor ornamental: *Cattleya*, *Laelia*, *Epidendrum*, *Miltonia*, *Oncidium* (chuva de ouro), *Brassavola* (rabo de rato), *Cyrtopodium* (rabo de tatu), *Catasetum*, *Stanbopea*, *Habenaria* e *Pleurothallis*. Há também gêneros introduzidas que merecem um grande destaque. Dentre eles se sobressaem *Dendrobium*, *Vanda*, *Paphiopedilum*, *Aerides*, *Cymbidium* e *Odontoglossum* (Joly 2002). Vale ressaltar que o gênero *Phalaenopsis* e seus híbridos também são de grande representatividade no mercado de flores mundialmente (Park *et al.* 2002).

Morfológicamente, esta família apresenta grande diversidade tanto vegetativa quanto reprodutiva, porém apresenta características florais singulares bastante conservadas. As flores possuem simetria bilateral, com uma das pétalas modificada e geralmente maior e com coloração mais intensa, em taça com forma de lábio, denominada labelo. Outra característica distintiva das Orchidaceae é a coluna, que é a fusão de um único estame com estilete e estigma. Além disso, a polínia, que se entende como a congregação de todo o conteúdo de uma antera, mantido como uma unidade, também é presente em todas as espécies (Joly 2002, Van Den Berg e Azevedo 2005, Raven *et al.* 2007, Machado 2008).

As Orchidaceae são caracterizadas como plantas herbáceas, perenes, nunca lenhosas, com espécies de hábito epífita, terrestre (humícola) e rupícola (litófito). Algumas são saprófitas, e neste caso, aclorofiladas. Geralmente apresentam rizomas e podem ser caulescentes, algumas vezes com caules escandentes ou até mesmo acaules. As raízes são fasciculadas, e as epífitas apresentam velame e raízes aéreas. Dos caules intumescidos ou dos pecíolos das folhas se originam frequentemente os pseudobulbos. As folhas são geralmente

suculentas, mas altamente variáveis na forma e consistência. As flores são compostas por três sépalas: uma dorsal superior e duas inferiores. Possuem duas pétalas iguais e uma modificada em forma de labelo (Joly 2002, Raven *et al.* 2007, Machado 2008).

As sementes das plantas da família Orchidaceae variam em morfologia, tamanho, estruturas, cores e outros detalhes. Geralmente as sementes de orquídeas são diminutas, também chamadas de *dust seeds*, com tamanho médio que varia entre 300 e 800 μm , porém esta faixa de variação pode ser de 150 a 6.000 μm (Molvray e Kores 1995). As células do embrião contêm poucas reservas de lipídios e proteínas que não são suficientes a ponto de serem metabolizadas para o desenvolvimento do embrião e a infecção e colonização por um fungo micorrízico compatível no habitat é obrigatória para fornecer os carboidratos simples necessários à germinação para o início do desenvolvimento e nutrição das plântulas sobre o substrato. Estes fungos são imprescindíveis para que as espécies possam se estabelecer e completar seu ciclo de vida (Smith e Read 1997, Rasmussen 2002, Peterson *et al.* 2004, Rasmussen e Rasmussen 2007).

Três são as formas de infecção que podem ocorrer em uma semente de orquídea, por hifas de fungo compatível: por pêlos epidérmicos (ou rizóides) ou atravessando a testa da semente, pela micropila ou por fendas no tegumento. Após entrar na semente, a hifa se desloca por atração ao suspensor e enovela-se formando os pelotons dentro do embrião. Esta entrada de hifas no embrião e em células do protocórmio provoca uma série de eventos como o aumento do volume nuclear, alterações no citoesqueleto e o desencadeamento de vários ciclos de síntese de DNA na célula hospedeira. O peloton separa-se da célula hospedeira por uma modificação da membrana plasmática vegetal, denominada membrana perifúngica (Peterson *et al.* 2004).

Após sucessivas divisões celulares, o embrião cresce e aumenta em volume, originando o protocórmio. Hifas de diâmetro reduzido, se comparadas às do peloton, passam de célula a célula pela produção de enzimas hidrolíticas, que tem capacidade de degradar áreas da parede celular (Peterson *et al.* 2004). Após a formação do protocórmio, os primeiros pelotons formados passam pelo processo de degradação. Para permitir a prevenção de danos ao citoplasma do hospedeiro, as hifas do peloton que sofreram lise são isoladas por constituintes da parede sintetizados pela própria célula hospedeira. Assim, a célula vegetal pode ser colonizada mais de uma vez pelas hifas dos fungos (Smith e Read 1997, Peterson *et al.* 2004).

Fungos Micorrízicos Orquídeas

As evidências pioneiras sobre as micorrizas datam de 1840, porém somente em 1885 o botânico alemão Albert Bernard Frank propôs inicialmente o termo micorrizas, denominando-as como a associação simbiótica mutualista e não patogênica entre raízes de plantas e fungos específicos. Anteriormente em 1879, o termo simbiose foi introduzido por Anton de Bary, que as descreveu

referindo-se a organismos vivendo juntos em seu sentido amplo, englobando desde o mutualismo ao parasitismo (Harrison 1998). Wahrlich (1886) e Janse (1897) notaram pela primeira vez a ocorrência de fungos micorrízicos nas raízes das orquídeas tropicais e de regiões temperadas (Zhu *et al.* 2008).

Dentre as simbioses que ocorrem entre plantas e microorganismos, a formação de micorrizas é a mais comum (Trappe 1987). Existem três tipos de micorrizas: endomicorrizas, ectomicorrizas e ectendomicorrizas. As endomicorrizas caracterizam-se pelo crescimento intra e intercelular no córtex da raiz e os tipos mais representativos são as arbusculares, ericóides e orquidóides. Ectomicorrizas caracterizam-se pelo crescimento intercelular (rede de Hartig), desenvolvendo um manto de hifas externas no entorno das raízes. As ectendomicorrizas também penetram nas células do córtex e formam a rede de Hartig (Allen 1991).

As micorrizas orquidóides apresentam como característica distintiva, hifas que penetram nas raízes e formam estruturas, emaranhadas e elaboradas, denominadas pelotons, dentro das células do córtex das raízes. Estes pelotons, quando digeridos, provêm açúcares simples para o embrião (Rasmussen 2002). Além das raízes, os endófitos micorrízicos também já foram encontrados nos protocórmios de orquídeas, que são formados após a germinação de sementes de orquídeas e são incapazes de produzir carbono (Masuhara e Katsuya 1994, Zelmer *et al.* 1996, Hayakawa *et al.* 1999, Kristiansen *et al.* 2001, Zettler *et al.* 2005). Algumas plantas jovens e adultos aclorofilados também não são capazes de produzir carbono, dependendo do fungo para provê-lo, ou seja, todas as Orchidaceae tem uma fase micoheterotrófica. Por isso há dificuldade das orquídeas se propagarem em meio selvagem (Zhu *et al.* 2008).

Uma importante função das micorrizas orquidóides é a de fornecer ou potencializar a absorção de nutrientes orgânicos e inorgânicos pelas orquídeas (Smith e Read 1997, Dearnaley 2007). Um exemplo é o trabalho de Trudell *et al.* (2003), que mostra o fornecimento de carbono e nitrogênio pelos fungos micorrízicos. Há ainda pesquisas que demonstram o fornecimento de fósforo (Cameron *et al.* 2007) e de água para permitir a germinação e o desenvolvimento do protocórmio destas plantas (Yoder *et al.* 2000).

Fungos Rizoctonióides

Os basidiomicetos do gênero *Rhizoctonia* são considerados como um grupo de fungos filamentosos que apresenta certa heterogeneidade em seus táxons. Não produzem esporos assexuados e em seu estado anamórfico, compartilham de um número de características peculiares. Geralmente os integrantes deste táxon são fungos de solo, distribuídos mundialmente, associados principalmente às raízes e apresentando na maioria das vezes algum grau de patogenicidade. Porém, há uma gama de fungos que são saprófitas e outros são simbioses, como os que formam micorrizas

associados às espécies da família Orchidaceae (Garcia *et al.* 2006).

As micorrizas mais representativas associadas às Orchidaceae são do grupo *Rhizoctonia*-like e se caracterizam por características como: ramificações em ângulo reto, uma constricção na hifa ramificada próximo ao ponto de origem, septo próximo ao ponto da ramificação, formação de escleródios e septo dolipórico complexo. Geralmente, apresentam cadeias (seqüências) de hifas infladas, intumescidas, em formato arredondado, como um barril, conhecidas como células monilióides. (Otero *et al.* 2002, Garcia *et al.* 2006).

As fases sexuais (teleomorfos) são raramente encontradas no campo ou em laboratório e conseqüentemente, a sistemática e taxonomia destes fungos é feita com base nas fases assexuais, ou seja, em seus estados anamorfos (Otero *et al.* 2002).

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

As culturas puras com base em isolamentos de raízes de orquídeas têm até o momento sido a principal fonte de informação sobre os endófitos simbioses. Estes fungos simbioses são basidiomicetos e os que geralmente são isolados são de espécies que não dispõem de conidiogênese na fase assexuada, ou seja, apresentam micélio estéril, com uma pequena tendência a esporular na cultura (Rasmussen 2002). Desta forma, a taxonomia das micorrizas rizoctonióides é difícil a nível de espécie, pelas características morfológicas a seres estudadas. Para tal, a técnica de grupos de anastomose (AG) vem sendo utilizada extensivamente para identificação de *Rhizoctonia*, e cada AG é conhecido pela especificidade em sua variedade de hospedeiros. Cada AG é geneticamente distinto e tem facilitado a identificação dos fungos a nível de espécie e subespécie. Esta técnica é almejada para dar melhor compreensão da relação simbiótica entre micorrizas e orquídeas (Hayakawa *et al.* 1999).

Com os demais avanços em estudos envolvendo biologia molecular, também é possível descrever micorrizas orquidóides por métodos, como os utilizados no seqüenciamento e análise da região intergênica ITS (Internal Transcribed Spacer) (Otero *et al.* 2002, Garcia *et al.* 2006). Para isso, utiliza-se a técnica PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism). Amplifica-se seqüências de regiões ribossomais altamente variáveis (ITS) e os padrões de bandeamento são comparados. Assim, os comprimentos de polimorfismos dos fragmentos de restrição podem ser comparados com os de outros

fungos de características já conhecidas (Taylor e Bruns 1999, Shefferson *et al.* 2005, Shefferson *et al.* 2007).

As pesquisas com fungos micorrízicos rizoctonióides associados a orquídeas, também tem contemplado o potencial de germinação de sementes de orquídeas por fungos compatíveis. Exemplo é o trabalho de Zettler e Hofer (1998), nos Estados Unidos, que obtiveram resultados satisfatórios na germinação de sementes de *Platanthera clavellata* por fungos do gênero *Epulorbiza*. No Brasil, Pereira *et al.* (2005) promoveram a germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* com fungos rizoctonióides do gênero *Ceratorbiza*. Neste caso o fungo se associou simbioticamente e se mostrou eficiente na germinação, porém em alguns casos foi notada fitopatogenicidade, causando em alguns casos, podridão em protocórmios. Estes estudos são de grande valia para empregar tais conhecimentos em programas de reintrodução de espécies ameaçadas e para conhecer os verdadeiros papéis ecológicos destes fungos, plantas e suas associações.

No Brasil, os a maioria estudos acerca das micorrizas

orquidóides tem-se concentrado em espécies epífitas de orquídeas, principalmente da subtribo Oncidiinae e do gênero *Epidendrum*, e grande parte dos isolados tem sido identificados como *Ceratorbiza* e *Epulorbiza*. (Tabela 1). Desta forma, é fundamental que se conheçam quais são e como se caracterizam as micorrizas orquidóides, para que se possa avaliar o seu potencial de germinação de sementes, com vistas à reintrodução de espécies ameaçadas e altamente coletadas, como é o caso de várias espécies brasileiras. Atualmente, grande parte das orquídeas é reproduzida em meio assimbiótico, sem seu fungo micorrízico específico e isso impede a reintrodução eficaz, não garantindo a germinação de sementes e o estabelecimento das plântulas na natureza. Outro ponto importante é a falta de estudos realizados com espécies de orquídeas em vários estados do Brasil, principalmente com as espécies endêmicas. O conhecimento taxonômico destes fungos ainda é muito incipiente a nível nacional.

Tabela 1 Resumo dos endófitos micorrízicos identificados em orquídeas no Brasil.

Fonte	Espécies de orquídeas	Táxon micorrízico
Pereira <i>et al.</i> (2003)	<i>Epidendrum rigidum</i> Jacq.	<i>Epulorbiza epiphytica</i>
	<i>Polystachya concreta</i> (Jacq.) Garay e Sweet	<i>Epulorbiza epiphytica</i>
Pereira <i>et al.</i> (2005a)	<i>Epidendrum rigidum</i> Jacq.	<i>Epulorbiza</i>
	<i>Isochilus linearis</i> (Jacq.) R.Br.	<i>Ceratorbiza</i>
	<i>Maxillaria marginata</i> Fenzl.	<i>Ceratorbiza</i>
	<i>Oeceoclades maculata</i> (Lindl.) Lindl.	<i>Epulorbiza</i>
	<i>Oncidium flexuosum</i> (Kunth) Lindl.	<i>Ceratorbiza</i>
	<i>Oncidium varicosum</i> Lindl. e Paxton	<i>Ceratorbiza</i>
	<i>Polystachya concreta</i> (Jacq.) Garay e Sweet	<i>Epulorbiza</i>
Pereira <i>et al.</i> (2005b)	<i>Gomesa crispa</i> (Lindl.) Kl. e Rchb. f.	<i>Rhizoctonia</i>
	<i>Campylocentrum organense</i> (Rchb.f.) Rolfe	<i>Ceratorbiza</i>
	<i>Bulbophyllum</i> sp.	<i>Ceratorbiza</i>
Nogueira <i>et al.</i> (2005)	<i>Bulbophyllum weddelii</i> (Lindl.) Rchb. f.	<i>Ceratorbiza</i>
	<i>Epidendrum dendrobioides</i> Thunb.	<i>Epulorbiza</i>
	<i>Maxillaria acicularis</i> Herb. ex Lindl.	<i>Rhizoctonia</i>
	<i>Oncidium gracile</i> Lindl.	<i>Ceratorbiza</i>
	<i>Pleurothallis Teres</i> Lindl.	<i>Ceratorbiza</i>
	<i>Prostbechea vespa</i> (Vell.) W.E. Higgins	<i>Ceratorbiza</i>
	<i>Sophronitis milleri</i> (Blumensch. ex Pabst)	<i>Epulorbiza</i>
<i>Sarcoglottis</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i>	
Valadares <i>et al.</i> (2008)	<i>Gomesa</i> sp.	<i>Ceratorbiza</i>
		<i>Rhizoctonia</i>
Pereira <i>et al.</i> (2009)	<i>Epidendrum secundum</i> Jacq.	<i>Epulorbiza</i>

Agradecimentos

Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB) do Centro Universitário Vila Velha (UVV) pelo apoio à pesquisa e por disponibilizar a estrutura para o desenvolvimento do trabalho. À FAPES pela bolsa de Mestrado de Wolmen O. Santos. O Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia é suportado com recursos dos projetos universais FAPES/45434484/09 e CNPq/475436/2010-5 e também FUNADESP 07/2010.

Referências

- Allen MF (1991) **The ecology of mycorrhizae**. Cambridge: Cambridge University Press.
- Cameron DD, Johnson I, Leake JR, Read DJ (2007) Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **Annals of Botany** 99: 831-834.
- Currah RS, Zelmer CD (1992) A key and notes for the genera of fungi mycorrhizal with orchids and a new species in the genus *Epulorbiza*. **Reports of the Tottori Mycological Institute** 30: 43-59.
- Dearnaley J (2007) Further advances in orchid mycorrhizal research. **Mycorrhiza** 17: 475-486.
- Garcia VG, Onco MAP, Susan VR (2006) Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of Agricultural Research** 4: 55-79.
- Giulietti AM, Harley RM, Queiroz LP, Wanderley MGL, Van Den Berg C (2005) Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology** 19: 632-639.
- Harrison MJ (1998) Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology** 4: 360-365.
- Hayakawa S, Uetake Y, Ogoshi A (1999) Identification of symbiotic *Rhizoctonias* from naturally occurring protocorms and roots of *Dactylorhiza aristata*. **Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University** 69: 129-141.
- Joly AB (2002) **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional.
- Kristiansen KA, Rasmussen FN, Rasmussen HN (2001) Seedlings of *Neuwiedia* (Orchidaceae: subfamily Apostasioideae) have typical orchidaceous mycotrophic protocorms. **American Journal of Botany** 88: 956-959.
- Machado EF (2008) **História do patrimônio natural do Espírito Santo: Orquídeas**: livro documental. Rio de Janeiro: Documenta Histórica.
- Masuhara G, Katsuya K (2004) *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). **New Phytologist** 127: 711-718.
- Molvray M, Kores JP (1995) Character analysis of the seed coat in *Spiranthoideae* with special reference to the *Diurideae* (Orchidaceae). **American Journal of Botany** 82: 1443-1453.
- Moore RT (1987) The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorbihizoctonia*, *Ceratorbiza* gen. nov., *Epulorbiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. **Mycotaxon** 29: 91-99.
- Nogueira RE, Pereira OL, Kasuya MCM, Lanna MCS, Mendonça MP (2005) Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 19: 417-424.
- Otero JT, Ackerman JD, Bayman P (2002) Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. **American Journal of Botany** 89: 1852-1858.
- Pabst GFJ, Dungs F (1975) **Orchidaceae Brasilienses I**. Hildesheim: Kurt Schmiersow.
- Pabst GFJ, Dungs F (1977) **Orchidaceae Brasilienses II**. Hildesheim: Kurt Schmiersow.
- Park S, Murthy HN, Paek K (2002) Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. In **Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant** 36: 168-172.
- Pereira MC, Pereira OL, Costa MD, Rocha RB, Kasuya MCM (2009) Diversidade de fungos micorrízicos *Epulorbiza* spp. isolados de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciências do Solo** 33: 1187-1197.
- Pereira OL, Kasuya MCM, Borges AC, de Araujo EF (2005a) Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. **Canadian Journal of Botany** 83: 54-65
- Pereira OL, Kasuya MCM, Rollemberg CL, CHAER GM (2005b) Isolamento e identificação de fungos micorrízicos associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** 29: 191-197.
- Pereira OL, Rollemberg CL, Borges AC, Matsuoka K, Kasuya MCM (2003) *Epulorbiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. **Mycoscience** 44: 153-155
- Pereira UZ, Ribeiro LF (2004) Caracterização de comunidades de Orchidaceae em fragmentos de Floresta Ombrófila Densa Montana, em diferentes estágios de regeneração em Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line** 2(2): 52-60.
- Peterson RL, Massicote HB, Melville LH (2004) **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. Ottawa: NRC Research Press.
- Rasmussen HN, Rasmussen FN (2007) Trophic relationships in orchid mycorrhiza – diversity and implications for conservation. **Lankesteriana** 7: 334-341.
- Rasmussen HN (2002) Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. **Plant and Soil** 244: 149-163.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (2007) **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Shefferson RP, Taylor DL, Wei M, Garnica S, McCormick MK, Adams S, Gray HM, McFarland JW, Kull T, Talli K, Yukawa T, Kawahara T, Miyoshi K, Lee Y (2007) The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. **Evolution** 61: 1380-1390.
- Shefferson RP, Wei M, Kull T, Taylor DL (2005) High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. **Molecular Ecology** 14: 613-626.
- Smith SE, Read DJ (1997) **Mycorrhizal symbiosis**. Cambridge: Academic Press.
- Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (1999) **Principles and applications of the soil microbiology**. New Jersey: Prentice Hall.
- Taylor DL, Bruns TD (1999) Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. **Molecular Ecology** 8: 1719-1732.
- Trappe JM (1987) Phylogenetic and Ecologic aspects of in the Angiosperms from na evolutionary standpoint. In: Safir GR (org) **Ecophysiology of mycorrhizal plants**. Boca Raton, pp 5-25.
- Trudell SA, Rygiel PT, Edmonds RL (2003) Nitrogen and carbon stable isotope

- abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. **New Phytologist** 160: 391-401.
- Valadares RBS, Pereira MC, Kasuya MCM, Cardoso EJBN (2008) Isolamento e identificação de fungos micorrízicos de *Gomeza* sp. (Orchidaceae) em uma floresta de araucária do estado de São Paulo. **Fertbio** [online] http://www.biota.org.br/publi/banco/docs/18220_1219064892.pdf
- Van Den Berg C, Azevedo CO (2005) Orquídeas. In: Juncá F, Funch LS, Rocha W (org) **Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, pp 195-208.
- Yoder JA, Zettler LW, Stewart SL (2000) Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. **Plant Science** 156: 145-150.
- Zelmer CD, Cuthbertson L, Currah RS (1996) Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. **Mycoscience** 37: 439-448.
- Zettler LW, Hofer CJ (1998) Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. **Environmental and Experimental Botany** 39: 189-195.
- Zettler LW, Piskin KA, Stewart SL, Hartsock JJ, Bowles ML, Bell TJ (2005) Protocorm mycobionts of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nutt.) Lindley and a technique to prompt leaf elongation in seedlings. **Studies in Mycology** 53: 163-171.
- Zhu GS, Yu ZN, Gui Y, Liu ZY (2008) A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi. **Fungal Diversity** 33: 123-137.