

Fungos endofíticos em raízes de *Prosthechea pachysepala* (Orchidaceae) da Serra do Cipó/MG

Endophytic fungi in the roots of *Prosthechea pachysepala* (Orchidaceae) in “Serra do Cipó”/MG

Samira B. G. De Carvalho¹, Marlon C. Pereira^{1*}

1 Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba, MG230, Km 7, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba, MG, Brazil.

*Autor para correspondência: marlon.pereira@ufv.br

Resumo A família Orchidaceae é uma das maiores famílias de plantas e é encontrada em quase todo o planeta. Quanto ao hábito as orquídeas podem ser epífitas, rupícolas, terrestres ou, em alguns casos, uma combinação disso. Nos trópicos há predomínio das formas epífitas e rupícolas. *Prosthechea* sp. é endêmica do Brasil e a espécie *Prosthechea pachysepala* é encontrada nas formas epífita e rupícola. As orquídeas associam-se a fungos micorrízicos para a germinação da semente e nutrição do embrião durante o desenvolvimento. Fungos endofíticos vivem no interior das plantas sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros, e podem ajudar indiretamente em seu crescimento. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a colonização micorrízica e avaliar a diversidade morfológica de fungos endofíticos isolados de raízes de *P. pachysepala* com hábito epífita. Para este trabalho foram coletados apenas indivíduos epifíticos em uma área de afloramento rochoso localizada no Parque Nacional da Serra do Cipó/ MG. Foram observados *pelotons* intactos e degradados em todo seu sistema radicular. A presença de *pelotons* confirma a presença de fungo micorrízico compatível no substrato, e a sua degradação sugere a utilização da estrutura fúngica como

fonte de nutriente. Dezenove fungos foram isolados das raízes e caracterizados com base em suas características morfológicas quantitativas e qualitativas. As características morfológicas qualitativas foram utilizadas para agrupar os isolados pela técnica UPGMA (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Averages) em onze morfotipos. A avaliação cultural foi útil para estabelecer os morfotipos. A análise dos dados quantitativos utilizando a distância Generalizada de Mahalanobis e o método UPGMA indicou variabilidade entre os isolados. Isso sugere grande diversidade de fungos endofíticos associados a *P. pachysepala*.

Palavras-chave: micorriza, ecologia microbiana, rizotonioides.

Abstract Orchidaceae is one of the largest plant families and is found all over the planet. About the habit they can be epiphytes, rupicolous, terrestrial or, in some cases, a combination thereof. In the tropics, there is a predominance of epiphytes and rupicolous forms. *Prosthechea* sp. is endemic to Brazil and the species *Prosthechea pachysepala* occurs as epiphytes and rupicolous forms. The orchids are associated

with mycorrhizal fungi for seed germination and embryo nourishment during development. Endophytic fungi live inside the plants dwelling without causing any apparent damage to their hosts, and can indirectly help in their growth. This study aimed to characterize mycorrhiza colonization and evaluate morphological diversity of endophytic fungi isolated from the roots of *P. pachysepala*. For this study we collected only individuals epiphytic on a rocky outcrop located in the “Serra do Cipó” National Park/ MG. Intact and degraded pelotons were found throughout the whole orchid root system. The presence of *pelotons* confirms the presence of compatible mycorrhizal fungi, and their degradation suggests their use as nutrient source. Nineteen fungi were isolated from the roots and characterized based on their quantitative and qualitative morphological characteristics. The qualitative morphological characteristics permitted to group the isolates by UPGMA technique (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Averages) into eleven morphotypes. Indeed, the cultural features were helpful to establish the morphotypes. The analysis of quantitative data using the generalized Mahalanobis distance and the UPGMA method indicated variability among isolates. These results suggest high diversity among endophytic fungi of *P. pachysepala*.

Keywords: mycorrhiza, microbial ecology, Rhizoctonia-like.

Introdução

A família Orchidaceae é uma das maiores famílias de plantas, com aproximadamente 25.000 espécies (Jones 2006). Suas espécies têm despertado alto interesse econômico e científico, devido a seu potencial ornamental, mecanismos de polinização especializados, particularidades para germinação e algumas podem ser utilizadas na indústria alimentícia (Dearnaley et al. 2012; Smith e Read 1997). É uma família cosmopolita e acredita-se que tenha passado por uma rápida diversificação e especiação, com membros encontrados em uma vasta gama de habitats de florestas tropicais até desertos (Smith e Read 1997).

Quanto ao hábito, podem ser epífitas (crescem em plantas), rupícolas (crescem em rochas), terrestres ou, em alguns casos, uma combinação disso (Bayman e Otero 2006). Nos trópicos há um predomínio das

formas epífitas e rupícolas, enquanto que nas regiões fora dos trópicos predominam as terrestres (Joly 2002).

Uma característica comum das diferentes espécies de orquídea é a produção de sementes pequenas e sem tecido de reserva, não possuindo autonomia para germinar (Rasmussen 2002; Peterson et al. 2004). Desta forma, na natureza, as orquídeas associam-se obrigatoriamente a fungos micorrízicos para a germinação da semente e nutrição do embrião durante o desenvolvimento (Peterson et al. 2004).

Os fungos micorrízicos que se associam às Orchidaceae são do grupo Rhizoctonia (Dearnaley et al. 2012). A fase sexual (teleomorfos) desses fungos é raramente observada no campo e pode ser induzida em laboratório; deste modo, a taxonomia de muitos desses fungos é feita com base nas fases assexuais (anamorfos) (Stalpers e Andersen 1996; Boldrini et al. 2010).

Os fungos micorrízicos de orquídeas penetram nas células das raízes e formam estruturas características denominadas *pelotons* (enovelados de hifas), que fornecem açúcares simples para o embrião a partir de sua digestão (Peterson et al. 2004). Todas as orquídeas são dependentes de fungos micorrízicos em algum estágio de vida e outros dependem desses fungos em todos os estágios do ciclo de vida (Rasmussen 2002; Bayman e Otero 2006; Boldrini et al. 2010). Estudos de micorrizas de orquídeas têm mostrado que algumas plantas não clorofiladas obtêm carbono e nutrientes a partir de fungos ectomicorrízicos ou saprófagos durante todo o ciclo de vida, e algumas orquídeas clorofiladas são parcialmente heterotróficas quando adultas (Dearnaley et al. 2012). Pesquisas têm esclarecido a natureza das associações micorrízicas de orquídeas autotróficas, confirmando que a associação pode ser mutualística (Cameron et al. 2006).

Microorganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas habitando, de modo geral, raízes e parte aérea, como folhas e caules, sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros (Azevedo 1998). Com base nesta classificação, os fungos micorrízicos são considerados endófitos das raízes das orquídeas. Contudo, outros fungos não micorrízicos são isolados de raízes após desinfestação superficial, os quais podem auxiliar, de forma indireta, no crescimento da orquídea (Bayman e Otero 2006).

A observação dos *pelotons* nas raízes de or-

quídeas amostradas em campo possibilita verificar a presença do fungo micorrízico (Peterson et al. 2004). Mas após o isolamento, o potencial micorrízico deveria ser confirmado em testes de germinação e/ou inoculação de plantas adultas, seguido da confirmação anatômica da presença dos *pelotons*. Entretanto, o tempo requerido para essa confirmação seria grande. Desta forma, os trabalhos de diversidade usam critérios taxonômicos para definir os possíveis fungos micorrízicos, sendo os isolados de do grupo Rhizoctonia considerados os potenciais micorrízicos (Dearnaley et al. 2012). Para isso os isolados podem ser identificados morfológicamente, utilizando algumas características morfológicas do micélio vegetativo, tais como presença de septo, ramificação em 90°, constrição na base da ramificação e formação de células monilióides (Stalpers e Andersen 1996), ou molecularmente, com base na sequência da região ITS do rDNA (Pereira et al. 2009; 2014; Valadares et al. 2012; 2014).

Prosthechea pachysepala é encontrada com o hábito rupícola, em uma altitude de 800 a 1000 m nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (Chiron & Castro Neto, 2003). Na Serra do Cipó, Minas Gerais, são encontradas com o hábito de epífita (Barbero 2007), crescendo sobre indivíduos de *Vellozia piresiana* (Werneck e Espírito 2002) e *Vellozia gigantea* (Miranda 2014).

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar a colonização micorrízica e avaliar a diversidade morfológica de fungos endofíticos isolados de raízes de *P. pachysepala* com hábito epífita.

Materiais e Métodos

Local

As coletas foram realizadas em área de Cerrado no Parque Nacional da Serra do Cipó, no mês de setembro em período de seca. A Serra do Cipó está localizada na porção sul da Cadeia do Espinhaço no estado de Minas Gerais, Brasil (Santos et al. 2011). No Parque Nacional da Serra do Cipó é encontrada uma área de campo rupestre conhecida como área das *V. piresiana* L.B.Sm., onde foi feita a coleta.

Coleta

Foram coletados segmentos de raiz de cinco indivíduos de *P. pachysepala* (Klotzsch) Chiron & V.P. Castro crescendo sobre diferentes plantas de *V. piresiana*. A coleta foi feita manualmente e com au-

xílio de canivete quando necessário, mas de forma a não provocar a morte das plantas amostradas. Quando a planta apresentava pequeno porte ou raízes muito finas, o indivíduo foi coletado por inteiro, garantindo a qualidade das raízes até que fosse realizado o isolamento dos fungos micorrízicos em laboratório. Somente raízes que apresentaram aspecto saudável foram coletadas. As raízes e indivíduos coletados foram embalados em sacos plásticos, devidamente identificados e transportados para o Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Federal de Viçosa *Campus* Rio Paranaíba (UFV-CRP).

Avaliação da colonização

Para o estudo da associação micorrízica, as raízes foram fixadas em FAA (formaldeído: ácido acético: álcool etílico 1:1:18), e estocadas em álcool 70%. Foram selecionados, ao acaso, três fragmentos das raízes de cada indivíduo com 2cm de comprimento e, a partir desse foram obtidos o máximo de cortes transversais a mão livre, com o auxílio de uma lâmina de barbear e com o apoio do pecíolo de embaúba (Santos 2015). Os 30 melhores cortes das três repetições de cada espécie foram selecionados e clarificados, corados com “Safranblau” e as lâminas foram montadas em gelatina glicerinada, com 5 a 10 cortes cada (Kraus e Arduin 1997). O material para confecção das lâminas foi fornecido pelo Laboratório de Anatomia Vegetal. Para quantificar a colonização endofítica, quanto à presença de *pelotons* em células do córtex, cada lâmina preparada foi examinada em microscópio de luz Olympus BX41. Na avaliação desses dados utilizou-se a metodologia sugerida por Trouvelot et al. (1986), no qual foi realizada a quantificação de frequência de colonização (F%): $F\% = (\text{Número de fragmentos colonizados} / \text{Número total de fragmentos}) \times 100$.

Isolamento dos fungos micorrízicos

Em laboratório, foi realizado o isolamento dos fungos micorrízicos a partir de fragmentos de raízes com a presença de *pelotons*, conforme descrito por Pereira et al. (2009). Para isso, em câmara de fluxo laminar, as raízes foram desinfestadas superficialmente em álcool 70 % por 1 min e em solução de água sanitária (aproximadamente 1 % de cloro ativo), lavadas em água estéril e fragmentadas transversalmente sob microscópio estereoscópio. Após a confirmação da colonização, uma porção do córtex contendo *pelotons* foi retirada do fragmento e trans-

Tabela 1 Dados qualitativos dos fungos endofíticos de *P. pachysepala* após 96h de cultivo

M'	Código	Cor Frente	Cor Verso	Micélio Aéreo	Aspecto	Esporulação	Crescimento Uniforme	Borda Translúcida
1'	PR12-5E PR13-3B PR13-4D PR16-3A	Branco	Centro creme e contorno branco	Não	Aveludado	Sim	Não	Sim
2'	PR15-5C	Centro verde musgo e contorno branco	Centro creme e contorno branco	Não	Centro empoeirado e contorno aveludado	Sim	Não	Sim
3'	PR13-4E PR13-5B	Centro verde musgo e contorno branco	Centro creme e contorno branco	Não	Centro empoeirado e contorno aveludado	Sim	Sim	Sim
4'	PR16-1A PR16-1B	Marrom esverdeado e contorno branco	Verde muito escuro e contorno branco	Não	Aveludado	Sim	Não	Sim
5'	PR14-1E	Bege	Cinza esverdeado	Não	Empoeirado	Sim	Não	Não
6'	PR14-3D PR14-4A PR14-5A PR14-5B PR14-5D	Centro preto e contorno branco	Centro preto e contorno branco	Sim	Cotonoso	Não	Sim	Sim
7'	PR14-1A PR14-1C	Branco	Centro amarelo e contorno branco	Sim Não	Cotonoso	Sim	Sim	Sim
8'	PR14-5E	Centro azul petróleo e contorno branco	Centro creme e contorno branco	Sim	Cotonoso	Não	Não	Sim
9'	PR16-4A	Centro azul petróleo e contorno branco	Centro creme e contorno branco	Sim	Cotonoso	Sim	Sim	Sim

M' = Morfotipo inicial.

ferida para placas de Petri contendo 25 mL de meio BDA (Batata Dextrose Ágar - HIMEDIA). Cada placa utilizada para isolamento recebeu cinco porções de córtex colonizado. Foram feitas pelo menos três placas por indivíduo de *P. pachysepala* amostrado e as diferentes placas de cada indivíduo receberam fragmentos de diferentes raízes. As placas foram seladas com filme PVC e armazenadas a 25 °C em câmara de crescimento, tipo BOD. Avaliações periódicas foram realizadas para observação do crescimento fúngico a partir das porções de córtex transferidas. Assim que o crescimento fúngico foi observado, um fragmento de ágar contendo parte do micélio obtido era transferido para novas placas de Petri contendo meio BDA e repicagens sucessivas foram realizadas para obtenção de cultura pura.

Caracterização morfológica dos fungos endofíticos isolados

As características qualitativas e quantitativas foram avaliadas conforme Pereira et al. (2009). As características qualitativas avaliadas foram: cor frente e verso da placa de Petri; aspecto; presença de micélio

aéreo; presença ou ausência de esporulação; padrão de crescimento, uniformidade; presença de anéis concêntricos; presença de secreção e translucidez da borda. E as características quantitativas medidas foram diâmetro da colônia e taxas de crescimento, ambas avaliadas em meio BDA.

Após a obtenção da cultura pura, foram seccionados discos de 7mm de diâmetro e transferidos novamente para meio BDA. Foram feitas quatro repetições de cada isolado, e os discos foram posicionados sempre no meio da placa de Petri. Para a obtenção dos dados quantitativos foi medido o diâmetro da colônia de cada repetição de 24 em 24 horas por quatro dias, totalizando 96 horas, e calculada a média. Foi também calculada a taxa de crescimento dos isolados com base na variação do crescimento radial (Pereira et al. 2009). As características qualitativas foram avaliadas com 96 horas após a repicagem e posteriormente com 240 horas.

As características morfológicas quantitativas foram submetidas à análise de variância, considerando o delineamento inteiramente ao acaso, no programa GENES (versão 2015.5.0).

Tabela 2 Dados qualitativos dos fungos endofíticos de *P. pachysepala* após 240 h de cultivo

M	Código	Cor Frente	Cor Verso	Micélio Aéreo	Aspecto	Esporulação	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos	Borda Translúcida	Secreção
1	PR12-5E PR16-3A	Branco	Creme	Não	Aveludado	Não	Não	Não	Sim	Não
2	PR16-1A PR16-2A	Marrom claro, contomo marrom escuro	Verde muito escuro e contomo branco	Não	Aveludado	Sim	Não	Não	Sim	Não
3	PR15-5C	Centro verde musgo e contomo branco estreito	Centro creme e contomo branco	Não	Aveludado	Sim	Não	Não	Sim	Não
4	PR13-4E PR13-5B	Cinza amarelado e contomo branco	Mostarda	Não Sim	Aveludado	Sim	Não	Não	Sim	Sim
5	PR13-3B	Cinza por baixo com veludo	Mostarda e contomo branco	Não	Aveludado	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
6	PR13-4D	Cinza no centro, veludo espesso branco por cima	Amarelo	Não	Aveludado	Não	Sim	Não	Sim	Sim
7	PR14-1E	Cinza escuro	Bege	Não	Empoeirado	Sim	Não	Não	Não	Não
8	PR14-1A PR14-1C	Branco	Centro creme e contomo branco	Sim Não	Cotonoso	Sim	Sim	Não	Sim	Não
9	PR14-5E	Centro azulpetróleo e contomo branco	Centro creme e contomo branco	Sim	Aveludado	Sim	Não	Não	Sim	Não
10	PR16-4A	Centro azulpetróleo e contomo branco	Centro creme e contomo branco	Sim	Aveludado	Sim	Não	Não	Sim	Não
11	PR14-3D PR14-4A PR14-5A PR14-5B PR14-5D	Preto	Preto	Sim	Aveludado	Não	Sim	Sim	Não	Não

M' = Morfotipo final.

As características morfológicas quantitativas e qualitativas foram analisadas por técnicas biométricas para gerar valores de distância e o agrupamento dos isolados, empregando-se o programa GENES (Cruz e Regazzi 1997; Cruz 2008; Pereira et al. 2009). As características qualitativas foram analisadas como multicatóricas para cálculo da matriz de dissimilaridade, ou seja, 1 – complemento, e posterior agrupamento dos isolados pelo método UPGMA (Cruz 2008). A distância generalizada de Mahalanobis (D2) também foi calculada, gerando uma matriz de distâncias utilizada para o agrupamento dos isolados pelo método de UPGMA.

Resultados e Discussão

Nas raízes dos indivíduos de *P. pachysepala* foram observados *pelotons* em 38,7% dos fragmentos analisados, o que indica uma frequência de colonização baixa se comparado com outras espécies

(Linhares 2006; Santos 2015).

Dos cinco indivíduos de *P. pachysepala*, obtiveram-se dezenove isolados de fungos endofíticos, número parecido com outras espécies de orquídea coletadas na mesma região (Pereira et al. 2015; Custódio et al. 2015). Esses isolados apresentaram diferença em relação às características qualitativas (Tab. 1 e 2) e quantitativas (Tab. 3). Vários outros isolados foram obtidos, porém desconsiderados devido à contaminação ou perda de viabilidade.

As características qualitativas após 96h sugerem o agrupamento dos isolados em nove morfotipos (M') (Tab. 1). Entretanto, alguns isolados apresentam alterações em algumas características após 240h, passando a serem considerados onze morfotipos (M) (Tab. 2 e 3). Isso indica que o cultivo por um maior tempo é mais eficiente para a caracterização qualitativa. A falta do uso da mesma para identificar morfotipos em outros trabalhos pode ser explicada como uma caracterização realizada precocemente (Custódio et al. 2015). As características que se alteraram com o

Tabela 3 Dados quantitativos dos fungos endofíticos de *P. pachysepala*. A taxa de crescimento foi avaliada às 96h de incubação e o diâmetro da colônia (D24 eD96) foi determinado às 24 e 96 h

Código	Taxa cm/h	D ₂₄ cm	D ₉₆ cm	Código	Taxa cm/h	D ₂₄ cm	D ₉₆ cm
P1A	0,0072	0,91	1,95	P3F	0,0285	1,53	5,4
P2A	0,0081	1,01	2,11	P3G	0,0299	1,48	5,96
P2B	0,0060	0,86	1,76	P3H	0,0300	1,36	5,65
P2C	0,005	0,95	1,46	P3I	0,0145	1,1	2,5
P2D	0,216	0,99	1,68	P4A	0,0060	0,77	1,58
P3A	0,0451	1,1	5,15	P5A	0,0060	1,83	1,95
P3B	0,0218	1,4	4,36	P5B	0,0062	0,91	1,73
P3C	-	-	-	P5C	-	-	-
P3D	0,0298	1,45	5,4	P5D	0,0179	1,3	3,8
P3E	0,0280	1,53	5,3				

Taxa = Média da Taxa de Crescimento até 96h; D24= Média do diâmetro das repetições em 24h; D96=Média do diâmetro das repetições em 96h. Obs.: os dados referentes a P3C e P5C foram perdidos, uma vez que as colônias esporularam e houve crescimento misturado de várias colônias, o que impediu obter o raio e diâmetro da colônia.

tempo foram cor da frente e do verso da cultura, aspecto e esporulação.

Os dendrogramas gerados a partir dos dados qualitativos (Fig. 1) e quantitativos (Fig. 2) confirmaram a variabilidade entre os isolados. Os isolados ficaram posicionados de maneira semelhante nos dois dendrogramas, com algumas exceções. Essas exceções podem ser explicadas por: semelhança na taxa de crescimento e no diâmetro entre repetições de diferentes isolados e entre fungos diferentes; e/ ou por variações entre as repetições de um mesmo isolado ou de isolados que se encaixam em um mesmo morfotipo. De modo geral, a análise quantitativa contribuiu para mostrar a variabilidade dentro de um mesmo morfotipo, mas pode ser a responsável por separar espécies diferentes com características culturais idênticas, fato também apontado por Pereira et al. (2014).

Comparando com estudos realizados com outras espécies de orquídea, observa-se que o número de fungos ou morfotipos obtidos varia conforme a técnica de isolamento, o número amostral e a espécie de orquídea. Pereira et al. (2005), encontraram apenas uma espécie de fungo por espécie de orquídea. Isso se deve à técnica de maceração utilizada para o isolamento, que não permite selecionar um único peloton. Já o procedimento aplicado no presente trabalho possibilita a obtenção de um grande número de isolados e de morfotipos. Isso pôde ser observado em *P. pachysepala* (presente trabalho) e em orquídeas es-

tudadas em outros trabalhos utilizando a mesma técnica (Pereira et al. 2009; Custódio et al. 2015; Pereira et al; 2015)

Caracterização cultural pode ser de grande utilidade no processo de identificação de espécies. Ao reunir as características culturais se obtém morfotipos, constituídos por isolados que possuem características idênticas ou semelhantes. Entretanto, a comparação entre as características culturais apresentadas em trabalhos diferentes para a identificação dos morfotipos pode ser imprecisa, por ser de caráter subjetivo. A definição de cores e aspectos pode variar de acordo com a pessoa, e por isso devem ser utilizados outros dados para maior precisão na identificação da espécie.

As orquídeas necessariamente fazem associação com fungos micorrízicos para germinação de suas sementes e nutrição da planta (Smith e Read 1997). Portanto, dentre os isolados obtidos, podem existir fungos micorrízicos. No entanto, existe a possibilidade de crescimento de fungos endofíticos não micorrízicos, pois estes podem crescer nos tecidos da planta sem formar estruturas visíveis (Bayman e Otero 2006). Consequentemente, os não micorrízicos podem ser isolados, mesmo quando visando os micorrízicos. Os fungos endofíticos não micorrízicos também podem ser benéficos para a planta. Produzem metabólitos secundários dos quais alguns possuem propriedades inseticidas, antibióticas e antifúngicas, inibindo alguns patógenos (Dutta et al. 2014). Libe-

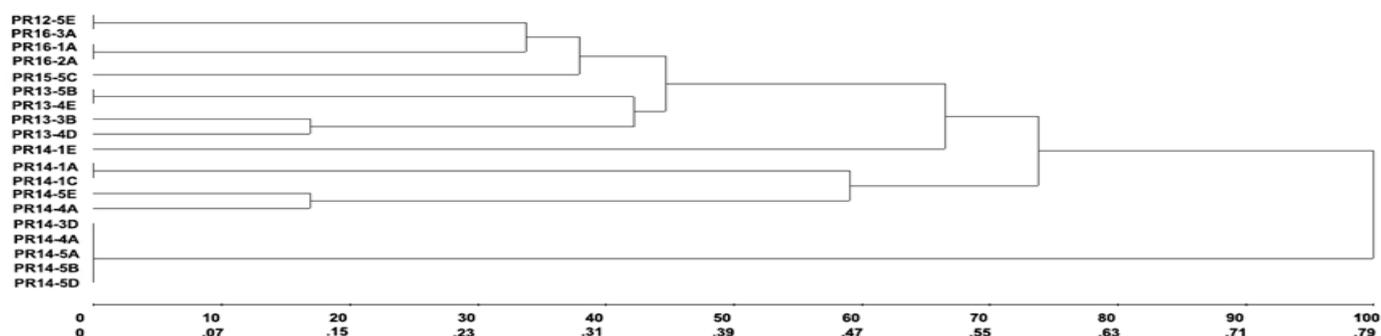


Figura 1 Agrupamentos dos fungos endofíticos de *P. pachysepala* baseados nos dados qualitativos. Esses dados foram analisados pela técnica multicategórica para gerar o complemento da distância e posterior agrupamento pelo método UPGMA. As características qualitativas avaliadas foram cor (frente e verso da placa de Petri); aspecto; presença de micélio aéreo; presença ou ausência de esporulação; padrão de crescimento, uniformidade; presença de anéis concêntricos; presença de secreção e translucidez da borda.

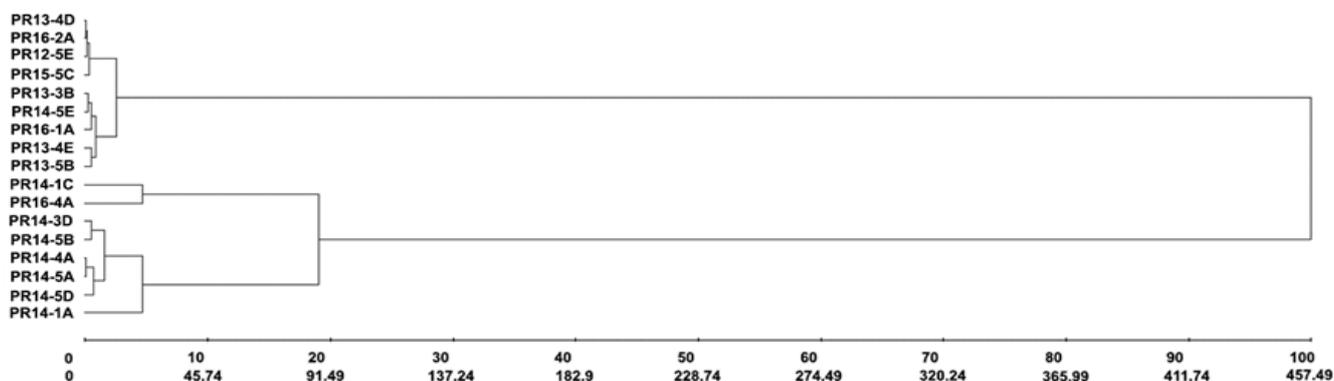


Figura 2 Agrupamentos dos fungos endofíticos de *P. pachysepala* baseado nos dados quantitativos. Esses dados foram convertidos na distância generalizada de Mahalanobis para posterior agrupamento pelo método UPGMA.

ram fitormonônios que auxiliam no crescimento da planta e aumentam a capacidade de recuperação do meristema após período de seca (Dutta et al. 2014). Portanto, os estudos tanto das espécies de fungos endofíticos micorrízicos, quanto das espécies não micorrízicas são importantes para futuros programas de conservação desta espécie de orquídea.

Agradecimentos

A FAPEMIG pelo apoio financeiro (CAG - APQ-01744-13). Ao Ministério do Meio Ambiente e ICMBio pela autorização de coleta (número 26431-4).

Referências Bibliográficas

Azevedo JL (1998) Micro-organismos endofíticos.

In, Melo IS, Azevedo JL (ed) **Ecologia Microbiana**. Embrapa – CNPMA, Jaguariuna, pp118–137.

Barbero APP (2007) **Flora da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil): Orchidaceae – subtribo Laeliinae**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, SP.

Bayman PJ, Otero T (2006) **Microbial Endophytes of Orchid Roots**. In, Schulz B, Boyle C, Sieber T (ed) *Microbial Root Endophytes*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp153–181.

Boldrini RF, Santos WO, Cruz ZMA, Ramos AC (2010) Bases da associação micorrízica orquidóide. **Natureza on line** 8(3):140–145.

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

- Chiron GR, Castro Neto VP (2003) Révision du complexe *Prosthechea vespa* (Orchidaceae) pour le sud-est du Brésil. **Richardiana** 3(4):163–180.
- Cruz CD (2008) Programa Genes: Aplicativo computacional em genética estatística. Versão para Windows. Viçosa, MG.
- Cruz CD, Regazzi AJ (1997) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2ed. Viçosa, MG.
- Custódio CC, Monteiro MF, Lobo NNM, Callegari DP, Silva VM, Pereira MC (2015) Especificidade na germinação simbiótica de *Sophronitis brevipedunculata*, uma orquídea da Serra do Cipó/MG. In: II Simpósio do Mestrado Acadêmico em Agronomia – Produção Vegetal, Rio Paranaíba, MG.
- Dearnaley JDW, Martos F, Selosse MA (2012) Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. In: Hook B (ed) **Fungal Associations**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 207–230.
- Dutta D, Puzari KC, Gogoi R, Dutta P (2014) Endophytes: Exploitation as a Tool in Plant Protection. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 57(5): 621–629.
- Joly AB (2002) **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional.
- Jones DL (2006) **A complete guide to native orchids of Australia including the Island Territories**. Reed New Holland, Sydney.
- Kraus JE, Arduin M (1997) **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. EDUR, Rio de Janeiro.
- Linhares DO (2006) **Caracterização morfológica de micorrizas de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* nativas do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (MG)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Miranda L (2014) **Diversidade de micro-organismos endofíticos em raízes de orquídeas da Serra do Cipó/MG**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba, Rio Paranaíba, MG.
- Pereira MC, Coelho IS, Valadares RBS, Oliveira SF, Bocayuva M, Pereira OL, Araújo EF, Kasuya MCM (2014) Morphological and molecular characterization of *Tulasnella* spp. fungi isolated from the roots of *Epidendrum secundum*, a widespread Brazilian orchid. **Symbiosis** 62(2):111–121.
- Pereira OL, Kasuya MCM, Borges AC, Araújo EF (2005) Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchid in Brazil. **Canadian Journal of Botany** 83(1): 54–65.
- Pereira MC, Kasuya MCM, Pereira OL, Costa MD, Rocha RB (2009) Diversidade de fungos micorrízicos *Epulorhiza* spp. isolados de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 33(5): 1187–1197.
- Pereira MC, Miranda L, Custódio CC, Tartarine N, Silva VM, Gomes T, Kasuya MCM (2015) Diversidade de fungos endofíticos em raízes de orquídea da Serra do Cipó/MG. In: II Simpósio do Mestrado Acadêmico em Agronomia – Produção Vegetal, Rio Paranaíba, MG.
- 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, Massicotte HB, Melville LH (2004) **Orchid Mycorrhizas**. In: Cavers PB (ed) *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. NRC Research Press, pp 123–14.
- Rasmussen H N (2002) Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. **Plant and Soil** 244(1): 149–163.
- Santos LN (2015) **Anatomia e colonização micorrízica de raízes de três orquídeas crescendo em diferentes substratos**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba, Rio Paranaíba, MG.
- Santos MF, Serafim H, Sano PT (2011) Fisionomia e composição da vegetação florestal na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 25:793–814.
- Smith SE, Read DJ (1997) **Mycorrhizal symbiosis**. Revohot 2ed. San Diego, U.S.A.
- Stalpers JA, Andersen TF (1996) A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia* S.L. In: Jabaji-Hare S, Neat Dijst (ed) **Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and control**, Kluwer, Dordrecht, pp 49–63.
- Trouvelot A, Kough JL e Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V e Gianinazzi S (ed) **Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizaed, Paris, France**, pp 217–221.
- Valadares RBS, Pereira MC, Otero JT, Cardoso EJ

(2012) Narrow fungal mycorrhizal diversity in a population of the orchid *Coppensia doniana*. **Biotropica** 44:114–122.

Valadares RBS, Perotto S, Santos EC, Lambais MR

(2014) Proteome changes in *Oncidium sphacelatum* (Orchidaceae) at different trophic stages of symbiotic germination. **Mycorrhiza**, 24(5): 349-60.

Werneck MS, Espírito MM (2002) Species Diversity and Abundance of Vascular Epiphytes on *Vellozia piresiana* in Brazil. **Biotropica** 25(1):51–57.