

# Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*

Marlon Corrêa Pereira<sup>1</sup>, Denise Pereira Torres<sup>2</sup>, Fernanda Aparecida Rodrigues Guimarães<sup>3</sup>, Olinto Liparini Pereira<sup>4</sup> e Maria Catarina Megumi Kasuya<sup>5</sup>

Recebido em 4/11/2010. Aceito em 18/05/2011

## RESUMO

(Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*). Na natureza, as espécies de Orchidaceae estão associadas a fungos micorrízicos. A compreensão da especificidade fungo-planta nessa associação pode auxiliar no desenvolvimento de programas para propagação simbiótica das orquídeas. Fungos micorrízicos *Epulorhiza* spp. têm sido isolados de *Epidendrum secundum* Jacq. com maior frequência. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação de sementes e o desenvolvimento de protocormos de *E. secundum* associados a diferentes isolados de fungos do gênero *Epulorhiza*. Utilizou-se 16 fungos *Epulorhiza* spp. isolados de diferentes populações de *E. secundum*. Após 44 dias, todos os fungos testados induziram a germinação das sementes. Entretanto, observou-se diferença na eficiência desses fungos em promover o desenvolvimento dos protocormos, mesmo entre os fungos que apresentam semelhanças morfológicas. O estágio de desenvolvimento mais avançado dos protocormos e o maior índice de crescimento foram observados quando as sementes foram inoculadas com o isolado M65. Conclui-se que a germinação das sementes e o desenvolvimento dos protocormos de *E. secundum* dependem do fungo micorrízico e que, apesar da grande frequência de associação entre essa espécie de orquídea e fungos do gênero *Epulorhiza*, é importante a seleção de isolados que apresentem maior eficiência simbiótica. Isolados eficientes são úteis na produção de mudas de orquídeas de importância econômica e ornamental e de espécies ameaçadas de extinção.

**Palavras-chave:** orquídea, fungos rizoctonióides, propagação simbiótica

## ABSTRACT

(Seed germination and protocorm development of *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) in association with *Epulorhiza* mycorrhizal fungi). In nature, species of Orchidaceae are always associated with mycorrhizal fungi. The comprehension of fungal-plant specificity in this association can assist with the establishment of programs that focus on symbiotic propagation of orchids. *Epulorhiza* mycorrhizal fungi have frequently been isolated from *Epidendrum secundum* Jacq. Thus, the objective of this study was to evaluate the germination of *E. secundum* seeds and protocorm development associated with different isolates of *Epulorhiza* spp. Sixteen *Epulorhiza* fungi obtained from different *E. secundum* populations were used. After 44 days, all isolates promoted seed germination of this species. However, differences were observed in the efficiency in promoting seed germination and protocorm development, even among the isolates that had morphological similarities. The highest stage of protocorm development and the highest growth indexes were obtained in the presence of isolate M65. The results suggest that seed germination and protocorm development of *E. secundum* depend on the mycorrhizal fungi and, despite the high frequency of association between this plant and *Epulorhiza*, it is important to select isolates with high efficiency to establish symbiosis. Efficient isolates are useful for the production of seedlings that have economic and ornamental importance, as well as for endangered orchids.

**Key words:** orchid, *Rhizoctonia*-like fungi, symbiotic propagation

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Rio Paranaíba, MG, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia, Viçosa, MG, Brasil

<sup>4</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa, MG, Brasil

<sup>5</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, MG, Brasil

<sup>6</sup> Autor para correspondência: marlon.pereira@ufv.br

## Introdução

As espécies de Orchidaceae apresentam sementes diminutas, desprovidas de tecido de reserva e dependentes da associação com fungos micorrízicos para obter as moléculas simples de carbono e os minerais necessários à germinação e ao desenvolvimento do embrião (Peterson *et al.* 2004; Dearnaley 2007). Mesmo quando desenvolve metabolismo autotrófico, a associação com o fungo se faz necessária principalmente para obtenção de minerais, tais como fósforo e nitrogênio, sendo possível evidenciar a transferência de carbono da planta para o fungo (Cameron *et al.* 2007; 2008).

Os *pelotons*, enovelados de hifas fúngicas formados no espaço intracelular de células parenquimáticas do embrião (Peterson *et al.* 2004) são as estruturas que caracterizam a interação orquídea – fungo micorrízico (Rasmussen 1995; Smith & Read 1997). Por meio da degradação dos *pelotons*, o embrião, os protocormos e as raízes da orquídea obtêm o carbono e minerais necessários ao desenvolvimento da planta (Cameron *et al.* 2006; 2007).

A maioria dos fungos micorrízicos isolados de orquídeas é identificada como fungos semelhantes à *Rhizoctonia* ou rizoctonióides, sendo os principais gêneros *Rhizoctonia*, *Ceratorhiza* e *Epulorhiza* (Pereira *et al.* 2005a; b; Dearnaley 2007). Estes fungos estão dispersos nos ambientes naturais, exercendo outros papéis ecológicos como saprófitas, patógenos ou simbioses de espécies vegetais de outras famílias (Rasmussen 2002). Estudos têm relatado a eficiência destes fungos em promover a germinação de sementes de orquídeas hospedeiras e não-hospedeiras na natureza (Zettler *et al.* 1999; Pereira *et al.* 2005c).

A especificidade, que pode ser definida como a amplitude filogenética dos fungos capazes de se associar com uma espécie de orquídea (Thompson 1994), é observada em diferentes níveis na associação

Fundo micorrízico - orquídea (Hadley & Pegg 1989). Essa especificidade, somada às variações genéticas intra-específicas da orquídea e do fungo e aos fatores abióticos como composição do substrato, temperatura, altitude e região geográfica, afetam diretamente o estabelecimento da associação micorrízica (Taylor & Bruns 1999; Otero *et al.* 2005). Dessa forma, a co-inoculação de diferentes isolados fúngicos com sementes de uma orquídea pode resultar em diferentes porcentagens de germinação e estágios de desenvolvimento dos protocormos e plântulas (Pereira *et al.* 2005c).

A associação da planta com o fungo adequado é indispensável para a germinação das sementes, para o desenvolvimento do protocormo e da plântula, de forma que a presença do parceiro fúngico é um fator importante na distribuição e desenvolvimento das orquídeas na natureza (Mckendrick *et al.* 2002; Peterson *et al.* 2004). Deste modo, a melhor compreensão da especificidade nesta associação é necessária para propagação simbiótica de mudas, tanto em programas para a reintrodução de espécies ameaçadas

de extinção, como também para produção de mudas de orquídeas de interesse comercial (Pereira *et al.* 2002).

*Epidendrum secundum* Jacq. está compreendida na subfamília Epidendroideae, tribo Epidendreae, subtribo Laellinae (van den Berg *et al.* 2005; 2000; Freudenstein *et al.* 2004). É uma espécie de orquídea de hábito terrestre e/ou rupícola (Pinheiro & Barros 2007). Apresenta floração durante todo o ano, o que, facilita sua identificação no campo. Os fungos do gênero *Epulorhiza* são os principais simbiontes dessa espécie em campos graminóides (Nogueira *et al.* 2005; Pereira *et al.* 2005a; 2009), tendo sido identificados três grupos de fungos *Epulorhiza* spp., morfológicamente distintos, associados a quatro populações de *E. secundum* (Pereira *et al.* 2009).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a porcentagem de germinação das sementes de *E. secundum* e os estágios de desenvolvimento dos protocormos obtidos em co-inoculação com 16 isolados de *Epulorhiza* spp.

## Material e métodos

Dezesseis fungos rizoctonióides *Epulorhiza* spp. (Tab. 1), pertencentes à Coleção de Fungos Micorrízicos de Orquídea do Laboratório de Associações Micorrízicas (Departamento de Microbiologia/ BIOAGRO/ UFV), foram utilizados no experimento. Esses fungos foram isolados de cinco diferentes populações de *E. secundum*, provenientes da Serra das Cabeças, sub-serra Totem Deitado (Licença Instituto Estadual de Floresta 050/05). Desses isolados, 14 pertenciam às populações I, II, III e IV e foram selecionados de forma a representar os três grupos morfológicos identificados por Pereira *et al.* (2009). Os outros dois isolados foram obtidos da população V de *E. secundum* (Tab.1).

**Tabela 1.** Populações da orquídea hospedeira (*Epidendrum secundum*), código dos isolados e os grupos morfológicos dos fungos *Epulorhiza* spp. utilizados na germinação simbiótica.

Populações	Isolados	Grupos*
I	M52, M54, M58	C
II	M61	A
II	M62, M63 M64, M65, M67	C
III	M69, M73, M74, M75	B
IV	M76	C
V	M77, M79	si**

\*Grupos morfológicos identificados por Pereira *et al.* (2009). \*\*si: isolados não caracterizados morfológicamente em trabalhos anteriores.

Cápsulas maduras contendo sementes de *E. secundum* foram coletadas de plantas adultas naturais da sub-serra Totem Deitado. Em laboratório, as cápsulas foram armazenadas em envelopes de papel de filtro e mantidas em dessecador contendo sílica gel, à temperatura ambiente, até sua secagem, de forma a evitar sua deterioração e garantir o completo desenvolvimento dos embriões das sementes (Zettler *et al.* 1999). Após a secagem, foram mantidas a 4 °C,

sendo abertas para coleta das sementes apenas no momento da montagem do experimento.

Amostras de sementes (200 mg) de uma cápsula de *E. secundum* coletada da população II foram superficialmente desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 20% (c.a. 0,5% de cloro ativo) por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas por três vezes sucessivas, sob agitação constante, em água destilada esterilizada. As sementes desinfestadas foram mantidas imersas em 50 mL de água destilada estéril.

A suspensão de sementes foi submetida à agitação constante para homogeneização e, posteriormente, 400 µL da suspensão foi aplicada sobre a superfície de cada placa de Petri contendo 20 mL de meio ágar aveia modificado (4 g.L<sup>-1</sup> de farelo de aveia, 7,5 g.L<sup>-1</sup> de ágar; pH 5,6) (Dixon 1987). Cada placa foi inoculada com um disco de 9 mm de diâmetro, contendo o micélio fúngico, retirado das bordas das colônias em crescimento em meio BDA (Batata Dextrose Ágar – 15 g de ágar, 15 g de glicose e 1 L de caldo de batata; pH 5,6). Placas contendo meio ágar aveia e sementes de *E. secundum*, sem inoculação do micélio, foram utilizadas como controle. As placas foram seladas com filme PVC e incubadas sob ausência de luz a 25 °C. Cinco repetições de cada tratamento foram distribuídas ao acaso na câmara de crescimento.

Após 44 dias foi realizada a avaliação do desenvolvimento dos protocormos, sob microscópio estereoscópico (Olympus SZ40). Aos diferentes estágios de desenvolvimento dos protocormos foram atribuídos valores de 0 a 6, adaptados de Zettler & Hofer (1998), sendo 0 = não ocorreu germinação; 1 = embrião bem desenvolvido dentro do envoltório e formação de rizóides; 2 = rompimento da testa; 3 = aparecimento do pró-meristema; 4 = início da formação da primeira folha, 5 = primeira folha bem desenvolvida e 6 = início da formação da segunda folha.

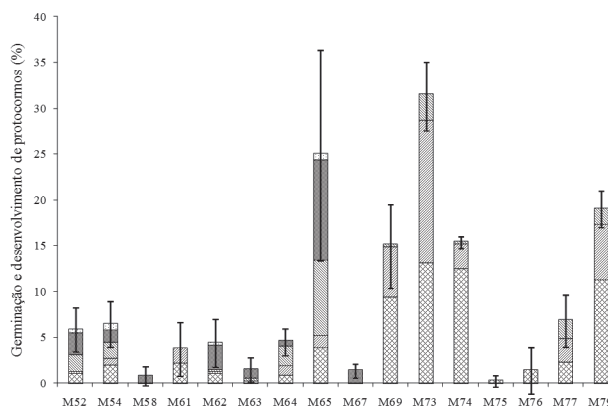
Os protocormos foram clareados e corados com azul de tripano (Phillips & Hayman 1970). A formação dos *pelotons*, que caracterizam a associação simbiótica micorrizica em orquídeas, foi analisada por microscopia óptica (Olympus BX50), utilizando protocormos em diferentes estágios de desenvolvimento.

O número de protocormos nos diferentes estágios de germinação foi avaliado nas cinco repetições de cada isolado. A porcentagem de protocormos nos diferentes estágios de desenvolvimento, a porcentagem de germinação total e o índice de crescimento dos protocormos foram avaliados. A porcentagem de germinação total considerou os protocormos do estágio 2 até o estágio 6 para retirar da análise qualquer efeito da absorção de água pelo embrião, o que pode levar a respostas semelhantes às descritas para o estágio 1. O índice de crescimento dos protocormos foi calculado utilizando a seguinte fórmula:  $IC = (N1 + N2 \times 2 + N3 \times 3 + N4 \times 4 + N5 \times 5 + N6 \times 6) \div (N0 + N1 + N2 + N3 + N4 + N5 + N6)$ , onde N0 é o número de sementes no estágio 0, N1 o número de sementes no estágio 1 e assim até N6 (Otero

et al. 2005). Esses cálculos foram realizados e os gráficos gerados utilizando o programa Microsoft Office Excel 2003. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

## Resultados

Os fungos do gênero *Epulorhiza*, isolados de *Epidendrum secundum*, induziram a germinação das sementes de *E. secundum* (Fig. 1). As sementes incubadas na ausência desses fungos não germinaram.



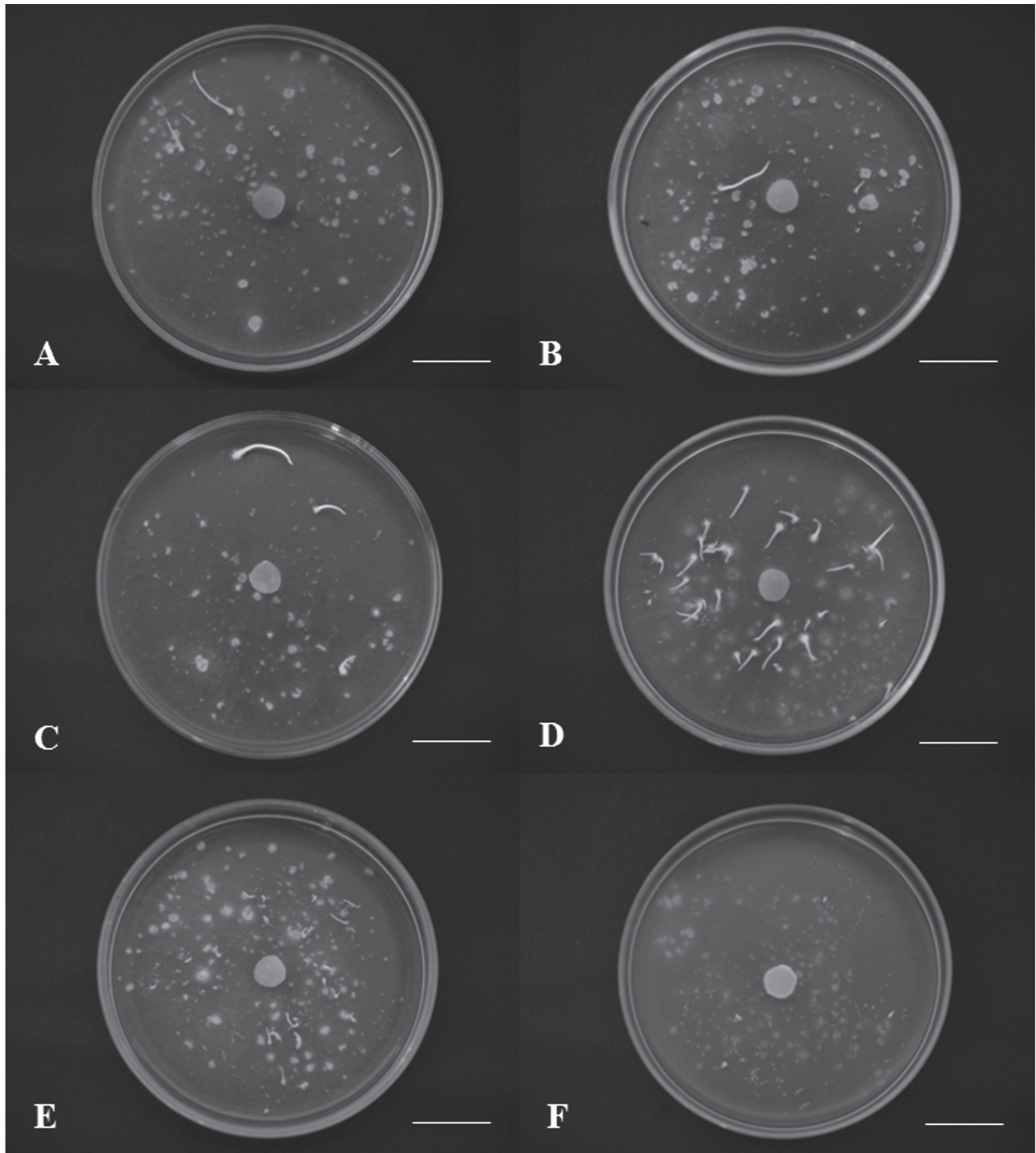
**Figura 1.** Porcentagem de germinação total e porcentagem de protocormos de *Epidendrum secundum* nos diferentes estágios de desenvolvimento, determinada 44 dias após a inoculação de fungos rizoctonióides *Epulorhiza* spp. e cultivados em meio aveia, na ausência de luz. Estágios 2, 3, 4, 5 e 6. A média da porcentagem de germinação total foi calculada considerando estágios de 2 a 6. Os resultados estão apresentados em média ± desvio padrão.

Os fungos isolados das populações I e II de *E. secundum*, com exceção do isolado M61, estimularam os protocormos a atingir os estágios mais avançados de desenvolvimento, sendo observado, pelo menos, a formação da primeira folha, no estágio 5 (Fig. 1, 2A-D). Em associação com o isolado M61, o desenvolvimento dos protocormos foi até formação do pró-meristema, no estágio 3 (Fig. 1).

Quando as sementes foram inoculadas com os isolados M69, M73 e M74 (população III), e os isolados M77 e M79 (população V), houve desenvolvimento dos protocormos até o início da formação da primeira folha (Fig. 1, 2F). O quarto isolado da população III, M75, e o isolado M76 da população IV, promoveram o desenvolvimento dos protocormos apenas até a formação do pró-meristema (Fig. 1).

Após 44 dias, os isolados M65 e M73 apresentaram as maiores porcentagens de germinação das sementes (25 e 31%, respectivamente) e os maiores índices de crescimento (1,1 e 0,9, respectivamente) (Fig. 1, 2, 3). O maior índice de crescimento de M65 se deve ao fato de ter produzido os estágios de desenvolvimento mais avançados: 11% de protocormos no estágio 5 e 0,8% no estágio 6 (Fig. 1, 2D, 3). Por outro lado, M73 promoveu o desenvolvimento dos protocormos apenas até o estágio 4 (3%) (Fig. 1, 2E, 3).

Entre os isolados que apresentaram porcentagem de germinação entre 15 e 20%, o estágio de desenvolvimento



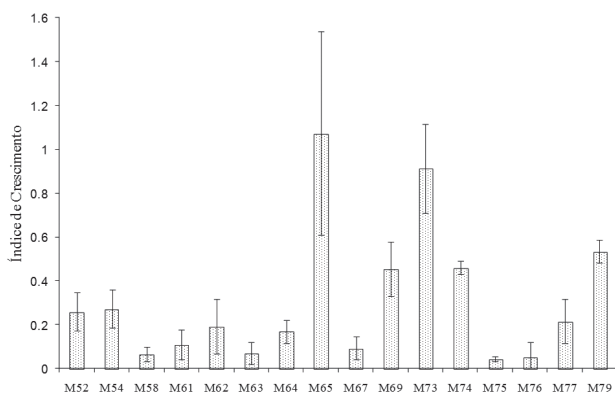
**Figura 2.** Protocormos de *Epidendrum secundum* aos 68 dias após a inoculação com diferentes isolados de fungos *Epulorhiza* spp e cultivados em meio aveia, na ausência de luz. Protocormos inoculados com os isolados M52 (A), M54 (B), M62 (C), M65 (D), M73 (E) e M77 (F). Barra: 2 cm.

mais avançado obtido foi 4. Com relação aos isolados com porcentagem de germinação abaixo de 10%, baixas porcentagens de protocormos nos estágios 5 e 6 foram observadas na presença dos isolados M52, M54 e M62; os demais promoveram desenvolvimento dos protocormos até o estágio 4.

A colonização das células do embrião e a formação dos *pelotons* não foram observadas na associação com M61, M75

e M76, pois a testa ainda envolvia o embrião. Foi possível observar apenas o crescimento micelial do isolado M61 na testa e na superfície dos rizóides (dados não apresentados).

Em geral, foi observada a colonização da região basal dos protocormos (Fig. 4A), onde *pelotons* degradados e intactos ocupavam parte do volume das células corticais (Fig. 4B, C). Observou-se o crescimento de hifas na superfície e no



**Figura 3.** Índice de crescimento dos protocormos aos 44 dias após a inoculação de sementes de *Epidendrum secundum* com isolados de fungos rizotonióides *Epulorhiza* spp. e cultivados em meio aveia na ausência de luz. Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  desvio padrão.

interior dos rizóides (Fig. 4D, E), assim como a formação de células monilióides no seu interior dos rizóides (Fig. 4E). As células corticais, na base dos rizóides, apresentavam *pelotons* que possuíam conexão com as hifas observadas na região intracelular dos rizóides (Fig. 4D). *Pelotons* intactos foram observados na região cortical mais próxima à epiderme, enquanto os *pelotons* degradados se concentravam na porção mais interna desse tecido cortical (Fig. 4C, F). Os rizóides da região apical do protocormo apresentaram colonização superficial, mas não foram observadas hifas intracelulares, nem colonização das células corticais da base destes rizóides.

## Discussão

As sementes de *Epidendrum secundum* germinaram na presença dos diferentes isolados de *Epulorhiza* spp. obtidos das cinco populações dessa orquídea (Fig. 1 e 2). Fungos rizotonióides desse gênero também promoveram a germinação simbiótica de sementes de outras orquídeas, como *Epidendrum conopseum* R. Br. (Zettler *et al.* 1998), *Encyclia tampensis* (Lindl.) Small (Zettler *et al.* 1999), *Goodyera pubescens* (Wild.) R. Br. (Zettler & McInnis 1993), *Habenaria macroceratitis* Willd. (Stewart & Zettler 2002; Stewart & Kane 2006), *Habenaria repens* Nutt. (Stewart & Zettler 2002), *Platanthera clavellata* (Michx.) Luer (Zettler & Holfer 1998), *Platanthera integrilabia* (Correll) Luer (Zettler & McInnis 1992; 1994), *Platanthera praeclara* Sheviak & M.L. Bowles (Sharma *et al.* 2003), *Spiranthes brevibrabris* Lindley (Stewart & Kane 2007), *Spiranthes cernua* (L.) L.C. Rich (Zettler & McInnis 1993).

Para utilização dos fungos micorrízicos na produção simbiótica de mudas é importante testá-los quanto à eficiência em promover a germinação e o desenvolvimento das orquídeas, uma vez que variações nessa eficiência podem ser observadas entre isolados de uma mesma espécie e entre isolados de diferentes espécies de um gênero (Rasmussen 2002; Stewart & Kane 2006). Os isolados testados neste

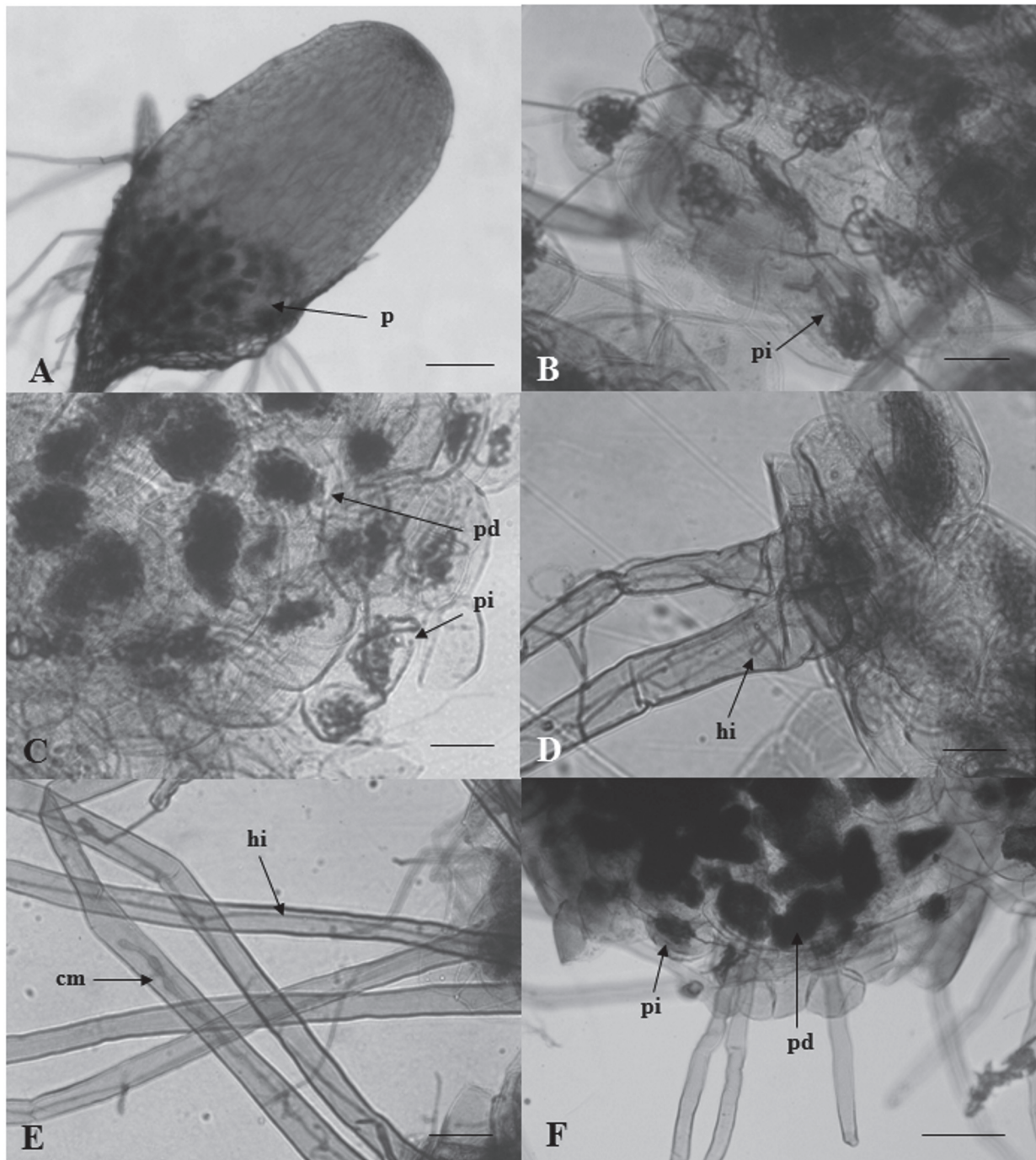
trabalho apresentaram diferença na eficiência em promover a germinação das sementes e o desenvolvimento dos protocormos de *E. secundum* (Fig. 1, 2). Os isolados M65 e M73 podem ser considerados os mais eficientes dentre os fungos testados, destacando-se o isolado M65 por produzir protocormos em estágios mais avançados de desenvolvimento. Os demais isolados apresentaram índice de crescimento abaixo de 0,6 e podem ser considerados de baixa eficiência.

Variações nas porcentagens de sementes germinadas e dos diferentes estágios de desenvolvimento dos protocormos foram também observadas em decorrência da inoculação de sementes de *P. clavellata*, *H. macroceratitis* e *H. repens* com isolados de *Epulorhiza* spp. (Zettler & Holfer 1998; Stewart & Zettler 2002; Stewart & Zettler 2002; Stewart & Kane 2006). Sementes viáveis de *H. macroceratitis* germinaram na presença de seis isolados de *Epulorhiza* spp., sendo as maiores porcentagens observadas quando inoculadas com fungos obtidos da população de onde as sementes foram coletadas (Stewart & Kane 2006).

A especificidade na associação do fungo micorrízico e da orquídea precisa ser considerada durante a seleção dos isolados a serem utilizados na germinação simbiótica das sementes (Rasmussen 2002). Os estudos têm mostrado que a especificidade é variável entre as espécies de orquídea, de forma que orquídeas de um mesmo gênero podem associar-se a uma maior gama de fungos e outras com menor gama (Taylor & Bruns 1999; Shefferson *et al.* 2007). Para isso se faz necessário identificar os fungos capazes de estabelecer associação com a espécie no campo e então selecionar aqueles que podem ser utilizados na propagação simbiótica dessa orquídea. Os isolados testados foram obtidos de raízes de plantas adultas amostradas no ambiente natural de *E. secundum* (Tab. 1; Pereira *et al.* 2009). Outros trabalhos buscaram isolar fungos presentes em protocormos e plântulas coletadas no campo ou a partir de protocormos obtidos após incubação de sementes das orquídeas de interesse no seu habitat natural (McKendrick *et al.* 2002; Pereira *et al.* 2005a).

As sementes de algumas espécies de orquídeas têm germinado apenas na presença de um fungo isolado dessa espécie no campo (Zettler *et al.* 1998; Pereira *et al.* 2005c). Porém, alguns trabalhos mostram fungos micorrízicos em associação com sementes de orquídeas que não são suas hospedeiras nos ambientes naturais (Zettler *et al.* 1999). Segundo Hadley (1970), nos testes de germinação *in vitro*, as sementes de orquídeas podem se associar com uma gama de simbiontes diferente daquela observada no sistema radicular e em protocormos amostrados nos ambientes naturais. Isso sugere que não existe especificidade absoluta entre o fungo e o seu hospedeiro e que há um baixo grau de especificidade nas associações micorrízicas em orquídea. Dessa forma, os fungos micorrízicos de *E. secundum* avaliados neste trabalho poderiam ser aplicados na germinação simbiótica de outras espécies de orquídeas.

Os isolados das populações I e II resultaram em menor porcentagem de germinação e promoveram o desenvolvi-



**Figura 4.** Colonização das células dos protocormos de *Epidendrum secundum* por fungos *Epulorhiza* spp. Base do protocormo colonizada pelo isolado M73 (A). Pelotons intactos e degradados observados em protocormos inoculados pelos isolados M63(B) e M52(C). Rizóides de protocormos colonizados pelos isolados M73 (D) e M52 (E). Cordão de pelotons intactos formados na região sub-epidérmica do córtex de protocormo colonizado pelo isolado M67 (F). cm, célula monilióide; hi, hifa intracelular; p, pelotons; pd, pelotons degradados e pi, pelotons intactos. Barras: 250 µm (A), 120 µm (F), 50 µm (B, D e E) e 25 µm (C).

mento até a formação da segunda folha (Fig. 1). Por outro lado, os isolados da população III promoveram maior porcentagem de germinação, mas o desenvolvimento dos protocormos foi somente até o início da formação da primeira folha. Comparando as taxas de crescimento dos isolados das três populações, Pereira *et al.* (2009) verificaram que todos os fungos isolados das populações I e II, com

exceção de M61, crescem até três vezes mais que todos os isolados obtidos da população III. Isso explicaria porque, na presença do isolado M73, os protocormos se desenvolveram mais lentamente que na presença de M65 (Fig. 1). Essas informações sugerem que fungos compatíveis, com maiores taxas de crescimento, podem possibilitar o desenvolvimento mais acelerado dos protocormos.

Alguns isolados fúngicos podem possuir uma maior capacidade de estimular o desenvolvimento simbiótico de orquídeas (Hadley 1970; Otero *et al.* 2005). Entre os isolados testados, os fungos de um mesmo grupo (Tab. 1), mesmo sendo morfológicamente iguais, promoveram a germinação sementes e desenvolvimento de protocormios em diferentes porcentagens. Dentre os isolados do grupo B, se destacou o M73, e no grupo C, M65 (Fig. 1, 2 e 3). Esses isolados podem ser de potencial aplicação em programas de produção simbiótica de mudas de orquídea.

Variações intra-específicas existentes entre os isolados fúngicos, assim como entre as populações de uma espécie de orquídea, podem interferir no sucesso da associação micorrízica. Em algumas espécies de orquídea, os fungos promovem mais eficientemente a germinação e desenvolvimento das sementes oriundas da população de onde foi obtido (Otero *et al.* 2005; Stewart & Kane 2006). O acelerado desenvolvimento dos protocormos colonizados pelo isolado M65 poderia ser explicado pelo fato desse isolado e as sementes serem oriundos da população II. Contudo, o isolado M73 promoveu alta porcentagem de germinação e com um maior tempo de incubação poderia promover altas porcentagens de protocormos no estágio 6. Experimentos *in vitro* de germinação simbiótica, co-inoculando fungos e sementes de população deferentes, assim como experimentos *ex vitro*, incubando sementes em áreas diferentes da população de origem, precisam ser realizados para melhor compreensão do efeito da variação intra-específica dos diferentes fungos e populações sobre a germinação das sementes e desenvolvimento dos protocormos e plântulas.

Os resultados de Pereira *et al.* (2009) e do presente trabalho sugerem que a larga distribuição de *E. secundum* no Parque Estadual da Serra das Cabeças se deve sua habilidade em interagir a uma ampla variedade de simbiotes do gênero *Epulorhiza*. Os fungos desse gênero são saprófitas e podem ser encontrados em diversos ambientes (Rasmussen 2002). Se um maior número de populações dessa orquídea for estudado, outros diferentes grupos de *Epulorhiza* spp. poderão ser identificados e fungos micorrízicos provenientes dos diversos ambientes colonizados por essa orquídea serão obtidos. Da mesma forma, isolados de outros gêneros de fungos, obtidos de orquídeas da subtribo Laeliinae, têm apresentado efeitos positivos no crescimento de mudas dos seus hospedeiros (Ovando *et al.* 2005). Isso é um indicativo que mais esforços devem ser investidos para identificação de outros fungos endofíticos de *E. secundum*.

A manutenção dos fungos micorrízicos e endofíticos em uma coleção pode ser útil para buscar fungos com potencial utilização na propagação simbiótica de outras espécies de orquídeas. Nesse sentido, *E. secundum* será um importante modelo para compreensão da ecologia da associação micorrízica em orquídea.

## Agradecimentos

Ao Instituto Estadual de Florestas, pela autorização de coleta na área de conservação do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – MG. Ao CNPq, pelo financiamento do projeto 470443/2006-5 e pelas bolsas de pesquisas.

## Referências bibliográficas

- Cameron, D.D.; Leake, J.R. & Read, D.J. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **New Phytologist** 171: 405-416.
- Cameron, D.D.; Johnson, I.; Leake, J.R. & Read, D.J. 2007. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **Annals of Botany** 99: 831-834.
- Cameron, D.D.; Johnson, I.; Leake, J.R. & Read, D.J. 2008. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. **New Phytologist** 180: 176-184.
- Dearnaley, J.D.W. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. **Mycorrhiza** 17: 475-486.
- Dixon, K. 1987. Raising terrestrial orchids from seed. Pp.47-100. In: Harris, W.K. (Ed.) **Modern orchid growing for pleasure and profit**. Orchid Club of South Australia Inc.
- Freudenstein, J.V.; van den Berg, C.; Goldman, D.H.; Kores, P.J.; Molvray, M. & Chase, M.W. 2004. An expanded plastid DNA phylogeny of Orchidaceae and analysis of jackknife branch support strategy. **American Journal of Botany** 91: 149-157.
- Hadley, G. 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. **New Phytologist** 69: 1015-1023.
- Massey, E.E. & Zettler, L.W. 2007. An expanded role for *in vitro* symbiotic seed germination as a conservation tool: two case studies in North America (*Platanthera leucophaea* and *Epidendrum nocturnum*). **Lankesteriana** 7(1-2): 303-308.
- McCormick, M.K.; Whigham, D.F. & O'Neill, J. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. **New Phytologist** 163: 425-438.
- McKendrick, S.L.; Leake, J.R.; Taylor, D.L. & Read, D.J. 2002. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. **New Phytologist** 154: 233-247.
- Nogueira, R.E.; Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Lanna, M.C. & Mendonça, M. 2005. Fungos micorrízicos associados e orquídeas em campos rupestres na Região do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 3: 417-424.
- Otero, J.T.; Bayman, P. & Ackerman, J.D. 2005. Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* *in vitro*: the potential for natural selection. **Evolutionary Ecology** 19: 29-43.
- Ovando, I.; Damon, A.; Bello, R.; Ambrosio, D. Albores, V. Adriano, L. & Salvador, M. 2005. Isolation of endophytic fungi and their mycorrhizal potential for the tropical epiphytic orchids *Cattleya skinneri*, *C. aurantiaca* and *Brassavola nodosa*. **Asian Journal of Plant Sciences** 4(3): 309-315.
- Pereira, O.L.; Rollemberg, C.L. & Kasuya, M.C.M. 2002. Associações micorrízicas em orquídeas: perspectivas e utilização em programas de propagação simbiótica. **Orquidário** 16(2): 40-44.
- Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Borges, A.C. & Araújo, E.F. 2005a. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. **Canadian Journal of Botany** 83: 54-65.
- Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Rollemberg, C.L. & Borges, G.M. 2005b. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizotonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 29: 191-197.
- Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Rollemberg, C.L. & Borges, A.C. 2005c. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizotonióides. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 29: 199-206.

- Pereira, M.C.; Kasuya, M.C.M.; Pereira, O.L.; Costa, M.D. & Rocha, R.B. 2009. Diversidade de fungos micorrízicos *Epulorhiza* spp. isolados de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **33**: 1187-1197.
- Peterson, R.L.; Massicotte, H.B. & Melville, L.H. 2004. **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. NRC Research Press.
- Phillips, J.M. & Hayman, D.S. 1970. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transaction of the British Mycological Society** **55**: 158-161.
- Pinheiro, F. & Barros, F. 2007. *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. denticulatum* Barb. Rodr. (Orchidaceae): caracteres úteis para a sua delimitação. **Hoehnea** **34**(4): 563-570.
- Rasmussen, H.N. 1995. **Terrestrial orchid: from seed to mycotrophic plant**. Cambridge, Cambridge University Press.
- Rasmussen, H.N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. **Plant and Soil** **244**: 149-163.
- Smith, S.E. & Read, D.J. 1997. **Mycorrhizal Symbiosis**. 2.ed. Academic Press.
- Shan, X.C.; Liew, E.C.; Weatherhead, M.A. & Hodkiss, L.J. 2002. Characterization and taxonomy placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. **Mycologia** **94**(2): 230-239.
- Sharma, J.; Zettler, L.W.; van Sambeek, J.W.; Ellersieck, M.R. & Starbuck, C.J. 2003. Symbiotic seed germination and mycorrhizae of federally threatened *Platanthera praeclara* (Orchidaceae). **The American Midland Naturalist** **149**(1): 104-120.
- Shefferson, R.P.; Taylor, D.L.; Weiß, M.; Garnica, S.; et al. 2007. The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. **Evolution** **61**(6): 1380-1390.
- Stewart, S.L. & Zettler, L.W. 2002. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. **Aquatic Botany** **72**: 25-35.
- Stewart, S.S. & Kane, M.E. 2006. Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell Tissues and Organ Culture** **86**: 159-167.
- Stewart, S.L. & Kane, M.E. 2007. Symbiotic seed germination and evidence for *in vitro* mycobiont specificity in *Spiranthes brevilabris* (Orchidaceae) and its implications for species-level conservation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** **43**:178-186.
- Taylor, D.L. & Bruns, T.D. 1999. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza macula* and *C. mertensiana*. **Molecular Ecology** **8**: 1719-1732.
- van den Berg, C.; Higgins, W.E.; Dressler, R.L.; Whitten, W.M.; Arenas, M.A.S.; Culhan, A. & Chase, M.W. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacer (ITS) of nuclear ribosomal DNA. **Lindleyana** **15**: 96-114.
- van den Berg, C.; Goldman, D.H.; Freudenstein, J.V.; Pridgeon, A.M.; Cameron, K.M. & Chase, M.W. 2005. An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). **American Journal of Botany** **92**: 613-624.
- Zettler, L.W. 1997. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. **Selbyana** **18**: 188-194.
- Zettler, L.W. & McInnis, T.M. Jr. 1992. Propagation of *Platanthera integrilabia* (Correll) Luer, an endangered terrestrial orchid, through symbiotic seed germination. **Lindleyana** **7**: 154-161.
- Zettler, L.W. & McInnis, T.M. Jr. 1993. Symbiotic seed germination and development of *Spiranthes cernua* (L.) L.C. Rich and *Goodyera pubescens* (Wild.) R. Br. (Orchidaceae: Spiranthoideae). **Lindleyana** **8**: 155-162.
- Zettler, L.W. & McInnis, T.M. Jr. 1994. Light enhancement of symbiotic seed germination and development of an endangered terrestrial orchid (*Platanthera integrilabia*). **Plant Science** **102**: 133-138.
- Zettler, L.W. & Hofer, C.J. 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, L.W.; Delaney, T.W. & Sunley, J.A. 1998. Seed propagation of epiphytic green-fly orchid, *Epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus. **Selbyana** **19**: 249-253.
- Zettler, L.W.; Burkhead, J.C. & Marshall, J.A. 1999. Use of a mycorrhizal fungus from *Epidendrum conopseum* to germinate seed of *Encyclia tampensis in vitro*. **Lindleyana** **14**: 102-105.
- Zettler, L.W.; Sharma J. & Rasmussen, F. 2003. Mycorrhizal Diversity. Pp. 185-203. In: Dixon, K. Cribb, P. Kell, S. Barrett, R. (Eds), **Orchid Conservation**. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.