

MARLON CORRÊA PEREIRA

**DIVERSIDADE E ESPECIFICIDADE MICORRÍZICA EM ORQUÍDEAS
DO GÊNERO *Epidendrum***

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

P436d
2009

Pereira, Marlon Corrêa, 1981-

Diversidade e especificidade micorrízica em orquídeas
do gênero *Epidendrum* / Marlon Corrêa Pereira. – Viçosa,
MG, 2009.

xi, 151f. : il ; 29cm.

Orientador: Maria Catarina Megumi Kasuya.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Micorriza. 2. Simbiose. 3. Sequenciamento de
nucleotídeo. 4. Marcadores genéticos. 5. Orquídea - Raízes.
6. *Epulorhiza* - Classificação. 7. *Opadorhiza* - Classificação.
8. *Tulasnella* - Classificação. 9. *Sebacina* - Classificação.
10. *Epidendrum*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 579.51785

MARLON CORRÊA PEREIRA

**DIVERSIDADE E ESPECIFICIDADE MICORRÍZICA EM ORQUÍDEAS
DO GÊNERO *Epidendrum***

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

APROVADA: 28 de Setembro de 2009.

Prof. Olinto Liparini Pereira

Prof. Eustáquio Souza Dias

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Coorientador)

Prof^ª. Elza Fernandes de Araújo
(Coorientadora)

Prof^ª. Maria Catarina Megumi Kasuya
(Orientadora)

A DEUS.

À minha família: Michele.

Aos meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

Esta é uma das raras vezes em que posso escrever em primeira pessoa. Apresentar minha opinião sem justificar com dados ou referências. Não entendam como um manifesto, não é isso. É uma alegria poder escrever esse agradecimento, usar da personalidade e informalidade. Poder falar do sentimento e da fé.

Fé em DEUS, a quem declaro meu amor e gratidão. Onde cheguei, como cheguei e os companheiros que adquiri, só graças a Ele.

À minha querida Michele, esposa e família, a eterna namorada, sempre companheira, meu alento, agradeço por me ajudar a construir essa tese, dia após dia.

Aos meus pais, Manoel e Áurea, e irmãos, Marcone, Maira Dea e Maressa, agradeço pelo apoio em cada momento da minha vida e, agora, nesta realização. À família da Michele: Zé de Oliveira, Mariuza e Leilane, agradeço pelo apoio, incentivos e orações.

À minha grande orientadora, Prof^a. Catarina, agradeço por ter investido seu tempo, participando não apenas das pesquisas, mas também do meu dia-a-dia, das minhas quedas e vitórias. Espero que trabalhe sempre juntos para que eu possa continuar aprendendo com a professora, pesquisadora e pessoa que é.

Ao Prof. Maurício, agradeço pela amizade, pela compreensão, pelos conselhos, por cada dia.

Agradeço aos meus coorientadores, Prof^a. Elza e Prof. Tótola. Deixaram sempre os laboratórios e os equipamentos à minha disposição, não negando atenção às minhas dúvidas e dificuldades.

Agradeço ao Prof. Olinto, sempre com boas sugestões, muita disposição para ajudar e com palavras de otimismo.

Ao Prof. Eustáquio, agradeço pela disposição de participar da banca e pelas sugestões dadas ao longo da produção do texto dessa tese.

Agradeço ao Luiz Fernando, ao André Paviote e ao Kaio Almeida pelo auxílio nas coletas nas áreas do Espírito Santo. Também agradeço aos funcionários do PESB (Parque Estadual da Serra do Brigadeiro), especialmente Anderson e Abel, pela contribuição nas coletas nas áreas desse parque.

Aos amigos do Departamento de Microbiologia: professores, estudantes e funcionários, agradeço por cada momento, cada ajuda, cada conversa.

Aos amigos do Laboratório de Associações Micorrízicas, companheiros nos últimos 8 anos, agradeço por tudo. Em especial, agradeço aos meus companheiros de micorriza em orquídea, às Meninas “Super Poderosas”, Denise, Fernanda e Sabrina, à Cristiane, ao “Menino do Dedo Verde”, Tomás, e à Melissa. Também agradeço à Nívea e à grande Ireninha pelas contribuições.

Agradeço à Professora Karla pela ajuda durante as análises das seqüências estudadas e aos demais professores das disciplinas que cursei.

Aos companheiros da UFV Campus de Rio Paranaíba: professores companheiros de sala, demais professores, diretoria e técnicos, agradeço por contribuírem no meu último ano do doutorado.

Aos meus companheiros e amigos da Igreja Presbiteriana de Viçosa e da Igreja Presbiteriana Betel, em Rio Paranaíba, minha gratidão, meu carinho e minha amizade.

Agradeço ao IEF pela autorização e auxílios nas coletas no PESB.

Agradeço ao Departamento de Microbiologia, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, ao BIOAGRO, à Universidade Federal de Viçosa, ao CNPq, pela concessão de bolsa durante o mestrado e o doutorado e também pelo financiamento do projeto.

BIOGRAFIA

Marlon Corrêa Pereira: nasceu em Ipatinga, Minas Gerais, no dia 6 de outubro de 1981. Filho de Manoel Pereira dos Santos e Áurea Corrêa Pereira, irmão mais novo de Marcone, Maira Dea e Maressa.

Encerrou ensino médio em 1999 e iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa – UFV em 2000. Formou-se em julho de 2004 e logo começou o curso de mestrado em Microbiologia Agrícola no Departamento de Microbiologia – DMB da UFV, com estudos concentrados na área de Microbiologia do Solo. Defendeu a dissertação de mestrado em outubro de 2006, mês em que ingressou no curso de doutorado em Microbiologia Agrícola, também no DMB/UFV e continuou com estudos voltados à Microbiologia do Solo.

Em abril de 2008, foi aprovado em concurso público para professor da UFV, Campus de Rio Paranaíba e entrou em exercício em julho do mesmo ano.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL: DIVERSIDADE E ESPECIFICIDADE DA ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA EM ORQUÍDEAS	1
I. INTRODUÇÃO.....	2
II. AS ORQUÍDEAS.....	3
III. ASSOCIAÇÕES MICORRÍZICAS EM ORQUÍDEAS.....	4
IV. OS FUNGOS MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEAS.....	9
V. DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ASSOCIADOS ÀS ORQUÍDEAS.....	11
VI. ESPECIFICIDADE NA ASSOCIAÇÃO.....	15
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE FUNGOS RIZOCTONIÓIDES MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEA	28
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	31
I. INTRODUÇÃO.....	32
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
III. RESULTADOS.....	40
IV. DISCUSSÃO.....	56
V. CONCLUSÕES.....	62
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
CAPÍTULO 2: FUNGOS MICORRÍZICOS <i>Epulorhiza</i> spp. E <i>Opadorhiza</i> spp. ASSOCIADOS À <i>Epidendrum secundum</i> (ORCHIDACEAE) NO PARQUE ESTADUAL DA SERRA DO BRIGADEIRO – MG	69
RESUMO.....	70
ABSTRACT.....	71
I. INTRODUÇÃO.....	72
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	75
III. RESULTADOS.....	81
IV. DISCUSSÃO.....	93
V. CONCLUSÕES.....	98
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
CAPÍTULO 3: DIVERSIDADE DE FUNGOS E ESPECIFICIDADE NA ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA EM ORQUÍDEAS DO GÊNERO <i>Epidendrum</i>	104
RESUMO.....	105
ABSTRACT.....	107
I. INTRODUÇÃO.....	108

II. MATERIAL E MÉTODOS.....	110
III. RESULTADOS.....	113
IV. DISCUSSÃO.....	120
V. CONCLUSÕES.....	126
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
CAPÍTULO 4: COMPOSIÇÃO TOTAL DE ÁCIDOS GRAXOS DE FUNGOS MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEA <i>Epulorhiza</i> spp.	132
RESUMO.....	133
ABSTRACT.....	134
I. INTRODUÇÃO.....	135
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	137
III. RESULTADOS.....	139
IV. DISCUSSÃO.....	143
V. CONCLUSÕES.....	146
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147
CONCLUSÕES GERAIS.....	151

RESUMO

PEREIRA, Marlon Corrêa, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2009. **Diversidade e especificidade micorrízica em orquídeas do gênero *Epidendrum***. Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya, Coorientadores: Elza Fernandes Araújo e Marcos Rogério Tótola.

As orquídeas associam-se comumente a fungos micorrízicos rizoctonióides pertencentes aos gêneros *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* e *Rhizoctonia*. Esses simbiossiontes fúngicos têm mostrado eficiência em promover a germinação de sementes e o desenvolvimento de protocórmios e plântulas. *Epidendrum* é um dos gêneros de orquídea com o maior número de espécies, as quais são comuns em fragmentos de Mata Atlântica e associam-se com fungos do gênero *Epulorhiza*. Deste modo, os objetivos deste trabalho foram: (i) comparar a utilização das características morfológicas e moleculares na análise da diversidade de fungos rizoctonióides; (ii) aplicar essas características no estudo da diversidade e especificidade micorrízica em *Epidendrum secundum*, natural do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – MG (PESB), e em diferentes espécies de *Epidendrum*, de fragmentos de Mata Atlântica, localizados nos Estados do Espírito Santo, de Minas Gerais e do Rio de Janeiro; e (iii) caracterizar fungos micorrízicos de orquídea com base na composição de ácidos graxos. Características morfológicas qualitativas e quantitativas foram analisadas por técnicas multivariadas, possibilitando distinguir os gêneros *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* e *Rhizoctonia* e as diferentes espécies de fungos micorrízicos *Epulorhiza* spp., o que foi confirmado pelas análises dos resultados do RAPD e ITS-RFLP e da seqüência da região ITS do rDNA. Uma grande diversidade de fungos do gênero *Epulorhiza* e dois isolados de *Opadorhiza* foram observados em onze populações de *E. secundum* localizadas em diferentes regiões de campo de altitude do PESB. Entretanto, a distinção entre *Epulorhiza* e *Opadorhiza*, e também entre algumas espécies de *Epulorhiza* spp., só foi possível pela análise da seqüência da região ITS do rDNA. Fungos *Sebacina* spp. e *Tulasnella* spp., teleomorfos dos gêneros *Opadorhiza* e

Epulorhiza, respectivamente, foram isolados das diferentes espécies de *Epidendrum* estudadas. Foi observada uma grande variabilidade na seqüência da região ITS nos isolados de *Tulasnella* spp., os quais formaram nove clados. Contudo, os isolados de *Sebacina* spp. apresentaram uma menor variabilidade na seqüência dessa região, formando apenas três clados. A análise da composição de ácidos graxos, utilizando a distância de Mahalanobis e o método UPGMA, possibilitou a distinção entre os gêneros *Epulorhiza* e *Ceratorhiza* e entre os isolados de *Epulorhiza* spp. pertencentes a três diferentes clados observados pela análise da região ITS, demonstrando que a análise da composição de ácidos graxos é uma ferramenta útil na caracterização e identificação de fungos rizoctonióides micorrízicos de orquídea. As características morfológicas são importantes ferramentas para distinção de gêneros de fungos rizoctonióides, mas as análises moleculares, seja pela seqüência da região ITS ou pela composição de ácidos graxos, são ferramentas úteis na distinção de algumas espécies e gêneros estudados. Sugere-se que as orquídeas do gênero *Epidendrum*, mesmo apresentando preferência a fungos *Tulasnella/Epulorhiza*, não possuem especificidade a esse gênero de fungo, pois também se associam a fungos do gênero *Sebacina/Opadorhiza*. Este é o primeiro relatado da associação micorrízica entre as orquídeas do gênero *Epidendrum* e os fungos do gênero *Sebacina/Opadorhiza*.

ABSTRACT

PEREIRA, Marlon Corrêa, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2009. **Mycorrhizal diversity and specificity in orchids of genus *Epidendrum***. Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya, Co-Advisers: Elza Fernandes Araújo and Marcos Rogério Tótola.

Orchids are usually associated with *Rhizoctonia*-like mycorrhizal fungi belonging to *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* and *Rhizoctonia* genera. These fungal symbionts have shown efficiency to promote seed germination and development of protocorms and seedlings. *Epidendrum* is a genus of orchid with the largest number of species, which are common in Atlantic Forest fragments and associate with *Epulorhiza* fungi. Thus, the objectives of this work were: (i) to compare morphological and molecular characteristics in the analysis of *Rhizoctonia*-like fungi diversity; (ii) to apply these characteristics in study of mycorrhizal diversity and specificity in *Epidendrum secundum*, natural from Serra do Brigadeiro State Park – MG (SBSP), and in different orchids species of *Epidendrum*, from Atlantic Forest fragments located in Espírito Santo, Minas Gerais and Rio de Janeiro States; (iii) and to characterize orchid mycorrhizal fungi based on fatty acid composition. Qualitative and quantitative morphological characteristics were analyzed using multivariate techniques, distinguishing among *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* and *Rhizoctonia* genera and different species of *Epulorhiza* spp. mycorrhizal fungi, which was confirmed by analyses of RAPD, ITS-RFLP and ITS rDNA sequence. A great diversity of *Epulorhiza* fungi and two *Opadorhiza* isolates were observed in eleven *E. secundum* populations located in different regions of “campo de altitude” of SBSP. However, the distinction between *Epulorhiza* and *Opadorhiza*, as well as among some *Epulorhiza* species, was possible just through analysis of ITS rDNA sequence. *Sebacina* and *Tulasnella* fungi, teleomorphs of the anamorphic genera *Opadorhiza* and *Epulorhiza*, respectively, were obtained from different species of *Epidendrum* studied. A great variability was observed on ITS sequence of *Tulasnella* spp. isolates, which formed nine clades. However, *Sebacina* spp. isolates showed lower variability in this sequence, forming only three clades. The

analysis of fatty acid composition, using Mahalanobis distance and the UPGMA method, allowed the distinction between *Epulorhiza* and *Ceratorhiza* genera and among *Epulorhiza* spp. belonging to three different clades observed by the analysis of ITS sequence, demonstrating that the analysis of fatty acid composition is a useful tool to characterization and identification of *Rhizoctonia*-like mycorrhizal fungi of orchids. The morphological characteristics are important tools to distinction of some species and genera studied. It is suggest that *Epidendrum* orchids, even showing preference to *Tulasnella/Epulorhiza* fungi, do not present specificity to this fungal genus, because they associate with *Sebacina/Opadorhiza* fungi. This is the first report of association among *Epidendrum* orchids and *Sebacina/Opadorhiza* fungi.

INTRODUÇÃO GERAL

DIVERSIDADE E ESPECIFICIDADE DA ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA EM ORQUÍDEAS

I. INTRODUÇÃO

Após o primeiro relato da colonização de células de plântulas de orquídea por hifas fúngicas, em 1840, os estudos seguintes concluíram que a colonização das raízes por essas estruturas fúngicas era universal na família Orchidaceae e que existia uma relação funcional entre a nutrição da orquídea e a presença da hifa endofítica, a qual foi interpretada como relação de mutualismo e definida como uma associação micorrízica (Arditti, 1992; Andersen e Rasmussen, 1996). Contudo, além de auxiliar na nutrição da planta adulta, observou-se que esses fungos eram essenciais à germinação de sementes, sendo, deste modo, indispensáveis à realização do ciclo de vida da orquídea hospedeira na natureza (Arditti, 1992; Andersen e Rasmussen, 1996; Smith e Read, 1997).

A maioria dos fungos endofíticos isolados do sistema radicular das orquídeas, denominados como fungos micorrízicos de orquídea, têm sido identificados como basidiomicetos pertencentes ao gênero *Rhizoctonia* D.C., um agrupamento complexo de fungos filamentosos referidos como *Rhizoctonia-like* ou rizoctonióides (Currah e Zelmer, 1992; Andersen e Rasmussen, 1996; Stalpers e Andersen, 1996). Esses fungos apresentam estado imperfeito não esporulante, ramificação em ângulo reto, constrição da hifa na base da ramificação, formação de células monilióides e escleródios (Currah e Zelmer, 1992; García et al., 2006). Cinco gêneros de fungos rizoctonióides já foram identificados como micorrízicos de orquídeas, os quais apresentam grande diversidade morfológica e molecular (Otero et al., 2002; Shan et al., 2002; Pereira et al., 2005b;c; Pereira, 2006; Dealaney, 2007). Eles apresentam grande eficiência em promover a germinação da semente e o desenvolvimento do embrião da orquídea à plântula, sendo promissora a sua aplicação em programas de produção de mudas de orquídeas tanto para fins comerciais como para fins de reintrodução (Zettler, 1997; Pereira et al., 2002; 2005a; Zettler et al., 2003; Pereira, 2004). Entretanto, para isso, a seleção prévia de simbiossiontes mais eficientes é necessária, pois, em geral, há certo grau de especificidade na associação orquídea/fungo micorrízico (Thompson,

1994; Taylor e Bruns, 1999). Deste modo, a especificidade é um fator crítico no estabelecimento dessas plantas no campo (Mckendrick et al., 2002; Fay e Krauss, 2003).

A importância dessa associação micorrízica na natureza é explicada pelas características intrínsecas das orquídeas e de seus simbiontes fúngicos (Arditti, 1992; Rasmussen, 1995; Dearnaley, 2007). O papel desses fungos micorrízicos no desenvolvimento e na distribuição das orquídeas na natureza tem incentivado vários estudos para que se possa compreender a ecologia da associação e elaborar metodologias utilizando esses fungos na produção simbiótica de mudas (Pereira et al. 2002; Taylor et al., 2002).

II. AS ORQUÍDEAS

Orchidaceae é uma das maiores famílias entre as angiospermas, sendo estimado um número de espécies variando entre 20.000 e 35.000, que estão distribuídas em cinco subfamílias e em mais de 500 gêneros (Peterson et al., 1998; 2004; Cribb et al., 2003). Os membros dessa família ocupam uma variedade de ambientes na natureza e desenvolveram, ao longo da evolução, características morfológicas e reprodutivas variadas e distintas (Arditti, 1992; Peterson et al., 1998; 2004).

Uma característica comum das diferentes espécies de orquídea é a produção de sementes excessivamente pequenas, semelhantes a pó (Peterson et al., 1998). As sementes possuem um embrião minúsculo, suspenso dentro de uma testa reticulada e cercado por grande volume de ar (Arditti, 1992). Podem apresentar massa de 3 a 4 µg, comprimento de 0,4 a 1,25 mm e largura de 0,08 a 0,27 mm (Arditti, 1992; Peterson et al., 1998; Arditti e Ghani, 2000). O número de sementes produzidas por algumas espécies é de, aproximadamente, 1.300 por cápsula, enquanto outras podem produzir até 4 milhões (Arditti, 1992; Arditti e Ghani, 2000). Clements (1988) observou quatro regiões no embrião das espécies do gênero *Pterostylis*: a do suspensor, a epidérmica, a cortical e a

meristemática. O embrião é simples e indiferenciado, não contém os meristemas apicais da raiz e da parte aérea e é formado por células parenquimáticas (Clements, 1988; Arditti, 1992; Peterson et al., 1998; 2004). A fusão tripla entre os núcleos polares e o núcleo espermático ocorre na maioria das orquídeas, mas este núcleo triploide é degenerado imediatamente e, conseqüentemente, o endosperma não se desenvolve (Arditti, 1992). Sem a formação do endosperma, falta o tecido de reserva de nutrientes para permitir a germinação da semente e o estabelecimento da plântula em condições naturais (Arditti, 1992; Peterson et al., 1998). As sementes podem apresentar corpos lipídicos, corpos protéicos ou glicoproteínas, inclusões globóides de fitina nos corpos protéicos e, raramente, grãos de amido, que são, porém, insuficientes para permitir o completo desenvolvimento do embrião na ausência da infecção fúngica (Arditti, 1992; Rasmussen, 1995; Pereira, 2004; Pereira et al., 2005a). Sementes de algumas espécies são capazes de germinar na ausência do simbionte fúngico, chegando a sintetizar clorofila, mas não se desenvolvem até a formação da primeira folha (Arditti, 1992).

Após a germinação, o embrião da semente de orquídea desenvolve-se formando o protocórmio, estrutura heterotrófica originada a partir da diferenciação das células do embrião (Peterson et al., 1998; 2004). O protocórmio depende do fungo simbionte para a obtenção de nutrientes e carboidratos, o que possibilita o seu desenvolvimento a plântula (Leake, 1994; Rasmussen, 1995; Peterson et al., 2004; Dearnaley, 2007). Essa relação é denominada mico-heterotrofismo e é observada em todas as orquídeas clorofiladas e aclorofiladas (Arditti, 1992; Leake, 1994; Rasmussen, 1995; Smith e Read, 1997; Peterson et al., 1998; Dearnley, 2007).

III. ASSOCIAÇÕES MICORRÍZICAS EM ORQUÍDEAS

A primeira observação de estruturas fúngicas que colonizavam células de plântulas de orquídea foi relatada por Link, em 1840 (Andersen e Rasmussen, 1996). Em 1853, Irmisch descreveu hifas fúngicas que colonizavam o rizoma de uma orquídea aclorofilada, *Corallorhiza innata* R.

Br. (Andersen e Rasmussen, 1996). Em 1886, após estudar várias orquídeas, Wahrlich observou a digestão das hifas dentro das células da planta e estabeleceu que a colonização das raízes por fungos é regra na família Orchidaceae (Arditti, 1992). Foi então que, em 1891, Frank sugeriu a existência de relação funcional entre a nutrição da orquídea e a presença da hifa endofítica, relação mutualista por ele definida como associação micorrízica (Arditti, 1992; Andersen e Rasmussen, 1996). Bernard descreveu o papel do fungo na germinação das sementes de orquídea em 1899 e, até 1909, já havia isolado alguns fungos associados às orquídeas na natureza, identificando-os como *Rhizoctonia*-like, isto é, fungos rizoctonióides (Arditti, 1992; Andersen e Rasmussen, 1996; Smith e Read, 1997). Desde então, os pesquisadores têm se empenhado em isolar e identificar fungos micorrízicos associados às orquídeas, em discutir a especificidade na associação e em desenvolver novas técnicas para utilização dessa associação na propagação simbiótica de mudas de orquídeas para horticultura comercial e reintrodução de espécies ameaçadas de extinção (Andersen e Rasmussen, 1996; Zettler, 1997; Pereira, 2004; Pereira et al., 2005a; b; c).

A principal característica da associação micorrízica em orquídeas é a presença de complexos novos de hifas, os *pelotons*, formados dentro das células colonizadas pelo fungo micorrízico (Smith e Read, 1997; Peterson et al., 2004; Sylvia et al., 2005). Os *pelotons* podem ser observados em células dos protocórmios, das raízes, dos tubérculos e dos rizomas de orquídeas associadas ao simbionte fúngico (Arditti, 1992; Rasmussen, 1995). O *peloton*, quando bem desenvolvido, pode ocupar quase todo o volume celular, provendo extensa superfície de contato entre os simbiontes (Peterson et al., 1998).

A participação do fungo micorrízico nos processos de germinação das sementes, de desenvolvimento dos protocórmios e de estabelecimento das plântulas das orquídeas já é bem estabelecida (Rasmussen, 1995; Smith e Read, 1997; Peterson et al., 2004; Dearnaley, 2007). Atualmente, os estudos têm buscado compreender o funcionamento dessa associação nas orquídeas adultas. Em relação às

orquídeas aclorofiladas, o fungo é a verdadeira fonte de nutrientes, fornecendo tanto o carbono como os minerais necessários à manutenção do metabolismo da planta, que é mico-heterotrófica durante todo o seu ciclo de vida (Leake, 1994; 2005; Dearnaley, 2007). Os carboidratos fornecidos às orquídeas aclorofiladas pelos fungos são, geralmente, obtidos de outras plantas clorofiladas ou a partir da decomposição de materiais orgânicos no solo (Leake, 1994; Zelmer e Currah, 1995a; Peterson et al., 2004; Dearnaley, 2007). As orquídeas clorofiladas, após adquirirem a capacidade de fotossintetizar, dependem dos fungos, principalmente, para obtenção de minerais, tais como fósforo e nitrogênio (Dijk et al., 1997; Smith e Read, 1997; Cameron et al., 2007; Dearnaley, 2007). Mesmo estando fotossinteticamente ativas, essas plantas continuam a obter carbono do fungo, mas transferem para o fungo mais do que cinco vezes a quantidade de carbono que recebem, caracterizando assim um fluxo bidirecional de carbono entre os simbiossiontes (Cameron et al., 2006; 2008).

Para promover a germinação, o fungo precisa infectar e colonizar a semente. Esse processo é iniciado pela penetração da hifa fúngica pela micrópila ou falhas do tegumento da testa da semente, atravessando a parede celular pela região do suspensor do embrião e colonizando, célula-a-célula, o parênquima cortical do protocórmio (Clements, 1988; Rasmussen, 1995; Peterson et al., 1998; 2004). A primeira infecção também pode ocorrer nos rizóides ou nas células da protoderme (Rasmussen, 1995; Peterson et al., 1998). Os rizóides, extensões de uma célula protodérmica, são, geralmente, formados na parte basal do protocórmio após o intumescimento das células embrionárias e rompimento da testa da semente (Arditti, 1992; Rasmussen, 1995; Peterson et al., 1998). Raramente observa-se a colonização das células da protoderme do protocórmio e daquelas que originarão o meristema apical da parte aérea e, posteriormente, as folhas (Rasmussen, 1995; Pereira, 2004; 2006).

A produção de enzimas hidrolíticas, como polifenol oxidase, pode estar envolvida no processo de infecção da semente pelo fungo, pois

essas enzimas atuam na desorganização de áreas localizadas da parede celular, o que possibilita à hifa colonizar as células do embrião (Rasmussen, 1995; Peterson et al., 2004). Dentro da célula, a hifa se ramifica e se enovela rapidamente formando os *pelotons* (Rasmussen, 1995; Smith e Read, 1997). Entretanto, o processo de colonização depende de um balanço delicado de compostos antifúngicos, as fitoalexinas, que são produzidos pelo hospedeiro e que regulam a associação simbiótica durante a germinação e a formação do *peloton* (Rasmussen, 1995; Shimura et al., 2007). Esses *pelotons* são recobertos por material similar ao da parede celular, sendo separados do citoplasma da célula por uma membrana perifúngica, que é uma modificação da membrana plasmática da célula hospedeira (Peterson e Currah, 1990; Rasmussen, 1995; Peterson et al., 1996; 1998; 2004).

No sistema radicular, pode-se observar a colonização das células corticais, onde os *pelotons* apresentam distribuição variada (Rasmussen, 1995; Pereira et al., 2005b; c). Enquanto algumas espécies de orquídeas apresentam colonização de poucas células em uma região limitada do córtex da raiz, outras apresentam colonização em toda a extensão da raiz e em quase todo o córtex (Rasmussen, 1995; Pereira et al., 2005a; b; c). Em orquídeas terrestres, quase toda a área do córtex é colonizada (Arditti, 1992). Nas orquídeas epífitas, a colonização do córtex ocorre apenas nas regiões periféricas em contato com o substrato (Arditti, 1992). O fungo compatível pode penetrar na raiz através dos pêlos radiculares ou pelas células epidérmicas comuns, utilizando as células de passagem da exoderme para atingir o córtex (Rasmussen, 1995; Linhares, 2006). A partir da extremidade da raiz, um gradiente de maturação do tecido pode ser observado: as células do meristema da raiz, a zona de células de armazenamento de amido, a zona de células vacuoladas sem amido, mas contendo *pelotons* intactos, e a zona de lise dos *pelotons* (Rasmussen, 1995). Na face externa do córtex, *pelotons* são mantidos intactos, o que tem sido interpretado como uma forma da planta garantir a presença do simbionte para recolonizar as células que tiveram os *pelotons* degradados (Rasmussen, 1995; Smith e Read, 1997; Peterson et al., 2004).

Entretanto, tal organização pode ser sazonal, variar de acordo com as condições de crescimento ou com a espécie (Rasmussen, 1995).

A degradação do *peloton* é observada em todas as etapas de desenvolvimento da planta (Arditti, 1992). A infecção pelo fungo micorrízico e a lise do *peloton* formado ocorre repetidamente em uma mesma célula cortical, sugerindo que possa haver uma alternância rítmica ou sazonal entre os períodos de crescimento intracelular da hifa e o estágio de digestão do *peloton* (Rasmussen, 1995, Rasmussen e Whigham, 2002). Fosfatase ácida, 1,3- β -glucanase endoquitinase e *N*-acetilglucosaminidase são exemplos de enzimas detectadas em plântulas micorrizadas que podem estar relacionadas com a utilização do endofítico como fonte de nutrientes pelo hospedeiro (Rasmussen, 1995). Sais minerais, carboidratos e outros compostos orgânicos, necessários ao desenvolvimento da orquídea, são obtidos a partir da degradação da parede celular e da hidrólise dos compostos presentes no citoplasma da hifa, tais como glicogênio, lipídeos e proteínas, sendo o transporte de nutrientes efetuado após a morte da hifa ou enquanto a mesma está viva (Rasmussen, 1995).

O fungo provê níveis adequados de água para que a germinação ocorra e auxilia na obtenção de água durante o desenvolvimento do protocórmio, o que garante maior resistência à dessecação (Yoder et al., 2000). A disponibilidade de nitrogênio e fósforo possui papel crítico no crescimento e desenvolvimento das orquídeas (Dijk et al., 1997). Nas primeiras fases do desenvolvimento, o crescimento da orquídea é completamente dependente do fungo micorrízico para absorção destes minerais (Dijk et al., 1997). Como as raízes das orquídeas são pouco ramificadas e pouco numerosas, o fungo tem papel crucial na captação de nutrientes e água, uma vez que os fungos ampliam a área de absorção no substrato (Smith e Read, 1997; Peterson et al., 2004).

Os fungos micorrízicos de orquídeas apresentam diferentes papéis na natureza. Warcup (1988) observou a germinação de sementes de orquídeas terrestres em associação com o fungo ectomicorrízico *Sebacina vermifera* Oberwinkler. Do mesmo modo, Zelmer e Currah

(1995a) observaram que isolados de *Corallorhiza trifida* Châtelain formam ectomicorrizas em *Pinus contorta* Douglas ex Loudon. Nesses casos, a orquídea pode obter os carboidratos necessários ao seu desenvolvimento da planta ectomicorrizada e para isso utiliza o fungo como a ponte de conexão que realiza o transporte (Rasmussen, 2002; Peterson et al., 2004). *Lentinus edodes* Berk., *Erthrorchis ochobienses* (Hayata) Garay, assim como outros fungos da podridão de madeira, podem promover o desenvolvimento simbiótico de orquídeas aclorofiladas (Umata, 1998). Nesses casos, o fungo obtém carboidratos degradando o carbono complexado na madeira e o fornece para a planta (Umata, 1998; Rasmussen, 2002). Fungos potencialmente fitopatogênicos, a exemplo de isolados de *Rhizoctonia solani* Kühn, também formam associação micorrízica com diversas orquídeas (Perkins e McGee, 1995; Carling et al., 1999). Fungos do gênero *Epulorhiza* são estritamente saprófitas e têm sido isolados de orquídeas terrestres com frequência (Currah e Zelmer, 1992; Currah et al., 1997; Pereira et al., 2003). O carbono fornecido às orquídeas associadas com fungos *Epulorhiza* é fruto da degradação da matéria orgânica presente no substrato (Rasmussen, 2002; Peterson et al., 2004).

IV. OS FUNGOS RIZOCTONIÓIDES MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEAS

Os fungos rizoctonióides micorrízicos de orquídeas podem ser denominados de duas formas: (i) pelos nomes anamórficos, baseados em características vegetativas, tais como morfologia da hifa e das estruturas assexuais; e (ii) pelos nomes teleomórficos, baseados em características das estruturas reprodutivas sexuais, ou seja, características macroscópicas e microscópicas dos esporocarpos (Andersen e Rasmussen, 1996; García et al., 2006). Estruturas sexuais geralmente fornecem caracteres mais informativos para a taxonomia e sistemática do que as estruturas vegetativas (Currah e Zelmer, 1992; Andersen e Rasmussen, 1996). Entretanto, os fungos micorrízicos de orquídeas dificilmente apresentam-se em estágio sexuado e, conseqüentemente,

são relacionados aos gêneros anamórficos (Zelmer e Currah, 1995b; Andersen e Rasmussen, 1996; García et al., 2006).

Os principais fungos micorrízicos de orquídeas pertencem ao grupo dos *Rhizoctonia*-like (Currah e Zelmer, 1992; Andersen e Rasmussen, 1996; García et al., 2006), ou seja, rizoctonióides (Pereira et al., 2005b). Eles se caracterizam por apresentar: (i) constrição da hifa na região do septo; (ii) ramificação da hifa logo após o septo e em ângulo reto; (iii) presença de cadeias de células intumescidas, as células monilióides, que são propágulos assexuais de resistência; (iv) formação de escleródios; (v) septo dolipórico complexo; (vi) ausência de esporos assexuados e (vii) ciclo sexual raro e de difícil observação (Stalpers e Andersen, 1996; Pereira, 2001; Taylor et al., 2002; García et al., 2006).

Moore (1987) correlacionou os gêneros anamórficos e teleomórficos dos fungos rizoctonióides. Os gêneros anamorfo/ teleomorfo observados em associação com as orquídeas são *Ascorhizoctonia* Yang & Korff/ *Tricharina* Eckblad, *Ceratorhiza* R.T. Moore/ *Ceratobasidium* D.P. Rogers, *Epulorhiza* R.T. Moore emend Andersen & R.T. Moore/ *Tulasnella* Schröeter, *Moliniopsis* Ruhland. (Sin. = *Rhizoctonia* D.C.)/ *Thanatephorus* Donk. (Sin = *Botryobasidium* Donk p.p.) e *Opadorhiza* Andersen & R.T.Moore/ *Sebacina* Tul. (Moore, 1987; 1996; Andersen e Rasmussen, 1996; Taylor et al., 2002; García et al., 2006; Dearnaley, 2007). A identificação do gênero anamórfico dos fungos micorrízicos de orquídeas pode ser realizada utilizando-se chaves taxonômicas baseadas em características culturais, morfológicas e fisiológicas (Currah e Zelmer, 1992; Currah et al., 1997). Entretanto, o processo de identificação é trabalhoso e demanda muito tempo, incentivando a utilização de técnicas moleculares (Taylor et al., 2002).

Segundo a chave taxonômica apresentada por Currah e Zelmer (1992), os três principais gêneros de fungos micorrízicos de orquídeas, *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* e *Rhizoctonia*, são diferenciados pelo aspecto da colônia, número de núcleos por célula e diâmetro da hifa. Os fungos pertencentes ao gênero *Epulorhiza* caracterizam-se culturalmente por apresentarem colônia de coloração creme, crescimento lento, margem da

colônia submersa no meio, micélio aéreo escasso e aspecto mucoso (Currah e Zelmer, 1992; Currah et al., 1997). Entretanto, quando aspecto é cotonoso, a colônia apresenta margem submersa e crescimento lento. O diâmetro de hifa da maioria dos fungos pertencentes ao gênero *Epulorhiza* é menor do que 4 µm (Currah e Zelmer, 1992; Currah et al., 1997). Espécies pertencentes ao gênero *Ceratorhiza* também possuem células da hifa binucleadas, mas apresentam micélio aéreo abundante, margem emersa e diâmetro de hifa vegetativa maior do que 4 µm (Currah e Zelmer, 1992). As espécies de *Rhizoctonia* possuem células multinucleadas, micélio aéreo abundante e diâmetro de hifa vegetativa maior do que 4 µm (Currah e Zelmer, 1992). Moore (1987) observou que o septo dolipórico também auxilia na identificação destes gêneros, pois fungos *Epulorhiza* spp. apresentam parenteossomo imperfurado, enquanto os outros dois anamorfos possuem parenteossomo perfurado.

V. DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ASSOCIADOS ÀS ORQUÍDEAS

Há uma grande diversidade de fungos capazes de estabelecer associação micorrízica com orquídeas (Rasmussen, 2002; Dearnaley, 2007). Representantes de cinco dos sete gêneros anamórficos de fungos rizoctonióides são capazes de estabelecer essa associação (Rasmussen, 2002; García et al., 2006; Dearnaley, 2007). Além desses, fungos de outros gêneros têm sido identificados como micorrízicos de orquídea, a exemplo: *Russula* e *Phialophora* (Dearnaley, 2007).

Segundo Prosser (2002), a análise da diversidade é particularmente importante quando se considera a habilidade dos ecossistemas em responder às mudanças das condições ambientais, a necessidade de conservar o consórcio genético microbiano e as ligações entre diversidade, processos do ecossistema, diversidade funcional e fisiológica, resiliência e sustentabilidade. Além disso, o estudo da diversidade de fungos associados a determinada espécie de orquídea ou grupos de orquídeas possibilita compreender a ecologia e a especificidade dessa associação em campo (Zettler, 1997; Taylor et al.,

2002; Fay e Kraus, 2003, Zettler et al., 2003). Deste modo, estudos de diversidade são de grande importância para a elaboração de estratégias de conservação das orquídeas e dos seus simbiontes fúngicos, e para a aplicação biotecnológica dessa associação (Zettler, 1997; Pereira et al., 2002; Fay e Kraus, 2003; Zettler et al., 2003; Otero et al., 2007).

O número de espécies desses fungos é indeterminado e poucas espécies têm sido descritas, em razão das dificuldades concernentes à identificação dos simbiontes (Taylor et al., 2002). Vários simbiontes novos têm sido detectados por meio de técnicas moleculares baseadas em regiões conservadas do DNA total, porém, a maioria dos estudos tem sido realizada dispensando o isolamento dos fungos micorrízicos e propondo a identificação dos simbiontes apenas em nível de gênero (Taylor e Bruns, 1999; Otero et al., 2002; 2007; Selosse et al., 2002; Kristiansen et al., 2004; McCormick et al., 2004; Weiss et al., 2004; Suárez et al., 2006; 2008; Bonnardeaux et al., 2007; Shefferson et al., 2007; 2008).

A diversidade dos simbiontes tem sido estudada pela análise da variabilidade existente entre os pertencentes a diferentes gêneros, a um mesmo gênero ou a uma mesma espécie (Horton e Bruns, 2001; Prosser, 2002; Rasmussen, 2002; García et al., 2006). Para isso, pode-se utilizar, para comparação, características morfológicas e características moleculares, sendo as últimas avaliadas por meio de diferentes técnicas baseadas na composição do DNA total desses fungos (Rasmussen, 2002; Shan et al., 2002; Taylor et al., 2002; Pereira, 2006).

As características morfológicas avaliadas durante a caracterização de isolados de fungos rizoctonióides têm sido utilizadas para agrupá-los através de técnicas biométricas que permitem o cálculo de medidas de distâncias, a partir de dados qualitativos e quantitativos, por exemplo, a análise de dados quantitativos pela técnica de variáveis canônicas (Cruz e Regazzi, 1997; Pereira, 2006). Características qualitativas (cor, aspecto, presença de micélio aéreo, margem da colônia e condição nuclear) e características quantitativas (taxa de crescimento, diâmetro de colônia, dimensões das células monilióides e diâmetro de hifa) possibilitam determinar a variabilidade existente entre os isolados

estudados para, em seguida, concluir quais se assemelham ou distinguem-se (Pereira et al., 2005c; Linhares, 2006; Pereira, 2006).

A técnica PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) é muito utilizada na caracterização dos fungos micorrízicos de orquídeas cultivados *in vitro* e daqueles presentes na micorriza, sem necessidade de isolamento (Taylor e Bruns, 1999; Taylor et al., 2004; Pereira et al., 2005c; Shefferson et al., 2007). A partir desta técnica, o polimorfismo de fragmentos de restrição da região ITS (Internal Transcribed Spacer) de simbiontes desconhecidos, isolados ou não, podem ser diferenciados e identificados pela comparação com o polimorfismo observado em fungos previamente identificados (Taylor e Bruns, 1999; Taylor et al., 2004; Pereira et al., 2005c; Shefferson et al., 2007).

Pereira et al. (2005c) diferenciaram sete fungos rizoctonióides isolados de raízes de sete espécies de orquídeas brasileiras, pela análise da região ITS do rDNA por PCR-RFLP. Os fungos *Epulorhiza* spp. formaram um ramo distinto dos fungos *Ceratorhiza* spp. Também foi possível, por meio dessa técnica, distinguir as espécies *Epulorhiza repens* (N. Bernard) R.T. Moore e *Epulorhiza epiphytica* Pereira, Rollemberg et Kasuya.

Estudos que não exigem o isolamento dos simbiontes foram possibilitados graças ao desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificar regiões do genoma de fungos micorrízicos de orquídea (Taylor e Bruns, 1999; Taylor et al., 2004; Shefferson et al., 2007; Taylor e McCormick, 2008). Quando padrões desconhecidos de RFLP são observados, o simbionte é identificado a partir da amplificação e seqüenciamento da subunidade maior mitocondrial (mtLSU) (Taylor e Bruns, 1999; Shefferson et al., 2007).

Taylor e Bruns (1999) identificaram diferentes espécies de fungos micorrízicos do gênero *Russula* associados à *Corallorhiza maculata* (Raf.) Raf. e à *Corallorhiza mertensiana* Bong. utilizando a técnica PCR-RFLP. Esses autores compararam o padrão de restrição da região ITS do fungo micorrízico, amplificada a partir de fragmentos de raiz e rizoma

colonizados, com o padrão de restrição da mesma região amplificada a partir de basidiocarpos e micélio previamente identificados. Para realização do PCR, os oligonucleotídeos ITS1F/ITS4 foram utilizados, pois combinações de oligonucleotídeos mais específicas, como ITS1F/ITS4B, podem não permitir a detecção da presença de fungos rizotonióides, já que podem não amplificar a região ITS deste grupo de fungos (Taylor e Bruns, 1999).

Múltiplos fungos micorrízicos podem ser detectados colonizando um mesmo fragmento de raiz ao analisar o produto da amplificação da região ITS do rDNA dos simbiontes, a partir do DNA total da micorriza, por meio da técnica de RFLP (Taylor e Bruns, 1999; Shefferson et al., 2007). Se o padrão de bandas de RFLP indicar um fragmento maior do que o estimado inicialmente, conclui-se que pelo menos duas diferentes seqüências foram amplificadas, ou seja, há pelo menos dois fungos associados ao fragmento de raiz analisado. Deste modo, para identificação dos simbiontes, o produto do amplificado é clonado para posterior análise das seqüências clonadas por PCR-RFLP (Taylor e Bruns, 1999; Shefferson et al., 2007). Neste sentido, a técnica DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) pode ser aplicada, pois, além de possibilitar a análise da comunidade de fungos presentes em uma amostra de raiz, possivelmente, dispensaria a clonagem de fragmentos de DNA para identificação dos diferentes fungos detectados (Vainio e Hantula, 2000; van der Wal et al., 2006). Por meio dessa técnica, detecta-se em uma amostra a presença de indivíduos de um grupo específico de microrganismo por meio da amplificação de seqüências conservadas do DNA desses indivíduos em reação de PCR utilizando o DNA total extraído da amostra e oligonucleotídeos sintetizados especificamente para o grupo de interesse (Vainio e Hantula, 2000; van der Wal et al., 2006). As diferenças entre os fragmentos amplificados a partir dos diferentes indivíduos são reveladas pela separação dos mesmos durante a corrida em gel contendo gradiente de compostos desnaturantes (Vainio e Hantula, 2000). As bandas observadas correspondem a diferentes fragmentos e, possivelmente, a diferentes espécies. Posteriormente, os

fragmentos podem ser eluídos do gel e amplificados por PCR para a identificação do fungo pelo padrão de RFLP ou seqüência do fragmento (Vainio e Hantula, 2000; Liu et al., 2008). Deste modo, pode-se estudar a comunidade de fungos micorrízicos em uma amostra de micorriza e identificá-los sem que seja necessário realizar isolamento e cultivo.

A composição de ácidos graxos tem sido também utilizada para caracterizar, diferenciar e agrupar isolados de fungos rizoctonióides fitopatogênicos (Johnk e Jones, 1992, 1993, 1994; Johnk et al., 1993; Baird et al., 2000; Priyatmojo et al., 2002a, 2002b; Lanoiselet et al., 2005; Sharon et al., 2006). Para isso, uma modificação do método MIDI (Microbial Identification System, Newark, DE, USA) tem sido utilizada para analisar e identificar os ácidos graxos, desse grupo de fungos, após extração e metilação (Sharon et al., 2006). Os grupos de anastomose (AGs), criados com base na capacidade ou não de fungos rizoctonióides realizarem anastomose de hifa com isolados padrões, têm sido caracterizados, diferenciados e identificados por esta modificação do método MIDI (Johnk e Jones, 1992, 1993, 1994; Johnk et al., 1993; Baird et al., 2000; Priyatmojo et al., 2002a; Lanoiselet et al., 2005). Foi possível, até mesmo, separar claramente três variedades de *Waitea circinata* Warcup & Talbot (anamorfo: *Rhizoctonia circinata*) em três grupos utilizando esta técnica (Priyatmojo et al., 2002b). Deste modo, o método MIDI pode ser uma ferramenta importante na caracterização de fungos rizoctonióides micorrízicos de orquídea.

VI. ESPECIFICIDADE NA ASSOCIAÇÃO

A maioria das espécies de orquídeas possui especificidade em relação a determinados grupos, espécies ou isolados de fungos micorrízicos (Hadley e Pegg; 1989). A especificidade na associação entre orquídeas e fungos micorrízicos pode ser definida como a gama de fungos a qual uma espécie particular de orquídea se associa (Thompson, 1994). No entanto, uma simples lista taxonômica de associações encontradas poderia mascarar a complexidade da especificidade entre ou dentro de populações, já que condições abióticas, tais como composição

do substrato, temperatura, altitude, região geográfica e as variações genéticas entre diferentes populações afetam a interação entre a orquídea e o fungo micorrízico (Thompson, 1994; Rasmussen, 1995; Taylor e Bruns, 1999; Otero et al., 2004; 2007).

A infecção inicial pode ser evento chave para o reconhecimento entre os simbiossiontes, definindo a compatibilidade da associação (Rasmussen, 1990; 1995). Quando há incompatibilidade, a planta induz a formação de compostos inibitórios ao crescimento do fungo, como o acúmulo de compostos fenólicos nas células infectadas pela hifa fúngica (Arditti, 1992). Alguns fungos, por mais que colonizem as células do embrião, não são capazes de sustentar o desenvolvimento da orquídea até a formação da primeira folha com produção de clorofila, início da autotrofia da planta (Arditti, 1992; Pereira, 2004; Pereira et al., 2005b). Para que a orquídea colonize determinada região, é necessária a presença, no substrato, de fungo compatível e eficiente em permitir o desenvolvimento da orquídea (Mckendrick et al., 2002). Assim, a especificidade pode determinar as regiões de crescimento de uma espécie de orquídea devido à presença ou ausência do fungo compatível (Taylor e Bruns, 1999; Mckendrick et al., 2002).

A especificidade tem sido estudada pela identificação dos fungos micorrízicos associados (Rasmussen, 1995; Taylor e Bruns, 1999, Otero et al., 2004, Shefferson et al., 2007) ou pela indução da germinação de sementes *in vitro* ou *ex vitro* (Rasmussen, 1995; Taylor e Bruns, 1999; Mckendrick et al., 2002; Otero et al., 2004; Pereira, 2004). O tipo de estudo desenvolvido pode levar a obtenção de diferentes resultados e, conseqüentemente, a diferentes compreensões da especificidade da associação micorrízica em orquídeas (Taylor e Bruns, 1999).

No trabalho de Taylor e Bruns (1999), foi observada a associação das orquídeas *C. maculata* e *C. mertensiana*, em 31 regiões amostradas, com fungos que pertenciam apenas ao gênero *Russula*. Foram identificados 20 fungos associados a *C. maculata* e 3 a *C. mertensiana*, sendo que essas orquídeas, mesmo quando coletadas em uma mesma região, não compartilhavam o simbionte fúngico entre si. Por mais que

pertencam a um mesmo gênero, essas espécies de orquídea apresentam diferenças quanto a gama de simbioses aos quais podem associar-se. Entretanto, essas orquídeas estabelecem associação com fungos de um mesmo gênero e com um mesmo papel ecológico que, a saber, é o de estabelecer associação ectomicorrízica com plantas lenhosas fotossintéticas. Isso possibilita à orquídea obter, por meio do fungo, o carbono fixado pela outra planta para sustentar o seu metabolismo (Zelmer e Currah, 1995a; Taylor e Bruns, 1999; Girlanda et al., 2006; Nieto e Carbone, 2009).

Shefferson et al. (2007) estudaram a especificidade micorrízica em 90 populações de 15 taxas de orquídeas clorofiladas do gênero *Cypripedium* e em três continentes. Esse gênero monofilético de orquídea associa-se, principalmente, com fungos da família Tulasnellaceae. Ao avaliar a amplitude filogenética dos simbioses fúngicos, foi observado que orquídeas filogeneticamente mais próximas compartilham uma mesma amplitude filogenética média. Isso indica que essa característica pode ser conservada ao longo da evolução e que é mais provável orquídeas próximas compartilharem os simbioses fúngicos do que orquídeas mais distantes.

Terashita (1982) isolou *Rhizoctonia repens* N. Bernard de raízes de *Spiranthes sinensis* (Person) Ames var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara em várias regiões do Japão. Do mesmo modo, Currah et al. (1997) isolaram *Epulorhiza inquilina* Currah, Zettler e McInnis consistentemente e, quase, exclusivamente, de *Platanthera clavellata* (Michaux) Luer, *P. cristata* (Michaux) Lindley e *P. integrilabia* (Correll) Luer crescendo em pântanos sombreados de quatro estados dos EUA.

Fungos do gênero *Epulorhiza* têm sido isolados de sistema radicular de orquídeas do gênero *Epidendrum* (Zettler et al., 1998, Nogueira, 2004; Nogueira et al., 2005; Pereira et al., 2005c; Linhares, 2006; Pereira, 2006). Zettler et al. (1998) observaram que sementes de *Epidendrum conopseum* R. Br. germinavam apenas na presença de um fungo do gênero *Epulorhiza* isolado do seu sistema radicular, o que não ocorreu ao utilizar outros três fungos: *Ceratorhiza goodyera-repentis*

(Costantin e Dufour), *Moniliopsis anomala* Burgeff ex Currah e *Epulorhiza* sp. isolado de *Platanthera ciliaris* (L.) Lindl. Os fungos micorrízicos isolados de *Epidendrum rigidum* Jacq. e *Epidendrum dendrobioides* Thunb. também foram identificados como *Epulorhiza* sp. (Nogueira et al., 2005; Pereira et al., 2005b). Linhares (2006) e Pereira (2006) isolaram apenas fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza* do sistema radicular de *Epidendrum secundum* Jacq., sendo que sementes desta planta apresentaram preferência a este gênero de fungo em experimento de germinação simbiótica (Pereira, 2006).

Em experimento de germinação simbiótica, *Oncidium flexuosum* Sims apresentou maior compatibilidade com o isolado M2 de *Ceratorhiza* sp., fungo obtido do sistema radicular amostrado dessa orquídea na natureza, do que com outros isolados de *Ceratorhiza* sp. e de *Epulorhiza* sp. obtidos de hospedeiros distintos (Pereira et al., 2005b). Além disso, apenas fungos do gênero *Ceratorhiza* sp. têm sido isolados das orquídeas brasileiras do gênero *Oncidium* (Nogueira, 2004; Nogueira et al., 2005; Pereira et al., 2005c).

Sementes de *C. cardiochilum* germinaram apenas em associação com fungos pertencentes ao gênero *Epulorhiza* e apresentaram maior compatibilidade com *E. epiphytica*, a qual promoveu o desenvolvimento dos protocórmios até a formação da primeira folha e da primeira raiz, enquanto que *E. repens* promoveu o desenvolvimento dos protocórmios apenas até formação do pró-meristema (Pereira, 2004). Otero et al. (2005) observaram, em *Tolumnia variegata* (Swartz) Braem, variação na porcentagem de germinação e no índice de crescimento quando sementes coletadas de diferentes populações foram inoculadas com os mesmos fungos. Sementes de *T. variegata* de uma mesma população foram inoculadas com oito isolados de *Ceratorhiza* distribuídos em quatro clados de uma árvore filogenética construída com base na seqüência da região ITS do rDNA. Os fungos de dois clados apresentaram maior eficiência em promover a germinação das sementes e não houve diferença estatística entre a porcentagem de sementes germinadas na presença de simbiontes de um mesmo clado. A variação na eficiência da

associação fungo-planta foi explicada pela variação genética intra-específica da planta e do fungo.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen, T.F.; Rasmussen, H.N. The mycorrhizal species of *Rhizoctonia*. In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G., ed. ***Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control***. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1996. p.379-390.
- Arditti, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York, John Wiley & Sons, 1992. 691p.
- Arditti, J.; Ghani, A.K.A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, 145:367-421, 2000.
- Baird, R.E.; Gitaitis, R.D.; Carling, D.E.; Baird, S.M.; Alt, P.J.; Mullinix, B.G. Determination of Whole-cell fatty acid profiles for the characterization and differentiation of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-4 and AG-7. **Plant Disease**, 84:785-788, 2000.
- Bonnardeaux, Y.; Brundrett, M.; Batty, A.; Dixon, K.; Koch, J.; Sivasithamparam, K. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. **Mycological Research**, v.111, p.51–61, 2007.
- Cameron D.D., Leake J.R., Read D.J. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **New Phytologist**, v.171, p.405–416, 2006.
- Cameron D.D., Johnson I., Leake J.R., Read D.J. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **Annals of Botany**, v.99, p.831–834, 2007.
- Cameron D.D., Johnson I., Leake J.R., Read D.J. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. **New Phytologist**, v.180, p.176–184, 2008.
- Carling, D.E.; Pope, E.J.; Brainard, K.A.; Carter, D.A. Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis group. **Phytopathology**, v.89, p.942-946, 1999.
- Clements, M.A. Orchid mycorrhizal associations. **Lindleyana**, v.3, p.73-86, 1988.
- Cribb, P.J.; Kell, S.P.; Dixon, K.W.; Barrett, R.L. Orchid conservation: a global perspective. In: Dixon, K.W.; Kell, S.P.; Barrett, R.L.; Cribb, P.J. (eds) **Orchid Conservation**. Kota Kinabalu, Natural History Publications (Borneo), 2003. p.1-24.
- Cruz, C.D.; Regazzi, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. Viçosa, Editora UFV, 1997. 394p.

- Currah, R.S.; Zelmer, C.D. A key and notes for the genera of fungi with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. **Reports of the Tottori Mycological Institute**, v.30; p.43-59, 1992.
- Currah, R.S.; Zettler, L.W., Mcinnis, T.M. *Epulorhiza inquilina* sp. nov. from *Platanthera* (Orchidaceae) and a key to *Epulorhiza* species. **Mycotaxon**, v.61; p.338-342, 1997.
- Dearnaley, J.D.W. Further advances in orchid mycorrhizal research. **Mycorrhiza**, v.17, p.475–486, 2007.
- Dijk, E.; Willwms, J. H.; van Andel, J. Nutrient responses as a key factor to the ecology of orchid species. **Acta Botanica Neerlandica**, v.46; p.339-363, 1997.
- Fay, M.F.; Krauss, S.L. Orchid conservation genetics in the molecular age. In: Dixon, K.W.; Kell, S.P.; Barrett, R.L.; Cribb, P.J. (eds) **Orchid Conservation**. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah. p. 91-112, 2003.
- García, V.G.; Onco, M.A.P.; Susan, V.R. Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.4, p.55-79, 2006.
- Girlanda, M.; Selosse, M. A.; Cafasso, D.; Brilli, F.; Delfine, S.; Fabbian, R.; Ghignone, S.; Pinelli, P.; Segreto, R.; Loreto, F.; Cozzolino, S.; Perotto, S. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. **Molecular Ecology**, v.15, p.491–504, 2006.
- Hadley, G., Pegg, G. F. Host-fungus relationships in orchids mycorrhizal systems. In: Pritchard, H. W., **Modern methods in orchid conservation: The role of physiology, ecology and management**. Cambridge University Press, 1989. p.57-71.
- Horton, T.R., Bruns, T.D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. **Molecular Ecology**, v.10, p.1855-1871, 2001.
- Johnk, J.S.; Jones, R.K. Determination of whole-cell fatty acids in isolates of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. **Phytopathology**, v.82, p.68-72, 1992.
- Johnk, J.S.; Jones, R.K. Determination of populations of AG-2-2 of *Rhizoctonia solani* by analysis of cellular fatty acids. **Phytopathology**, v.83, p.278-283, 1993.
- Johnk, J.S.; Jones, R.K.; Shew, H.D.; Carling, D.E. Characterization of populations of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco. **Phytopathology**, v.83, p.854-858, 1993.
- Johnk, J.S.; Jones, R.K. Comparison of whole-cell fatty acid composition in intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* AG-1. **Phytopathology**, v.84, p.271-275, 1994.

- Kristiansen, K.A.; Freudenstein, J.V.; Rasmussen, F.N.; Rasmussen, H.N. Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). **Molecular Phylogenetic Evolution**, v.33, p.251–258, 2004.
- Lanoiselet, V.M.; Cother, E.J.; Cother, N.J.; Ash, G.J.; Harper, J.D.I. Comparison of two total cellular fatty acid analysis protocols to differentiate *Rhizoctonia oryzae* and *R. oryzae-sativae*. **Mycologia**, v.97, p.77–83, 2005.
- Leake, J. R. Tansley Review No. 69. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. **New Phytologist**, v.127, p.171-216, 1994.
- Leake, J. R. Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the 'saprophytic' plant myth. **Mycologist**, v.19, p.113-122, 2005.
- Linhares, D.O. **Caracterização morfológica de micorrizas de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* nativas do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2006. 36p. (Dissertação de Mestrado)
- Liu, B.; Glenn, D.; Buckley, K. *Trichoderma* communities in soils from organic, sustainable, and conventional farms, and their relation with Southern blight of tomato. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, p.1124-1136, 2008.
- McCormick, M.K.; Whigham, D.F.; O'Neill, J. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. **New Phytologist**, v.163, p.425–438, 2004.
- McKendrick, S.L., Leake, J.R., Taylor, D.L.; Read, D.J. Symbiotic germination and development of mycoheterotrophic orchid *Neotia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. **New Phytologist** 154, 233–247, 2002.
- Moore, R.T. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. **Mycotaxon**, v.29, p.91-99, 1987.
- Moore, R. T. The dolipore/parentosome septum in modern taxonomy. In: Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S.; Dijst, G. (Eds), ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control**. Kluwer Academic Publishers, 1996. p.13-35.
- Nieto, M.P.; Carbone, S.S. Characterization of juvenile maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) ectomycorrhizal fungal community using morphotyping, direct sequencing and fruitbodies sampling. **Mycorrhiza**, v.19, p.91–98, 2009.
- Nogueira, R.E. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de orquídeas**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2004. 36p. (Dissertação de Mestrado)

- Nogueira, R.E.; Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Lanna, M.C.; Mendonça, M. Fungos micorrízicos associados e orquídeas em campos rupestres na Região do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.3, p.417-424, 2005.
- Otero, J.T., Ackerman, J.D., Bayman, P. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. **American Journal of Botany**, v.89, p.1852–1858, 2002.
- Otero, J.T., Ackerman, J.D., Bayman, P. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. **Molecular Ecology**, v.13, p.2393-2404, 2004.
- Otero, J.T., Bayman, P., Ackerman, J.D. Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* in vitro: the potential for natural selection. **Evolutionary Ecology**, v.19, p.29-43, 2005.
- Otero, J.T.; Flanagan, N.; Herre, E.A.; Ackerman, J.D.; Bayman, P. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Lonopsis utricularioides* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v.94, p.1944–1950, 2007.
- Pereira, M.C. **Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2004. 25p. (Monografia)
- Pereira, M.C. **Diversidade e especificidade de fungos micorrízicos associados a *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – MG**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2006. 59p. (Dissertação de Mestrado)
- Pereira, O.L. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécies de orquídeas neotropicais**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2001. 48p. (Dissertação de Mestrado)
- Pereira, O.L.; Rollemberg, C.L.; Kasuya, M.C.M. Associações micorrízicas em orquídeas: perspectivas e utilização em programas de propagação simbiótica. **Orquidário**, v.16, p.40-44, 2002.
- Pereira, O.L.; Rollemberg, C.L.; Borges, A.C.; Matsuoka, K.; Kasuya, M.C.M. *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. **Mycoscience**, v.44, p.153-155, 2003.
- Pereira, O.L., Kasuya, M.C.M., Rollemberg, C.L., Borges, A.C. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.199-206, 2005a.
- Pereira, O.L., Kasuya, M.C.M., Rollemberg, C.L., Borges, G.M. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três

- espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.191-197, 2005b.
- Pereira, O.L., Kasuya, M.C.M., Borges, A.C., Araújo, E.F. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. **Canadian Journal of Botany**, v.83, p.54-65, 2005c.
- Perkins, A. J.; McGee, P. A. Distribution of the orchid mycorrhizal fungus, *Rhizoctonia solani*, in relation to its host, *Pterostylis acuminata*, in the field. **Australian Journal of Botany**, v.43; p.565-575, 1995.
- Peterson, R. L.; Currah, R.S. Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* and *Ceratobasidium cerelae*. **Canadian Journal of Botany**, v.68, p.1117-1125, 1990.
- Peterson, R.L; Bonfante, P; Faccio, A; Uetake, Y. The interface between fungal hyphae and orchid protocorm cells. **Canadian Journal of Botany**, v.74, p.1861-1870, 1996.
- Peterson, R. L., Uetake, Y., Zelmer, C. Fungal symbioses with orchid protocorms. **Symbiosis**, v.25; p.29-55, 1998.
- Peterson, R.L., Massicotte, H.B., Melville, L.H. **Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology**. NRC Research Press, 2004. 173p.
- Priyatmojo, A.; Yamauchi, R.; Carling, D.E.; Kageyama, K.; Hyakumachi, M. Differentiation of Three Varieties of *Rhizoctonia circinata*; var. *circinata*, var. *oryzae* and var. *zuae* on the Basis of Cellular Fatty Acid Composition. **Journal of Phytopathology**, v.150, p.1-5, 2002a.
- Priyatmojo, A.; Yamauchi, R.; Kageyama, K.; Hyakumachi, M. Whole-Cell Fatty Acid Composition to Characterize and Differentiate Isolates of *Rhizoctonia* Species Associated with Turfgrass Diseases in Japan. **Journal of Genetic of Plant Pathology**, v.68, p.1-7, 2002b.
- Prosser, J.I. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. **Plant and Soil**, 244:9–17, 2002.
- Rasmussen, H.N. Cell differentiation and mycorrhiza infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. F.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae) during germination *in vitro*. **New Phytologist**, v.116, p.137-147, 1990.
- Rasmussen, H.N.; Whigham, D.F. Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. **American Journal of Botany**, v.80, n.12, p.1374-1378, 2002.
- Rasmussen, H.N. **Terrestrial orchid: from seed to mycotrophic plant**. Cambridge University Press, 1995. 444p.
- Rasmussen, H. N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza, **Plant and Soil**, v.244; p.149-163, 2002.
- Selosse, M.A.; Weiß, M.; Jany, J.L.; Tillier, A. Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the

- achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. **Molecular Ecology**, v.11, p.1831–1844, 2002.
- Shan, X.C.; Liew, E.C.; Weatherhead, M.A.; Hodkiss, L.J. Characterization and taxonomy placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. **Mycologia**, v.94, n. 2, p.230-239, 2002.
- Sharon, M.; Kuninaga, S.; Hyakumachi, M.; Sneh, B. The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, v. 47, p.299-316, 2006.
- Shefferson, R.P.; Taylor, D.L.; Weiß, M.; Garnica, S.; et al. The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. **Evolution**, v.61-6, p.1380–1390, 2007.
- Shefferson, R.P.; Kull, T.; Tali, K. Mycorrhizal interactions of orchids colonizing Estonian mine tailings hills. **American Journal of Botany**, v.95, p.156–164, 2008.
- Shimura, H.; Matsuura, M.; Takada, N.; Koda, Y. An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae). **Phytochemistry**, v.68, p.1442–1447, 2007.
- Smith, S.E., Read, D.J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 2.ed. Academic Press, 1997. 605p.
- Stalpers, J.A., Andersen, T.F. A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia* S.L. In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G. (Eds), ***Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control**. Kluwer Academic Publishers, 1996. p.49-63.
- Suárez, J.P.; Weiß, M.; Abele, A.; Garnica, S.; Oberwinkler, F.; Kottke, I. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. **Mycological Research**, v.110, p.1257–1270, 2006.
- Suárez, J.P.; Weiß, M.; Abele, A.; Oberwinkler, F.; Kottke, I. Members of Sebaciales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. **Mycological Research**, v.7, p.75–85, 2008.
- Sylvia, D.M.; Fuhrmann, J.J.; Hartel, P.G.; Zuberer, D.A. **Principles and application of soil microbiology**. 2.ed. Prentice Hall Inc., 2005. 640p.
- Taylor, D.L.; Bruns, T.D. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza macula* and *C. mertensiana*. **Molecular Ecology**, v.8, p.1719-1732, 1999.

- Taylor, D.L.; Bruns, T.D.; Leake, D.J.; Read, D.J. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: van der Heijden, M.G.A., Sanders, I. **Mycorrhizal Ecology**. Springer-Verlag, 2002. p.375-414.
- Taylor, D. L., T. D. Bruns, and S. A. Hodges. Evidence for mycorrhizal races in a cheating orchid. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 271:35–43, 2004.
- Taylor, D.L.; McCormick, M.K. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. **New Phytologist**, v.177, p.1020–1033, 2008.
- Terashita, T. Fungi inhabiting wild orchids in Japan (II). Isolation of symbionts from *Spiranthes sinensis* var. *amoena*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, v.23, p.319-328, 1982.
- Thompson, J.N. **The coevolutionary process**. University of Chicago Press, 1994. 387p.
- Umata, H. A new biological function of shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in a myco-heterotrophic orchid, *Erythrorchis ochobienses*. **Mycoscience**, v.39, p.85-88, 1998.
- Vainio, E.J., Hantula, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v.104, p.927-936, 2000.
- van der Wal, A.; van Veena, J.A.; Pijla, A.S.; Summerbell, R.C.; Boera, W. Constraints on development of fungal biomass and decomposition processes during restoration of arable sandy soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.2890–2902, 2006.
- Warcup, J. H. Mycorrhizal associations of isolates of *Sebacina vermifera*. **New Phytologist**, v.110; p.227-231, 1988.
- Weiss, M.; Selosse, M.A.; Rexer, K.H.; Urban, A. Oberwinkler, F. *Sebacinales*: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. **Mycological Research**, v.108, p.1003–1010, 2004.
- Yoder, J. A.; Zettler, L. W.; Stewart, S. L. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedling, and evidence for water uptake by means of micotrophy. **Plant Science**, v.156; p.145-150, 2000.
- Zelmer, C.D.; Currah, R.S. Evidence for a fungal liaison between *Corallorhiza trifida* (Orchidaceae) and *Pinus contorta* (Pinaceae). **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.862-866, 1995a.
- Zelmer, C. D.; Currah, R. S. *Ceratorhiza pernecatena* and *Epulorhiza calendulina* spp. nov.: mycorrhizal fungi of terrestrial orchids. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.1981-1985, 1995b.

- Zettler, L.W. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. **Selbyana**, v.18, p.188-194, 1997.
- Zettler, L. W., Delaney, T. W., Sunley, J. A. Seed propagation of epiphytic green-fly orchid, *Epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus. **Selbyana**, v.19; p.249-253, 1998.
- Zettler, L.W.; Sharma, J.; Rasmussen, F.N. Mycorrhizal diversity. In: Dixon, KW; Kell, SP; Barrett, RL; Cribb, PJ (eds) **Orchid Conservation**. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah, 2003. p.205-226

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE FUNGOS MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEAS

RESUMO

A diversidade de fungos micorrízicos de orquídeas tem sido estudada para que se possa compreender a ecologia dessa simbiose e para se desenvolver estratégias de conservação das orquídeas e dos seus fungos micorrízicos, uma vez que essa associação é essencial para a sobrevivência dessas plantas na natureza. Os fungos rizoctonióides são os principais fungos micorrízicos das orquídeas brasileiras e a identificação e a análise da diversidade desses fungos vêm sendo realizadas com base nas características morfológicas e moleculares. Com o objetivo de comparar a utilização das características morfológicas e moleculares na análise da diversidade de fungos rizoctonióides, vinte isolados foram estudados. Dezesesseis isolados são fungos *Epulorhiza* spp., obtidos de três populações de *Epidendrum secundum*, dois são fungos rizoctonióides uninucleados, obtidos de uma população de *Oncidium barbaceniae*, e os outros dois são fungos fitopatogênicos, *Ceratorhiza* sp. AGC e *Rhizoctonia solani* AG11A. As características morfológicas qualitativas e quantitativas foram analisadas por técnicas multivariadas, possibilitando distinguir os gêneros *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* e *Rhizoctonia* e também separar os isolados de *Epulorhiza* spp. em dois grupos. Isso foi confirmado pela análise dos resultados do RAPD e ITS-RFLP e pela análise da seqüência da região ITS do rDNA. A taxa de crescimento, o diâmetro da colônia e as dimensões das células monilióides foram as características morfológicas quantitativas mais relevantes para se estimar a diversidade. Os simbiontes de *O. barbaceniae* apresentaram identidade a seqüências da região ITS de espécies do gênero *Ceratobasidium/Ceratorhiza* e foram identificados como *Ceratorhiza* sp. A análise da seqüência da região ITS também mostrou que os isolados de *E. secundum* possuem identidade a fungos *Tulasnella/Epulorhiza*, representando duas espécies de fungos desse gênero. Observou-se homogeneidade entre os isolados *Epulorhiza* spp. obtidos de uma mesma população ou de populações de regiões próximas, mas maior variabilidade entre isolados obtidos de populações localizadas em regiões mais distantes. As características morfológicas, assim como a

análise da seqüência da região ITS, são ferramentas úteis para distinção de gêneros e espécies e para estimar a diversidade de fungos rizoctonióides.

ABSTRACT

Mycorrhizal fungi diversity in orchids has been studied to provide better understanding of this symbiosis ecology and to develop strategies to preserve orchids and their mycorrhizal fungi, since this association is essential to the survival of these plants in nature. *Rhizoctonia*-like is the main mycorrhizal fungi of Brazilian orchids and the identification and diversity analysis of these fungi have been achieved based on morphological and molecular characteristics. In order to compare morphological and molecular characteristics in analysis of *Rhizoctonia*-like fungal diversity, twenty isolates were investigated. Sixteen isolates are *Epulorhiza* spp., obtained from three populations of *Epidendrum secundum*, two are uninucleate *Rhizoctonia*-like fungi, obtained from *Oncidium barbaceniae*, and the others are phytopathogenical isolates, *Ceratorhiza* sp. AGC and *Rhizoctonia solani* AG1IA. Qualitative and quantitative morphological characteristics were analyzed by multivariate techniques, distinguishing *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* and *Rhizoctonia* genera and also separating the isolates of *Epulorhiza* spp. in two groups. This was confirmed by analysis of RAPD and ITS-RFLP and by analysis of ITS rDNA sequence. Growth rate, colony diameter and monilioid cell dimensions were the most relevant quantitative morphological characteristics to estimate diversity. Symbionts of *O. barbaceniae* presented identity to ITS sequences belonging to *Ceratobasidium*/*Ceratorhiza* genus and were identified as *Ceratorhiza* sp. The analysis of ITS sequences also shows that *E. secundum* isolates have identity to *Tulasnella*/*Epulorhiza* fungi, representing two species of this genus. It was observed homogeneity among *Epulorhiza* spp. obtained from a single population or from populations in near regions, but higher variability among isolates obtained from populations located in more distant regions. The morphological characteristics, as well as analysis of ITS sequence, are useful tools for distinction of genera and species and for estimate diversity of *Rhizoctonia*-like fungi.

I. INTRODUÇÃO

Apenas fungos micorrízicos rizoctonióides do gênero *Epulorhiza* vem sendo isolado do sistema radicular das espécies de *Epidendrum* estudadas até o momento, os quais foram identificados, principalmente, com base em suas características morfológicas (Nogueira, 2004; Nogueira et al., 2005; Pereira et al., 2005a; Linhares, 2006; Pereira, 2006). Muitos desses isolados são capazes de promover a germinação de sementes de orquídeas, tanto hospedeiras como não hospedeiras, sendo utilizados na propagação simbótica de orquídeas (Zettler, 1997; Zettler et al., 1998; Pereira, 2004; 2006).

As características morfológicas dos fungos micorrízicos rizoctonióides isolados de *Epidendrum secundum* Jacq., uma espécie largamente distribuída em um campo de altitude do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (Araponga/MG), foram avaliadas por Pereira et al. (2009) e identificados como *Epulorhiza* spp. Ao analisar as características quantitativas, dimensões das células monilióides, diâmetro da hifa, diâmetro da colônia e taxa de crescimento, por estatística multivariada, esses autores observaram baixa variabilidade entre os fungos obtidos de plantas que cresciam em um mesmo local. Contudo, havia grande variabilidade entre fungos isolados de plantas crescendo em diferentes locais. Isso mostrou que as características morfológicas podem ser utilizadas para agrupar os isolados, mas seria necessário confirmar até que ponto os diferentes grupos representam diferentes espécies e se há relação com agrupamentos baseados em dados oriundos da caracterização molecular desses isolados.

Técnicas moleculares baseadas na seqüência do DNA total são, freqüentemente, empregadas para avaliar a variabilidade existente entre isolados de fungos rizoctonióides, tanto micorrízicos como fitopatogênicos (Cubeta e Vigalys, 1997; Rasmussen, 2002; Shan et al., 2002; Dealaney, 2007). A técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) possibilita o estudo simultâneo de múltiplos *loci* do genoma completo a partir de cada oligonucleotídeo usado, revelando diferenças de nucleotídeos entre isolados (Shan et al., 2002). Com isso, é possível determinar a

variabilidade em nível de espécie e em nível de população (Cubeta e Vigalys, 1997; Shan et al., 2002). A análise da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do rDNA por RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism) fornece informações mais conservadas a partir de um *locus* específico e, deste modo, é utilizada em estudo de variabilidade em nível de espécie e acima de espécie (Cubeta e Vigalys, 1997; Shan et al., 2002; Bougoure et al., 2005; Pereira et al., 2005a). A região ITS é analisada em função da seqüência dos nucleotídeos para identificar isolados de fungos rizoctonióides e para determinar a variabilidade existente entre eles, o que possibilita estudos de diversidade, principalmente, de fungos micorrízicos associados a orquídeas no campo (Bougoure et al., 2005; Suárez et al., 2006; Bonnardeaux et al., 2007; Shefferson et al., 2007).

Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar a utilização das características morfológicas e moleculares na análise da diversidade de fungos rizoctonióides.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Isolados fúngicos

Vinte fungos rizoctonióides foram utilizados neste trabalho. Dezoito isolados pertencentes à Coleção de Fungos Micorrízicos de Orquídea do Laboratório de Associações Micorrízicas (DMB/Bioagro/UFV), dezesseis isolados de *Epulorhiza* spp. e dois fungos rizoctonióides uninucleados. Foram também utilizados dois fungos da Coleção de Fungos Fitopatogênicos do Laboratório de Fitopatologia da UFV, um isolado de *Rhizoctonia solani* Kuhn AG1IA (AG1) e um isolado de *Ceratorhiza* sp. AGC. Os dezesseis isolados *Epulorhiza* spp. foram obtidos de três populações de *E. secundum* por Pereira et al. (2009) e os dois fungos rizoctonióides uninucleados foram obtidos de uma população de *Oncidium barbaceniae* Lindl. por Pereira et al. (2006). As populações dessas orquídeas são naturais de um mesmo campo de altitude localizado no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, MG (Tabela 1). Esses isolados foram reativados em placas de Petri contendo 25 mL de meio BDA (Potato Dextrose Ágar – ACUMEDIA) a partir de culturas armazenadas a 4 °C em tubos contendo 10 mL de meio BDA inclinado.

2. Caracterização morfológica dos fungos rizoctonióides

As características qualitativas (cor, aspecto, micélio aéreo, margem, número de núcleos por compartimento de hifa e crescimento micelial ralo e translúcido na borda) e quantitativas (diâmetro da colônia, taxas de crescimento em meio BDA e CMA [Corn Meal Agar – ACUMEDIA], diâmetro de hifa, dimensões de célula molinióide), foram avaliadas para caracterização morfológica dos isolados de fungos rizoctonióides (Pereira et al., 2009).

As características morfológicas quantitativas foram submetidas à análise de variância, considerando o delineamento inteiramente ao acaso, e a comparação de médias, pelo teste Scott Knott, a 5 % de significância, utilizando-se o programa GENES (versão 2007.0.0). Para isso, foram analisados quatro dados de diâmetro da colônia, medido 48 h após a

Tabela 1: Identificação e código dos isolados de fungos micorrízicos rizoctonióides de orquídea, a espécie da orquídea hospedeira, o código da população, a coordenada geográfica do local de coleta e o hábito e o habitat das orquídeas de cada população

Identificação	Código	Espécie de orquídea	População	Coordenada Geográfica		Hábito	Habitat
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES1.2A	<i>Epidendrum secundum</i>	ES1	S20°42'11,1"	WO42°28'32"	Terrestre	Campo de altitude/Campo graminóide
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES1.2B						
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES1.2D						
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES1.3A						
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES1.3E						
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES1.3F						
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES2.2B	<i>Epidendrum secundum</i>	ES2	S20°42'10,8"	WO42°28'31,8"	Terrestre	Campo de altitude/Campo graminóide
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES2.2C						
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES2.2D						
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES2.2F						
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES2.3B						
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES2.3C						
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES3.1A	<i>Epidendrum secundum</i>	ES3	S20°42'6,5"	WO42°28'30,1"	Terrestre	Campo de altitude/Campo graminóide próximo a escrube
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES3.1D						
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES3.1G						
<i>Epulorhiza</i> sp.	ES3.3F						
Rizoctonióide uninucleado	OB1.3H	<i>Oncidium barbaceniae</i>	OB1	S20°42'8,38"	WO42°28'30,53"	Rupícola	Campo de altitude/Campo graminóide
Rizoctonióide uninucleado	OB1.2G						

inoculação, e quatro taxas de crescimento determinados em meio BDA e CMA. As medidas de largura de célula monilióide (LCM), comprimento de célula monilióide (CCM) e diâmetro de hifa (DH) foram organizadas em ordem crescente para seleção de quatro valores. Selecionou-se o maior valor, o menor valor, e, aleatoriamente, dois valores intermediários, buscando assim cobrir toda a amplitude da variação. Deste modo, foram analisados quatro dados de cada característica avaliada.

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 multicategóricas para cálculo da matriz de dissimilaridade, ou seja, 1 – complemento, e posterior agrupamento dos isolados pelo método UPGMA (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Averages) (Cruz, 2008). As características quantitativas foram analisadas pela técnica de Variáveis Canônicas para realizar a dispersão gráfica dos isolados com base nas duas primeiras variáveis canônicas. A distância generalizada de Mahalanobis D^2 foi também calculada, gerando uma matriz de distâncias utilizada para o agrupamento dos isolados pelo método de UPGMA.

As características quantitativas foram, posteriormente, submetidas ao critério de Singh (1981), baseado em D^2 de Mahalanobis, para se avaliar a contribuição relativa dessas características na análise da diversidade e para sugestão de descarte (Cruz, 2008). Para isso, também se utilizou o programa GENES.

3. Caracterização molecular dos fungos rizoctonióides

a) Obtenção do micélio e extração do DNA total dos fungos rizoctonióides isolados

O micélio dos fungos para extração de DNA foi obtido a partir da

inoculação de um disco de 9 mm de diâmetro de cada isolado, contendo micélio em crescimento ativo, em frascos Erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL de meio BDL (Potato-Dextrose Broth – ACUMEDIA). O micélio obtido foi transferido para tubo Eppendorff de 1,5 mL, congelado a -86 °C e liofilizado. O micélio liofilizado foi, então, utilizado para extração de DNA total segundo descrito por Schäfer e Wöstemeyer (1992). O DNA foi quantificado por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % (Promega), contendo 0,5 µg mL⁻¹ de brometo de etídeo, e diluído em H₂O milli Q para 10 ng µL⁻¹. As amostras de DNA foram mantidas a -20 °C.

b) Análise dos fungos rizoctonióides por RAPD

Para análise dos isolados pela técnica de RAPD, as reações de PCR foram realizadas segundo descrito por Junghans et al. (1998). Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, contendo 0,5 µg mL⁻¹ de brometo de etídeo. Os géis foram digitalizados em um sistema processador de imagens (Eagle Eye II – Stratagene).

As imagens digitalizadas dos géis foram analisadas pelo programa Gel-Pro Analyzer (versão 3.1.00.00, Media Cybernetics, 1993-7) para construção das tabelas de presença e ausência de bandas. Posteriormente, esses dados foram analisados, pelo programa GENES, para construção da matriz de distância de Jaccard e o agrupamento dos isolados empregando-se a técnica UPGMA.

c) Amplificação e seqüenciamento da região ITS do rDNA dos fungos rizoctonióides

Para a amplificação da região ITS do rDNA nuclear dos fungos micorrízicos rizoctonióides, foi realizada reação de PCR utilizando-se o par de oligonucleotídeos ITS1-ITS4 (White et al., 1990) e as condições de reação descritas por Gardes e Bruns (1993).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se Exo-Sap (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante. Esses produtos foram enviados para MacroGen Inc. (Geumchun-gu, Korea do Sul) para seqüenciamento de ambas as fitas em ciclo conduzido utilizando-se BigDye™ e Automatic Sequencer 3730xl (Applied Biosystems).

d) Análise das seqüências da região ITS do rDNA dos fungos rizoctonióides

As seqüências da região ITS amplificadas dos isolados foram analisadas no programa Sequencher versão 4.5 (Gene Codes) para edição e construção dos *contigs*. Posteriormente, foram alinhadas e analisadas no programa Mega versão 4 (Tamura et al., 2007). Dendrogramas foram construídos pelo método Neighbor-Joining, modelo de análise de nucleotídeo Kimura 2-Parameter e bootstrap com 5.000 repetições, excluindo-se gaps e dados perdidos (Sharon et al., 2008). Dos clados observados, foram selecionadas, aleatoriamente, seqüências para análise, aplicando-se o algoritmo BLASTn (Altschul et al., 1997). Deste modo, foi possível selecionar seqüências de nucleotídeos armazenadas no banco de dados do NCBI (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com grande identidade com as seqüências da região ITS dos fungos micorrízicos rizoctonióides. As seqüências de fungos Tulasnellaceae (*Epulorhiza* spp. e *Tulasnella* spp.) obtidas do banco de dados e as seqüências dos isolados *Epulorhiza* spp. foram alinhadas e o agrupamento desses organismos foi realizado, como descrito acima, para identificação desses fungos isolados com base na identidade às seqüências obtidas pertencentes a fungos identificados. O mesmo foi realizado para as seqüências de isolados de *R. solani* AG11A, de *Ceratorhiza* sp. AGC e de fungos rizoctonióides uninucleados estudados, em relação às seqüências de fungos pertencentes a esses gêneros e aos respectivos teleomorfos (Ceratobasidiaceae), obtidos do banco de dados.

Os alinhamentos das seqüências dos isolados Tulasnellaceae e dos isolados de Ceratobasidiaceae foram editados para apresentar,

aproximadamente, 350 pb, utilizando o programa Mega versão 4 (Tamura et al., 2007). Em seguida, as seqüências foram analisadas no programa DNAMAN versão 6 para se comparar, separadamente, as seqüências desses dois grupos quanto à presença e posição de sítios de clivagem de enzimas de restrição.

e) Análise dos isolados por ITS-RFLP

A região ITS do rDNA nuclear de cinco isolados foi amplificada por reação de PCR utilizando-se o par de oligonucleotídeos ITS1-ITS4 (White et al., 1990), segundo descrito por Pereira et al. (2005a). Um microlitro do produto de amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2 % em tampão TBE (Tris-borato 79 mM; EDTA 5 mM) e, outra parte, foi utilizada para análise com enzimas de restrição. Para digestão, foram utilizadas as endonucleases de restrição *Bam*HI, *Hin*FI, *Hpa*II e *Mbo*I, selecionadas a partir da simulação de clivagem utilizando as seqüências da região ITS. As reações foram realizadas como estabelecido pelo fabricante. Os produtos da clivagem foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3 %, contendo 0,5 µg mL⁻¹ de brometo de etídeo. Os géis foram digitalizados sob luz ultravioleta com câmera Polaroid MP4 e um sistema processador de imagens (Eagle Eye II – Stratagene). Os géis foram analisados no programa Gel-Pro Analyzer versão 3.1.00.00 para determinação das bandas e construção da matriz de ausência e presença. A partir dessa matriz, calculou-se a dissimilaridade entre os isolados utilizando-se o complemento do índice de Jaccard para posterior agrupamento dos isolados pelo método UPGMA (Cruz, 2008).

III. RESULTADOS

As características morfológicas avaliadas revelaram variabilidade entre os isolados estudados, o que possibilitou distinguir os diferentes gêneros de fungos rizoctonióides estudados (Tabela 2). Entre os dezesseis isolados de *E. secundum* pertencentes ao gênero *Epulorhiza*, foi observada variabilidade na característica qualitativa micélio aéreo e nas características quantitativas (Tabela 2). Não foi observada variação entre os dois fungos rizoctonióides uninucleados, obtidos de *O. barbaceniae*, em relação a essas características. Os isolados fitopatogênicos *Ceratorhiza* sp. AGC e *R. solani* AG11A apresentaram semelhanças em relação às características qualitativas, mas *Ceratorhiza* sp. AGC foi mais semelhante aos fungos rizoctonióides uninucleados (Tabela 2).

Os menores valores de dissimilaridade (D) observados na matriz calculada pela análise multicategórica dos dados das características qualitativas foram entre fungos micorrízicos isolados de uma mesma espécie de orquídea (Figura 1). Essa distância foi maior do que 0,83 quando se comparou isolados de gêneros diferentes (Figura 1). No dendrograma construído a partir da análise dessa matriz pelo método UPGMA, observou-se a separação dos diferentes gêneros de fungos rizoctonióides, simbioss de *O. barbaceniae* e de *E. secundum*, bem como dos simbioss obtidos de populações de *E. secundum* muito distantes no campo (Figura 2).

As maiores distâncias de Mahalanobis (D^2), calculadas a partir das características quantitativas avaliadas, foram observadas entre os isolados *Epulorhiza* spp. e o isolado *R. solani* AG11A (Figura 3). Entre os isolados *Epulorhiza* spp., foram observadas D^2 variando entre 1,01 e 353,69, sendo que entre os isolados de uma mesma população foram observados os valores de D^2 menores do que 64,00, com exceção do isolado ES2.2B, que apresentou valores de D^2 maiores do que 149,00 quando comparado aos demais isolados da população à qual pertence (Figura 3). O isolado ES2.2B apresentou semelhança aos isolados da população ES3 (Figura 3).

Tabela 2: Características morfológicas qualitativas e quantitativas dos isolados de fungos rizoctonióides

Isolado	Características Qualitativas						Características Quantitativas**						
	Aspecto	Coloração	*M aéreo	Borda	Margem	*C Nuclear	*DBDA	*DCMA	*TBDA	*TCMA	*LCM	*CCM	*DH
							cm	cm	cm h ⁻¹	cm	µm	µm	µm
<i>Rhizoctonia solani</i> AG1-1A	Cotonoso	Amarela	Abundante ¹	Ausente	Aérea	Multi	6,20 a	6,68 a	0,0651 a	0,0708 a	19,6278 a	30,2501 a	5,8411 a
<i>Ceratorhiza</i> sp. AGC	Cotonoso	Amarela	Abundante ²	Ausente	Aérea	Bi	4,38 c	4,33 b	0,0458 b	0,0443 c	8,7692 b	30,8665 a	3,9076 b
<i>Rhizoctonia</i> sp. OB1.2G	Cotonoso	Creme	Abundante ³	Ausente	Aérea	Uni	4,65 b	4,45 b	0,0458 b	0,0422 d	11,8167 a	27,8313 a	5,5676 a
<i>Rhizoctonia</i> sp. OB1.3H	Cotonoso	Creme	Abundante ³	Ausente	Aérea	Uni	4,70 b	4,45 b	0,0464 b	0,0464 b	11,7392 a	24,6526 a	5,4009 a
<i>Epulorhiza</i> sp. ES1.2A	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,90 d	2,98 c	0,0104 d	0,0293 e	13,6455 a	16,0652 b	4,7880 a
<i>Epulorhiza</i> sp. ES1.2B	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,15 d	2,70 c	0,0160 c	0,0280 e	14,1678 a	16,7961 b	4,5291 a
<i>Epulorhiza</i> sp. ES1.2D	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,15 d	3,03 c	0,0163 c	0,0293 e	15,3074 a	17,7361 b	4,5572 a
<i>Epulorhiza</i> sp. ES1.3A	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,30 d	2,85 c	0,0151 c	0,0262 f	12,1209 a	16,4605 b	3,6827 b
<i>Epulorhiza</i> sp. ES1.3E	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,18 d	2,90 c	0,0115 d	0,0302 e	13,3136 a	15,8847 b	3,8195 b
<i>Epulorhiza</i> sp. ES1.3F	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,95 d	2,95 c	0,0123 d	0,0300 e	14,8017 a	16,2967 b	3,6123 b
<i>Epulorhiza</i> sp. ES2.2B	Aveludado	Creme	Escasso	Presente	Submersa	Bi	1,38 e	1,63 f	0,0052 e	0,0087 h	9,7085 b	12,4444 b	2,3883 b
<i>Epulorhiza</i> sp. ES2.2C	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,83 d	2,33 d	0,0094 d	0,0241 f	13,6877 a	15,6687 b	4,0467 b
<i>Epulorhiza</i> sp. ES2.2D	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,13 d	2,73 c	0,0191 c	0,0306 e	15,5172 a	16,6920 b	3,8906 b
<i>Epulorhiza</i> sp. ES2.2F	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,15 d	2,43 d	0,0156 c	0,0259 f	12,9635 a	18,0511 b	3,1073 b
<i>Epulorhiza</i> sp. ES2.3B	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,03 d	2,95 c	0,0167 c	0,0297 e	14,4406 a	14,9857 b	3,1475 b
<i>Epulorhiza</i> sp. ES2.3C	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,05 d	2,98 c	0,0174 c	0,0286 e	14,1792 a	15,4072 b	3,1310 b
<i>Epulorhiza</i> sp. ES3.1A	Aveludado	Creme	Escasso	Presente	Submersa	Bi	1,50 e	1,95 e	0,0108 d	0,0137 g	7,6486 b	18,4753 b	3,0056 b
<i>Epulorhiza</i> sp. ES3.1D	Aveludado	Creme	Escasso	Presente	Submersa	Bi	1,48 e	1,55 f	0,0075 e	0,0089 h	7,3533 b	12,4803 b	2,8258 b
<i>Epulorhiza</i> sp. ES3.1G	Aveludado	Creme	Escasso	Presente	Submersa	Bi	1,33 e	1,45 f	0,0073 e	0,0097 h	8,6728 b	13,3350 b	3,1293 b
<i>Epulorhiza</i> sp. ES3.3F	Aveludado	Creme	Escasso	Presente	Submersa	Bi	1,68 e	1,98 e	0,0102 d	0,0137 g	9,8711 b	12,6860 b	3,0809 b
*CV %							7,93	6,19	10,12	4,83	23,35	38,01	22,23

*M aéreo, micélio aéreo; C nuclear, condição nuclear; DBDA, diâmetro da colônia em meio BDA; DCMA, diâmetro da colônia determinada em meio CMA; TBDA, taxa de crescimento em meio BDA; TCMA, taxa de crescimento em meio CMA; LCM, largura de célula monilióide; CCM, comprimento de célula monilióide; DH, diâmetro de hifa; CV %, coeficiente de variação em porcentagem.

**Médias, nas colunas, seguidas de uma mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste de Scott Knott a 5 % de significância

	AG1	AGC	OB1.2G	OB1.3H	ES1.2A	ES1.2B	ES1.2D	ES1.3A	ES1.3E	ES1.3F	ES2.2B	ES2.2C	ES2.2D	ES2.2F	ES2.3B	ES2.3C	ES3.1A	ES3.1D	ES3.1G	ES3.3F	
AG1	0,33	-																			
AGC	0,50	0,50	-																		
OB1.2G	0,50	0,50	0,00	-																	
OB1.3H	0,50	0,50	0,00	0,00	-																
ES1.2A	1,00	0,83	0,83	0,83	0,00	-															
ES1.2B	1,00	0,83	0,83	0,83	0,00	0,00	-														
ES1.2D	1,00	0,83	0,83	0,83	0,00	0,00	0,00	-													
ES1.3A	1,00	0,83	0,83	0,83	0,00	0,00	0,00	0,00	-												
ES1.3E	1,00	0,83	0,83	0,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-											
ES1.3F	1,00	0,83	0,83	0,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-										
ES2.2B	1,00	0,83	0,83	0,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-									
ES2.2C	1,00	0,83	0,83	0,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-								
ES2.2D	1,00	0,83	0,83	0,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-							
ES2.2F	1,00	0,83	0,83	0,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-						
ES2.3B	1,00	0,83	0,83	0,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-					
ES2.3C	1,00	0,83	0,83	0,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-				
ES3.1A	1,00	0,83	0,83	0,83	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	-			
ES3.1D	1,00	0,83	0,83	0,83	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,00	-	
ES3.1G	1,00	0,83	0,83	0,83	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,00	0,00	-
ES3.3F	1,00	0,83	0,83	0,83	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,00	0,00	0,00

Figura 1: Matriz do complemento da similaridade, calculada a partir das características qualitativas apresentadas pelos fungos rizotonióides estudados, mostrando a variabilidade existente entre os isolados. Os códigos apresentados na matriz correspondem aos isolados estudados: AG1, *R. solani* AG11A; AGC, *Ceratorhiza* sp. AGC; os demais códigos são referentes aos isolados de *E. secundum* conforme a Tabela 1.

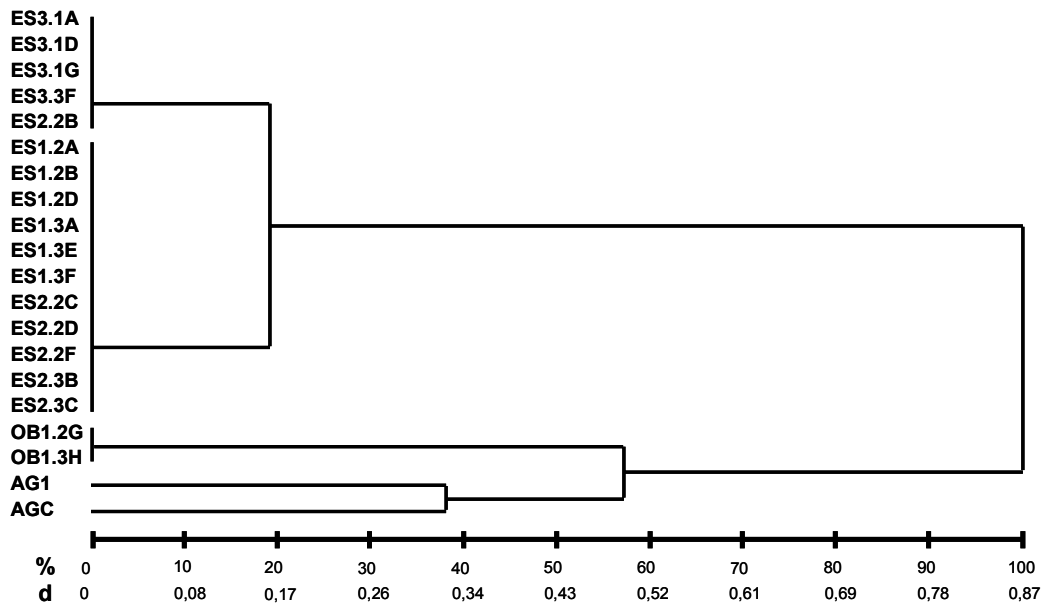


Figura 2: Agrupamento dos isolados de fungos rizotonióides estudados gerado a partir da análise das características qualitativas utilizando a dissimilaridade calculada pela técnica multicategórica e o método UPGMA. Os códigos apresentados no dendrograma correspondem aos isolados estudados: AG1, *R. solani* AG11A; AGC, *Ceratorhiza* sp. AGC; os demais códigos são referentes aos isolados de *E. secundum* conforme a Tabela 1. D, dissimilaridade; %, porcentagem em relação à dissimilaridade máxima.

	AG1	AGC	OB1.2G	OB1.3H	ES1.2A	ES1.2B	ES1.2D	ES1.3A	ES1.3E	ES1.3F	ES2.2B	ES2.2C	ES2.2D	ES2.2F	ES2.3B	ES2.3C	ES3.1A	ES3.1D	ES3.1G	ES3.3F
AGC	689,73	-																		
OB1.2G	746,45	26,70	-																	
OB1.3H	621,31	29,06	11,24	-																
ES1.2A	2379,48	707,47	690,19	737,01	-															
ES1.2B	2254,40	592,55	579,80	634,83	19,14	-														
ES1.2D	2119,15	551,28	548,88	596,89	20,51	6,18	-													
ES1.3A	2269,55	582,71	579,14	644,00	32,88	6,24	10,12	-												
ES1.3E	2221,46	620,19	625,29	667,97	14,31	12,02	7,85	16,29	-											
ES1.3F	2224,27	644,17	667,98	709,39	30,70	26,12	13,17	26,38	7,65	-										
ES2.2B	3842,44	1403,35	1388,86	1532,45	298,16	259,33	307,17	228,47	300,77	304,59	-									
ES2.2C	2709,78	831,82	820,46	890,86	32,06	23,17	40,32	25,07	31,19	43,11	149,68	-								
ES2.2D	2043,16	520,23	540,93	581,32	52,57	20,01	11,27	22,58	19,54	14,61	330,97	58,61	-							
ES2.2F	2348,73	624,49	644,02	709,18	66,71	23,09	28,77	12,54	31,16	30,65	203,12	30,10	20,63	-						
ES2.3B	2108,43	573,98	609,81	652,89	60,32	38,07	19,06	30,59	23,54	7,81	320,52	65,23	7,62	25,52	-					
ES2.3C	2121,01	565,87	599,64	648,61	63,67	34,64	18,91	26,04	26,85	11,39	302,21	63,55	8,62	21,26	1,01	-				
ES3.1A	3349,18	1082,21	1067,01	1193,83	184,32	149,54	191,88	128,08	196,27	211,97	35,22	86,49	221,58	125,03	225,07	207,78	-			
ES3.1D	3821,88	1355,76	1319,53	1465,80	290,77	252,51	311,52	229,24	310,70	332,35	15,22	153,94	348,03	219,99	353,69	333,60	21,09	-		
ES3.1G	3828,87	1369,20	1335,16	1476,08	276,19	242,34	300,87	223,93	297,91	317,70	14,72	141,95	335,08	212,56	341,22	323,16	21,77	1,61	-	
ES3.3F	3302,38	1082,88	1060,14	1181,98	167,32	130,45	169,32	110,89	172,53	184,53	25,87	66,27	194,77	104,27	197,22	181,76	7,66	23,51	22,41	-

Figura 3: Matriz da distância de Mahalanobis, calculada a partir das características quantitativas apresentadas pelos fungos rizoctonióides estudados, mostrando a variabilidade existente entre os isolados. Os códigos apresentados na matriz correspondem aos isolados estudados: AG1, *R. solani* AG11A; AGC, *Ceratorhiza* sp. AGC; os demais códigos são referentes aos isolados de *E. secundum* conforme a Tabela 1.

O dendrograma construído pelo método UPGMA, com base na matriz de D^2 (Figura 4), assim como a dispersão gráfica por variáveis canônicas (Figura 5), separou os isolados em quatro grupos. Os isolados de *Epulorhiza* spp. formaram um grupo claramente distinto dos demais e houve a formação de dois grupos entre esses isolados (Figuras 4 e 5). Foi observada uma grande similaridade entre os dois fungos rizoctonióides uninucleados e o isolado de *Ceratorhiza* sp. (Figuras 4 e 5).

Segundo o critério de Singh (1981), baseado na distância de Mahalanobis, a característica quantitativa TCMA foi a de maior contribuição para a diversidade observada entre os isolados, sendo seguida da característica TBDA (Tabela 3). DH foi a característica que apresentou a menor contribuição para determinação dessa diversidade, sendo sugerida para descarte (Tabela 3).

A partir da comparação dos fungos rizoctonióides pela técnica RAPD, utilizando-se 9 oligonucleotídeos aleatórios e 140 loci, observou-se na matriz de dissimilaridade que a menor distância foi observada entre os isolados de *Epulorhiza* sp., enquanto que a maior distância foi entre o isolado uninucleado OB1.3H e *Epulorhiza* sp. ES1.2B (Figura 6). Isolados obtidos de uma mesma população de orquídea apresentaram distâncias menores do que 0,387, exceto o isolado ES2.2B, que

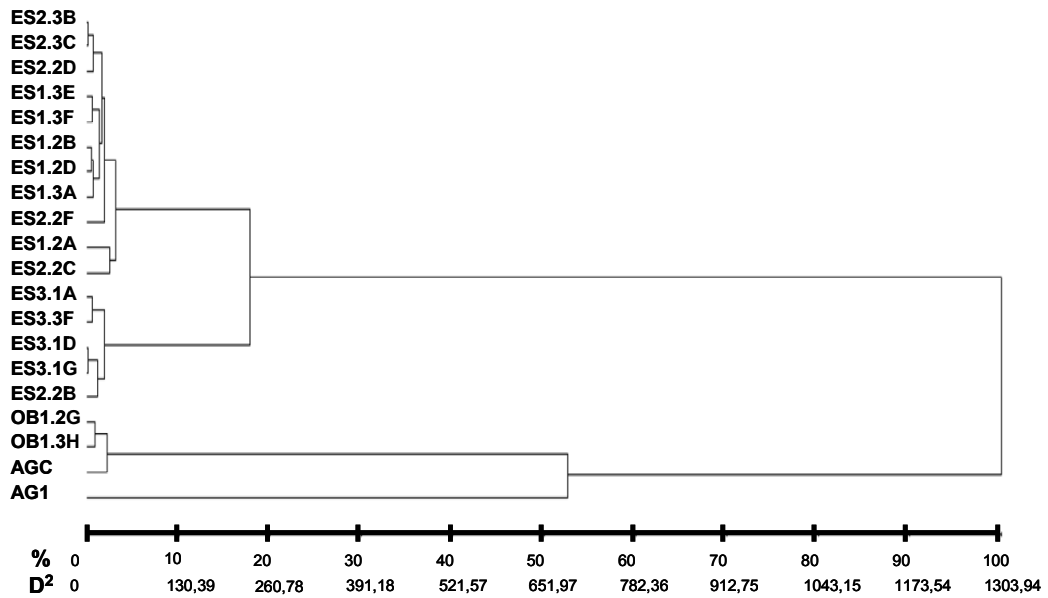


Figura 4: Agrupamento dos isolados de fungos rizoctonióides estudados a partir da análise das características quantitativas utilizando a distância de Mahalanobis e o método UPGMA. Os códigos apresentados no dendrograma correspondem aos isolados estudados: AG1, *R. solani* AG11A; AGC, *Ceratorhiza* sp. AGC; os demais códigos são referentes aos isolados de *E. secundum* conforme a Tabela 1. D^2 , distância de Mahalanobis; %, porcentagem em relação à distância de Mahalanobis máxima.

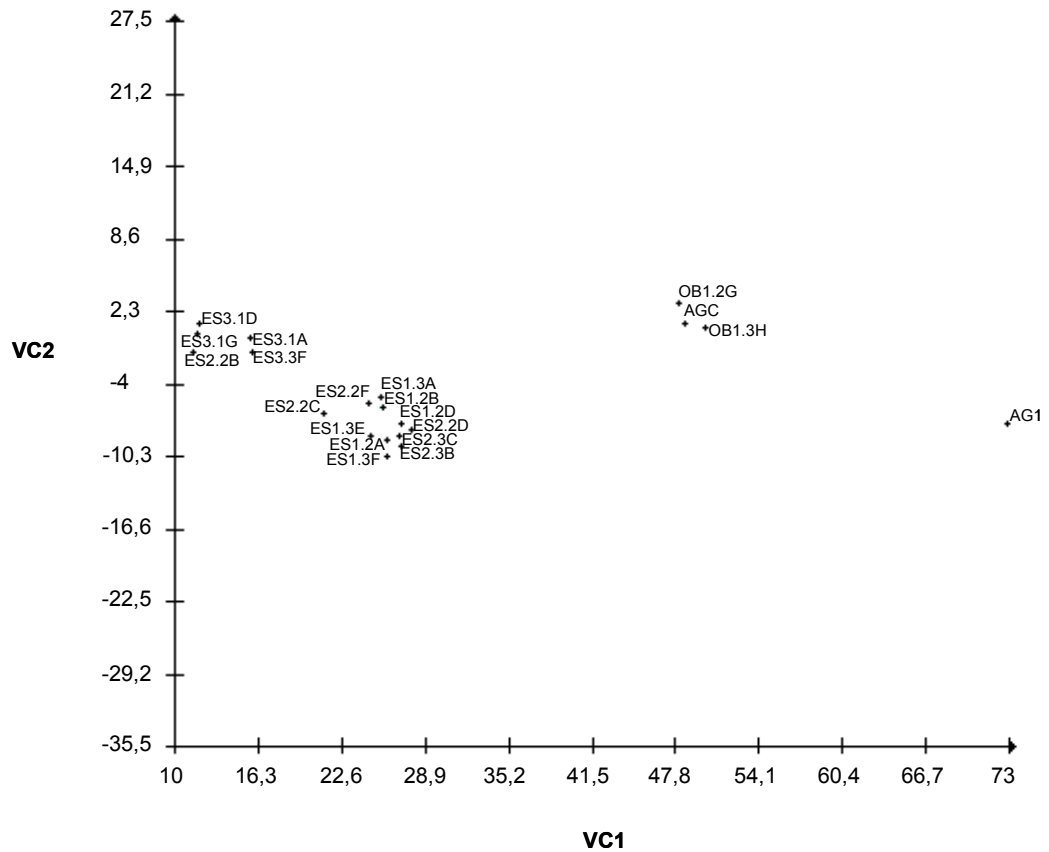


Figura 5: Dispersão gráfica dos isolados de fungos rizoctonióides estudados baseada nas duas primeiras variáveis canônicas (VC1 e VC2), calculadas a partir dos dados das características morfológicas quantitativas, mostrando a variabilidade existente entre os isolados. Os códigos apresentados na dispersão gráfica correspondem aos isolados estudados: AG1, *R. solani* AG1IA; AGC, *Ceratorhiza* sp. AGC; os demais códigos são referentes aos isolados de *E. secundum* conforme a Tabela 1.

Tabela 3: Contribuição relativa das características morfológicas quantitativas na estimativa da diversidade observada entre os isolados, calculada segundo o critério de Singh (1981), baseado na distância de Mahalanobis.

Variável*	Valor em Porcentagem
DBDA	18,55
DCMA	13,15
TBDA	25,50
TCMA	38,74
LCM	2,48
CCM	1,45
DH	0,13

*DBDA, diâmetro da colônia em meio BDA; DCMA, diâmetro da colônia em meio CMA; TBDA, taxa de crescimento em meio BDA; TCMA, taxa de crescimento em meio CMA; LCM, largura de célula monilióide; CCM, comprimento de célula monilióide; DH, diâmetro de hifa.

	AG1	AGC	OB1.2G	OB1.3H	ES1.2A	ES1.2B	ES1.2D	ES1.3A	ES1.3E	ES1.3F	ES2.2B	ES2.2D	ES2.2F	ES2.3B	ES2.3C	ES3.1A	ES3.1D	ES3.1G	ES3.3F
AG1	0,300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AGC	0,145	0,282	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OB1.2G	0,145	0,282	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OB1.3H	0,145	0,282	0,000	0,832	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES1.2A	0,841	0,975	0,832	0,832	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES1.2B	0,841	0,975	0,832	0,832	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES1.2D	0,841	0,975	0,832	0,832	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES1.3A	0,841	0,975	0,832	0,832	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES1.3E	0,841	0,975	0,832	0,832	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES1.3F	0,829	0,961	0,820	0,820	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES2.2B	0,844	1,039	0,794	0,794	0,457	0,457	0,457	0,457	0,457	0,457	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES2.2D	0,853	0,989	0,844	0,844	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006	0,464	-	-	-	-	-	-	-	-
ES2.2F	0,853	0,989	0,844	0,844	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006	0,464	0,000	-	-	-	-	-	-	-
ES2.3B	0,841	0,989	0,844	0,844	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,009	0,456	0,009	0,009	-	-	-	-	-	-
ES2.3C	0,841	0,975	0,832	0,832	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,457	0,003	0,003	0,006	-	-	-	-	-
ES3.1A	0,856	1,055	0,806	0,806	0,464	0,464	0,464	0,464	0,464	0,464	0,003	0,470	0,470	0,462	0,464	-	-	-	-
ES3.1D	0,844	1,039	0,794	0,794	0,457	0,457	0,457	0,457	0,457	0,457	0,000	0,464	0,464	0,456	0,457	0,003	-	-	-
ES3.1G	0,844	1,039	0,794	0,794	0,457	0,457	0,457	0,457	0,457	0,457	0,000	0,464	0,464	0,456	0,457	0,003	0,000	-	-
ES3.3F	0,853	1,067	0,803	0,803	0,464	0,464	0,464	0,464	0,464	0,464	0,006	0,471	0,471	0,463	0,464	0,003	0,006	0,006	-

Figura 6: Matriz de dissimilaridade (d) dos isolados de fungos rizoctonióides estudados, calculada com base no padrão de bandas de RAPD utilizando o índice de Jaccard, mostrando a variabilidade existente entre os isolados. Os códigos apresentados na matriz correspondem aos isolados estudados: AG1, *R. solani* AG11A; AGC, *Ceratorhiza* sp. AGC; os demais códigos são referentes aos isolados de *E. secundum* conforme a Tabela 1.

apresentou distância maior do que 0,723 em relação aos isolados de sua população, ES2 (Figura 6). Ao agrupar os isolados utilizando essa matriz de dissimilaridade e o método UPGMA, observou-se a formação de sete grupos ao se cortar o dendrograma a 50 % de dissimilaridade (Figura 7). Os fungos isolados de uma mesma orquídea foram reunidos em um mesmo grupo, exceto o isolado ES2.2B, que não agrupou com os demais isolados da população 2 (Figura 7). O isolado ES2.2B e os isolados de *R. solani* AG1IA (AG1) e de *Ceratorhiza* sp. AGC não apresentaram similaridade a nenhum dos isolados analisados, com dissimilaridade maior do que 0,70, de forma que cada um desses isolados formou um grupo distinto (Figura 7).

O produto de PCR, obtido a partir da amplificação da região ITS do rDNA dos fungos estudados, apresentou fragmentos de aproximadamente 600 pb quando analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Com base na análise do alinhamento dessas seqüências, foi construída a matriz de distância de Kimura 2-Parâmetros, que mostrou as maiores distâncias entre os isolados *Epulorhiza* spp. e *Ceratorhiza* sp. AGC e as menores distâncias entre os isolados de *Epulorhiza* spp. (Figura 8). Após a análise dessa matriz pelo método Neighbor-Joining, os diferentes gêneros foram separados e houve a identificação de dois grupos entre os isolados de *Epulorhiza* spp., no qual isolados da população ES1 e ES2 foram reunidos em um mesmo grupo, com exceção do isolado ES2.2B, que formou o segundo grupo juntamente com os isolados da população ES3 (Figura 9).

Na análise do alinhamento, contendo seqüências da região ITS do rDNA dos isolados *Epulorhiza* spp. estudados e de fungos *Epulorhiza* spp. e *Tulasnella* spp., depositadas no banco de dados, observou-se que os isolados das populações ES1 e ES2, exceto o isolado ES2.2B, foram agrupados com *Tulasnella calospora* Aut., acesso AB369939. As seqüências dos isolados da população ES3 foram agrupados às seqüência de *Tulasnella albida* Bourdot & Galzin, *Tulasnella pruinosa* Bourdot & Galzin e *Tulasnella violea* (Qué.) Bourdot & Galzin, mas

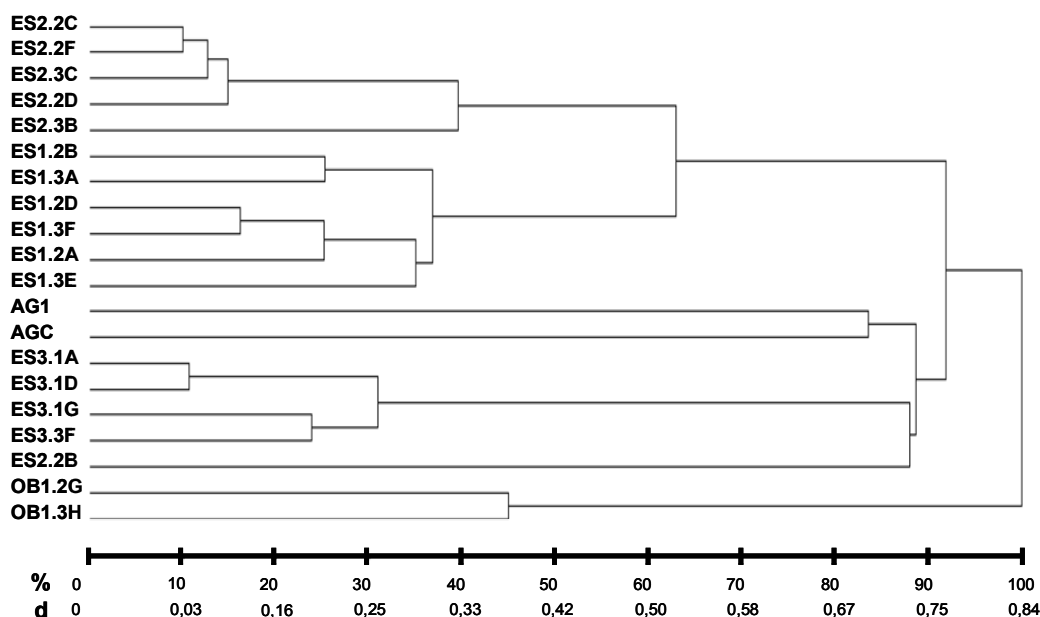


Figura 7: Agrupamento dos isolados de fungos rizoctonióides estudados a partir da análise da dissimilaridade (d) calculada a partir do padrão de bandas de RAPD utilizando o índice de Jaccard e o método UPGMA. Os códigos apresentados no dendrograma correspondem aos isolados estudados: AG1, *R. solani* AG1IA; AGC, *Ceratorhiza* sp. AGC; os demais códigos são referentes aos isolados de *E. secundum*, conforme a Tabela 1.

	AG1	AGC	OB1.2G	OB1.3H	ES1.2A	ES1.2B	ES1.2D	ES1.3A	ES1.3E	ES1.3F	ES2.2B	ES2.2D	ES2.2F	ES2.3B	ES2.3C	ES3.1A	ES3.1D	ES3.1G	ES3.3F
AG1	0,300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AGC	0,145	0,282	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OB1.2G	0,145	0,282	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OB1.3H	0,145	0,282	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES1.2A	0,841	0,975	0,832	0,832	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES1.2B	0,841	0,975	0,832	0,832	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES1.2D	0,841	0,975	0,832	0,832	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES1.3A	0,841	0,975	0,832	0,832	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES1.3E	0,841	0,975	0,832	0,832	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES1.3F	0,829	0,961	0,820	0,820	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES2.2B	0,844	1,039	0,794	0,794	0,457	0,457	0,457	0,457	0,457	0,457	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES2.2D	0,853	0,989	0,844	0,844	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006	0,464	-	-	-	-	-	-	-	-
ES2.2F	0,853	0,989	0,844	0,844	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006	0,464	0,000	-	-	-	-	-	-	-
ES2.3B	0,841	0,989	0,844	0,844	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,009	0,456	0,009	0,009	-	-	-	-	-	-
ES2.3C	0,841	0,975	0,832	0,832	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,457	0,003	0,003	0,006	-	-	-	-	-
ES3.1A	0,856	1,055	0,806	0,806	0,464	0,464	0,464	0,464	0,464	0,464	0,003	0,470	0,470	0,462	0,464	-	-	-	-
ES3.1D	0,844	1,039	0,794	0,794	0,457	0,457	0,457	0,457	0,457	0,457	0,000	0,464	0,464	0,456	0,457	0,003	-	-	-
ES3.1G	0,844	1,039	0,794	0,794	0,457	0,457	0,457	0,457	0,457	0,457	0,000	0,464	0,464	0,456	0,457	0,003	0,000	-	-
ES3.3F	0,853	1,067	0,803	0,803	0,464	0,464	0,464	0,464	0,464	0,464	0,006	0,471	0,471	0,463	0,464	0,003	0,006	0,006	-

Figura 8: Matriz de dissimilaridade dos isolados de fungos rizoctonióides estudados, calculada a partir da análise do alinhamento das seqüências da região ITS do rDNA utilizando o algoritmo Kimura 2-Parâmetros, mostrando a variabilidade existente entre os isolados. Os códigos apresentados na matriz correspondem aos isolados estudados: AG1, *R. solani* AG1IA; AGC, *Ceratorhiza* sp. AGC; os demais códigos são referentes aos isolados de *E. secundum*, conforme a Tabela 1.

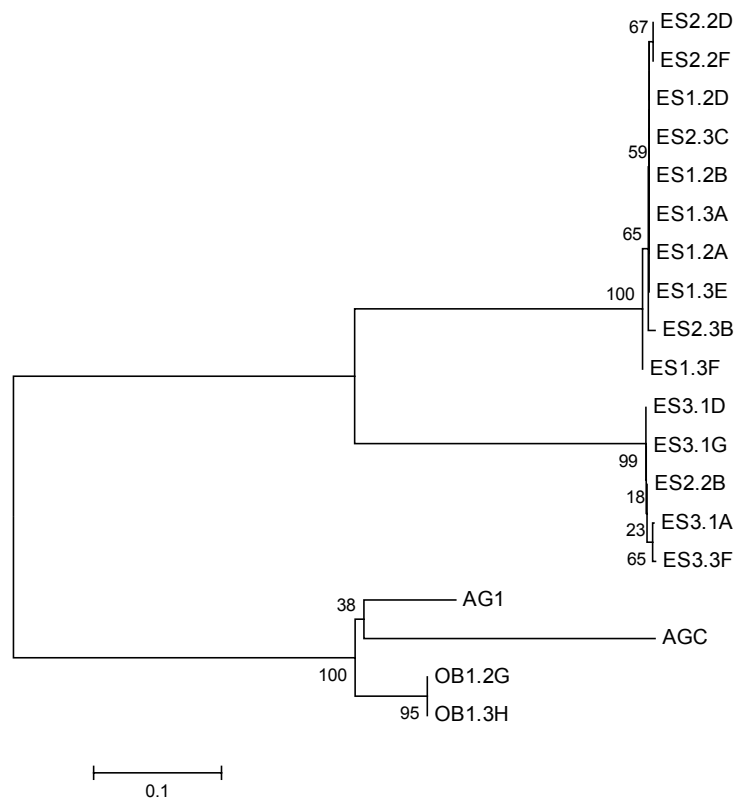


Figura 9: Agrupamento dos isolados de fungos rizotonióides estudados com base na análise do alinhamento das seqüências da região ITS do rDNA utilizando a distância Kimura 2-Parâmetros, o método Neighbor-Joining e bootstraps com 5000 repetições. Os códigos apresentados no dendrograma correspondem aos isolados estudados: AG1, *R. solani* AG1IA; AGC, *Ceratorhiza* sp. AGC; os demais códigos são referentes aos isolados de *E. secundum* conforme a Tabela 1.

apresentaram grande dissimilaridade (Figura 10).

Ao analisar o alinhamento das seqüências dos fungos rizoctonióides uninucleados, dos isolados de *Ceratorhiza* sp. AGC e *R. solani* e das seqüências de outros fungos desses gêneros, e respectivos gêneros teleomórficos, obtidas do banco de dados NCBI, utilizando-se a distância de Kimura 2-Parâmetros e o método Neighbor-Joining, não foi observada grande identidade da seqüência de *Ceratorhiza* sp. AGC com outras seqüências do banco de dados (Figura 11). Nessa mesma análise, as seqüências dos isolados uninucleados e de *R. solani* AG1IA foram agrupadas em um grupo maior (Figura 11). Ao analisar esse grupo, utilizando-se apenas seqüências mais similares, *R. solani* AG1IA agrupou com seqüências de *R. solani* AF472512 e *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk EU244843 e os isolados uninucleados apresentaram identidade às seqüências de isolados do gênero *Ceratobasidium* (Figura 12). Com isso, pode-se identificar os isolados uninucleados como *Ceratorhiza* sp.

Na simulação computacional da clivagem por enzimas de restrição do alinhamento, contendo seqüências da região ITS do rDNA dos isolados *Epulorhiza* spp. e seqüências de outros 10 fungos Tulasnellaceae obtidas no banco de dados NCBI, as quais apresentavam tamanho entre 351 a 361 pares de base, encontrou-se sítios de clivagem de 83 enzimas em pelo menos uma das seqüências analisadas, enquanto que apenas 20 clivaram todas as seqüências. O mesmo procedimento foi realizado com alinhamento contendo seqüências de apenas Ceratobasidiaceae, tanto dos isolados estudados como das seqüências obtidas no banco de dados NCBI. Foram encontradas 68 enzimas com pelo menos um sítio de clivagem em pelo menos uma das dez seqüências analisadas, sendo que apenas 16 clivaram todos os isolados. Dado a grande variabilidade existente entre a região ITS1 e ITS4 das seqüências dos isolados Ceratobasidiaceae e Tulasnellaceae, não foi possível analisá-los em conjunto nessa simulação.

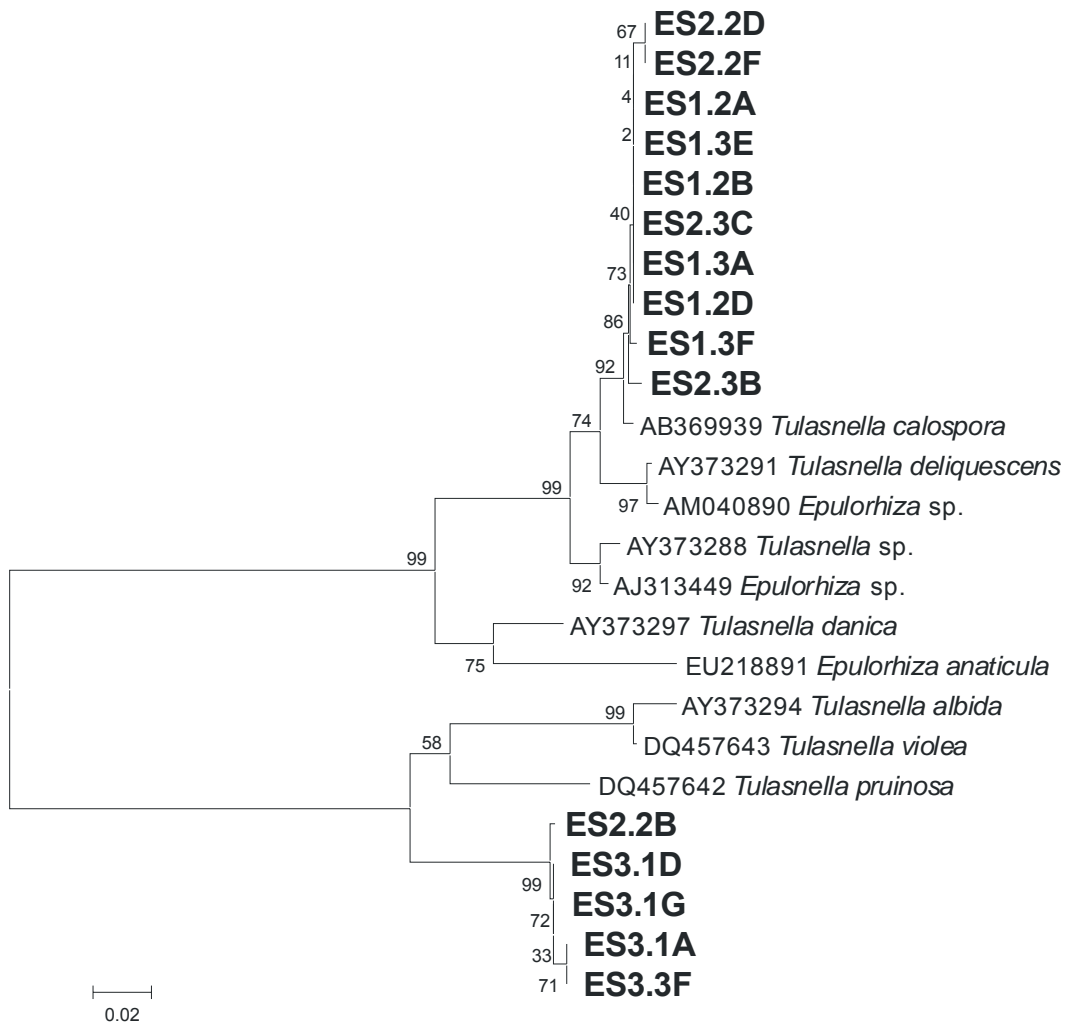


Figura 10: Agrupamento dos fungos rizoctonióides *Epulorhiza* spp., pelo método do Neighbor-Joining e a matriz de distância Kimura 2-Parâmetros calculada a partir do alinhamento das seqüências da região ITS do rDNA. Os estão precedidos do código de isolamento. Os códigos em destaque no dendrograma são referentes aos fungos micorrízicos isolados de *E. secundum*, conforme a Tabela 1.

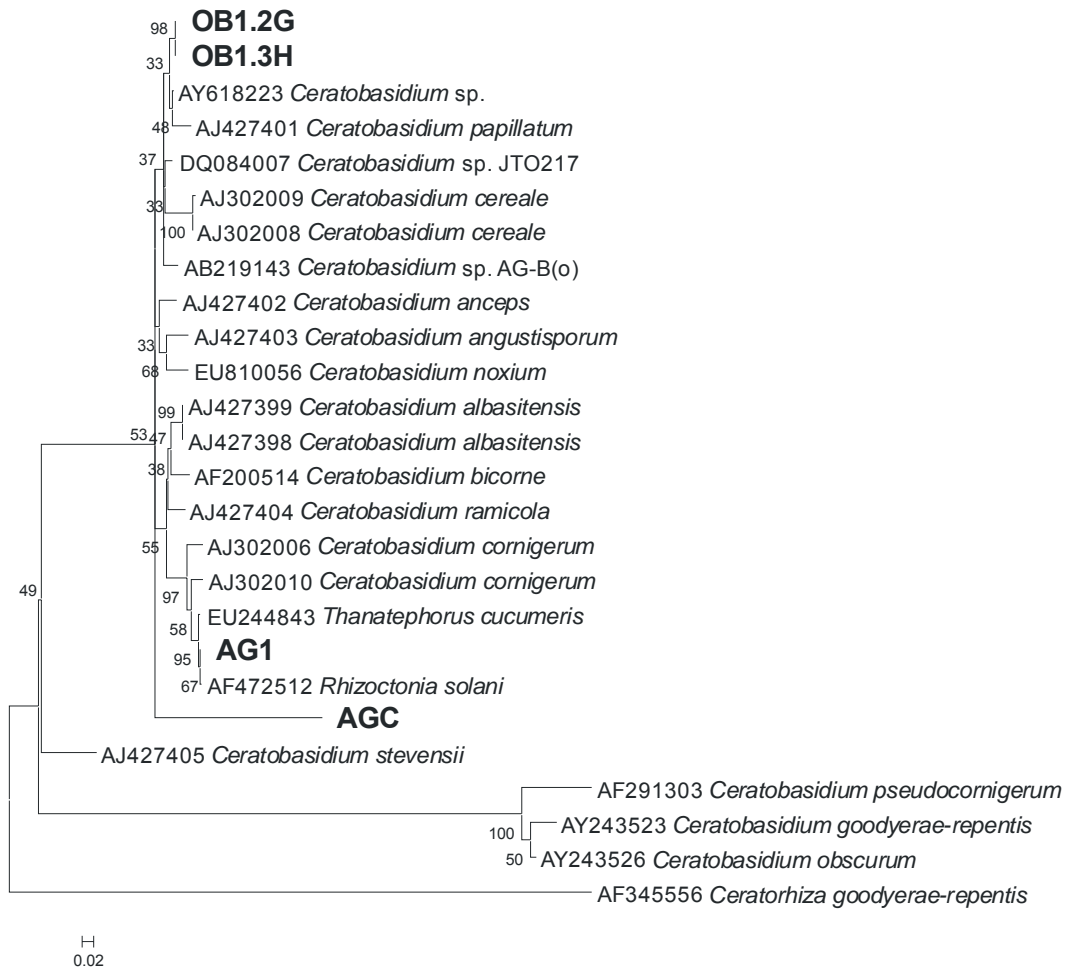


Figura 11: Agrupamento dos isolados de fungos rizoctonióides uninucleados (OB1.2G e OB1.3H), *Ceratorhiza* sp. AGC, *R. solani* AG1IA (AG1), *Thanatephorus* spp. e *Ceratobasidium* spp. com base na matriz de dissimilaridade calculada a partir do alinhamento das seqüências da região ITS do rDNA utilizando o algoritmo Kimura 2-Parâmetros e o método Neighbor-Joining.

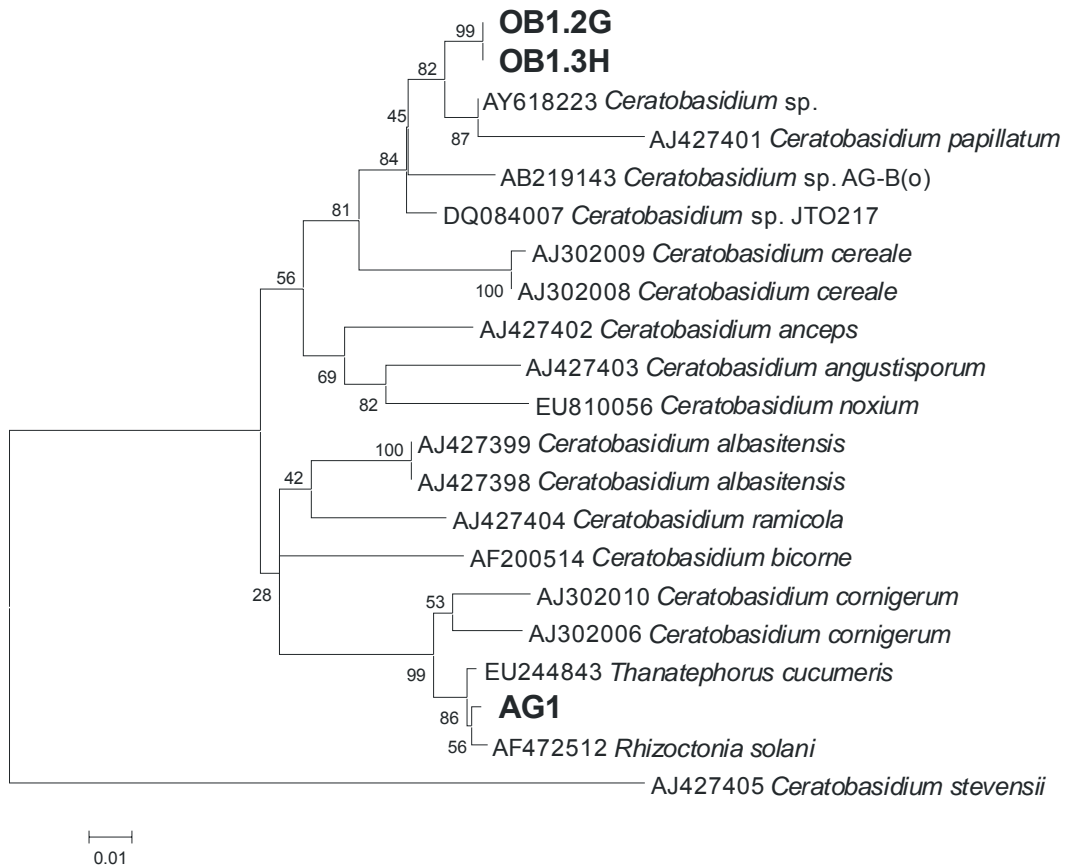


Figura 12: Agrupamento dos isolados de fungos rizoctonióides uninucleados (OB1.2G e OB1.3H), *R. solani* AG1IA (AG1), *Thanatephorus* spp. e *Ceratobasidium* spp. com base na matriz de dissimilaridade calculada a partir do alinhamento das seqüências da região ITS do rDNA utilizando o algoritmo Kimura 2-Parâmetros e o método Neighbor-Joining.

Todas as seqüências da região ITS do rDNA de fungos Tulasnellaceae analisadas apresentaram sítios de clivagem para *BamHI*, em regiões bem conservadas, o que não foi observado nas seqüências de *Ceratorhiza* spp. e *R. solani*. As enzimas *HinfI*, *HpaII* e *MboI* apresentaram sítio de clivagem nas seqüências de todos os Tulasnellaceae analisados. Além disso, os sítios de restrição dessas enzimas estão localizados em posições conservadas nas seqüências agrupadas em um mesmo clado, mas apresentam diferenças entre seqüências agrupadas em diferentes cladogramas. Essas quatro enzimas foram utilizadas para clivagem da região ITS de isolados de fungos micorrízicos representativos de cada uma das populações de orquídeas. Assim, o produto da reação de PCR da região ITS dos isolados ES1.2A, ES2.2B, ES2.3B, ES3.1D e OB1.3H foram submetidos à reação de clivagem, sendo observado um padrão de bandas (Figura 13) que foi utilizado para agrupar esses isolados, utilizando-se o complemento da distância de Jaccard e o método UPGMA, sendo observado o agrupamento dos isolados ES1.2A e ES2.3B, assim como dos isolados ES2.2B e ES3.1D (Figura 14). O isolado de *Ceratorhiza* sp. uninucleado, OB1.3H, foi distinto dos demais, não agrupando com nenhum deles (Figura 14). Ao analisar a seqüência da região ITS dos isolados *R. solani* AG1 e *Ceratorhiza* sp. AGC por ITS-RFLP, utilizando-se as mesmas enzimas, observou-se que apenas *HinfI* e *MboI* são capazes de clivar a seqüência desses isolados.

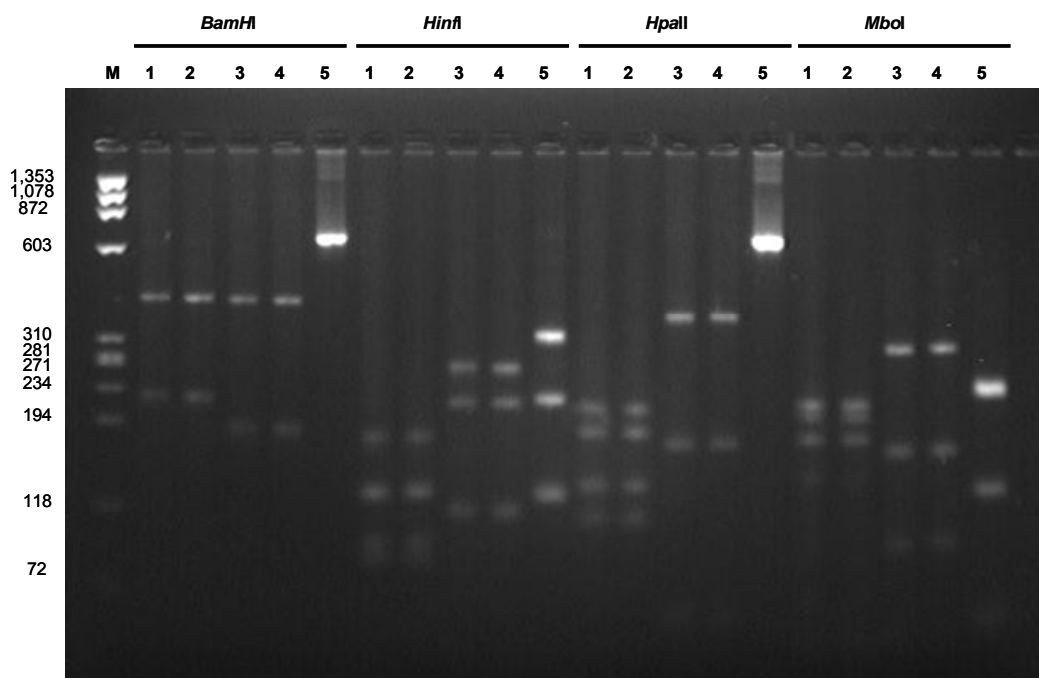


Figura 13: Análise da variabilidade existente entre isolados de fungos micorrízicos de orquídea *Epulorhiza* spp., ES1.2A (2), ES2.3B (1), ES2.2B (3) e ES3.1D (4), e de fungos rizotonióides uninucleados, OB1.3H (5), utilizando-se da técnica ITS-RFLP. A região ITS foi amplificada por PCR e o produto clivado com as enzimas *BanHI*, *HinfI*, *HpaII* e *MboI*.

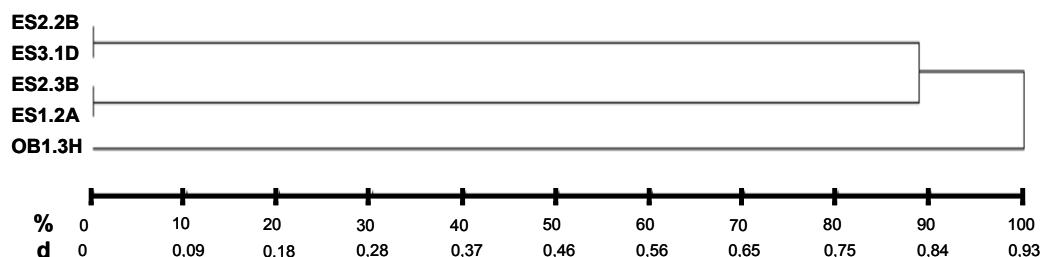


Figura 14: Agrupamento dos isolados de fungos rizotonióides micorrízicos de orquídea com base no padrão de bandas gerado na análise ITS-RFLP utilizando as enzimas *BanHI*, *HinfI*, *HpaII* e *MboI*. Com base no padrão de bandas, foi criada uma matriz de ausência e presença, utilizada para calcular o complemento da distância de Jaccard e para agrupamento utilizando o método UPGMA. Os códigos dos isolados estudados são conforme apresentado na Tabela 1.

IV. DISCUSSÃO

Os isolados do gênero *Epulorhiza* estudados nesse trabalho, já haviam sido caracterizados morfológicamente por Pereira et al. (2009). Entretanto, esses autores não puderam concluir se todos os isolados pertenciam a uma mesma espécie e se a variabilidade observada seria devida à variação em nível de população, ou se cada grupo de isolados representava uma espécie diferente. Com base na caracterização morfológica e molecular, foi possível confirmar que há variabilidade entre os fungos *Epulorhiza* spp. obtidos das diferentes populações de *E. secundum*, os quais pertencem a duas espécies do gênero *Epulorhiza*. Além disso, foi possível distinguir os isolados *Epulorhiza* spp. dos isolados pertencentes aos gêneros *Ceratorhiza* e *Rhizoctonia*.

As características morfológicas permitiram a identificação do gênero dos simbiontes estudados e as características moleculares, além de confirmarem essa identificação, possibilitaram a separação das espécies. Os dezesseis isolados *Epulorhiza* spp. apresentaram as características morfológicas típicas descritas para esse gênero (Tabela 2) (Currah e Zelmer, 1992; Currah et al., 1997; Shan et al., 2002; Ma et al., 2003; Pereira et al., 2003; 2005a; 2009; Nogueira, 2004; Nogueira et al., 2005) e foram separados em dois grupos nas análises de agrupamento realizadas (Figuras 2, 4 e 5).

Isolados de fungos rizoctonióides uninucleados têm sido obtidos de orquídeas do Brasil (Pereira et al., 2006; Oliveira et al., 2008) e de Porto Rico (Otero et al., 2002). Os isolados de uninucleados obtidos de *O. barbaceniae* apresentaram características morfológicas qualitativas semelhantes às de isolados de *Ceratorhiza* sp. obtidos de orquídeas brasileiras (Nogueira, 2004; Nogueira et al., 2005; Pereira et al., 2005a;b): aspecto cotonoso, coloração creme, micélio aéreo abundante e hifas aéreas alcançando a tampa da placa de forma homogênea. O que sugere que esses isolados uninucleados pertencessem ao gênero *Ceratorhiza*. Isolados uninucleados também foram observados como patógenos agressivos de raízes de *Pinus silvestre* L. (Lilja et al., 1992) e forma basídio característico de *Ceratobasidium* sp. (Hietala et al., 1994).

As características quantitativas avaliadas neste estudo apresentaram diferentes porcentagens de contribuição relativa ao se estimar a diversidade dos fungos rizoctonióides (Tabela 3), sendo as taxas de crescimento, seguidas dos diâmetros da colônia, as características que mais contribuíram com a variabilidade observada. A DH contribuiu com menos de 1 % para a variabilidade observada e foi sugerida para descarte, não apenas por apresentar uma porcentagem baixa de contribuição, mas por apresentar a menor porcentagem. Verifica-se, portanto, que DH não é útil para se estimar a variabilidade em trabalhos que objetivam analisar a diversidade através de características morfológicas. Contudo, DH, assim como as dimensões das células monilióides, são características importantes na identificação de isolados e descrição de espécies (Currah e Zelmer, 1992; Zelmer e Currah, 1995; Currah et al., 1997; Pereira et al., 2003).

Tanto as características morfológicas vegetativas quanto as das estruturas reprodutivas são de grande aplicação na identificação de isolados fúngicos (Andersen e Rasmussen, 1996; Ogoshi, 1996; Taylor et al., 2002). Dada a existência de variação entre as características de culturas de isolados de uma mesma espécie e a grande dificuldade de se induzir a formação de estruturas reprodutivas em fungos rizoctonióides, a aplicação de técnicas moleculares para auxiliar na identificação tem sido vista como essencial (Bruns et al., 1991; Ogoshi, 1996; Horton e Bruns, 2001; Taylor et al., 2002). Entretanto, os dados obtidos sugerem que as características morfológicas permitem agrupar fungos de um mesmo gênero, assim como de uma mesma espécie, possibilitando selecionar isolados para uma posterior análise molecular e identificação.

Da mesma forma que as características morfológicas, as características moleculares permitiram a distinção dos gêneros dos fungos estudados, exceto a análise por RAPD, e a separação do grupo dos isolados do gênero *Epulorhiza* em dois sub-grupos (Figuras 9, 10, 11 e 13). Esse resultado permitiu concluir que os isolados do gênero *Epulorhiza* são representantes de duas espécies, *Epulorhiza* sp.1, representada pelos isolados das populações ES1 e ES2, exceto ES2.2B,

e *Epulorhiza* sp.2, representada pelos isolados das populações ES3 e o isolado ES2.2B. No agrupamento baseado na análise dos isolados por RAPD, o isolado ES2.2B apresentou grande dissimilaridade em relação aos demais isolados do gênero *Epulorhiza* (Figura 7) e foi essa a discordância observada entre essa análise e as demais. Tal discordância pode ser explicada pela sensibilidade dessa técnica às variações existentes entre populações e entre espécies (Cubeta e Vilgalys, 1997; Shan et al., 2002; Sharon et al., 2006), de modo que ES2.2B não foi agrupado aos demais isolados de sua população de origem, por pertencer a uma espécie diferente, e nem aos isolados da sua espécie, por ter sido obtido em uma população hospedeira diferente.

As seqüências da região ITS dos isolados de *Epulorhiza* sp1. apresentaram identidade à seqüência de *T. calospora* (Figura 10). Esse teleomorfo não tem anamorfo correspondente descrito na literatura consultada. As seqüências dos isolados *Epulorhiza* sp.2 não apresentaram identidade a nenhuma das seqüências de fungos *Epulorhiza* spp. contidas no banco do NCBI (Figura 10). Técnicas moleculares revolucionaram os estudos dos simbiontes fúngicos associados a orquídeas, pois, regiões conservadas do DNA dos fungos, analisadas por RFLP ou com base na seqüência de nucleotídeos, têm reforçado as identificações propostas com base em características morfológicas e agilizado os estudos, eliminando a necessidade de avaliar essas características e de, até mesmo, isolar os simbiontes (Taylor e Bruns, 1997; 1999; Kristiansen et al., 2001; 2004; Otero et al., 2002; 2004; 2007; Selosse et al., 2002; Taylor et al., 2004; Pereira et al., 2005a; Shefferson et al., 2005; 2007; 2008; Dearlaney e Brocque, 2006; Suárez et al., 2006; 2008; Bonnardeaux et al., 2007). A partir da análise do rDNA por essas técnicas, é possível relacionar, mais facilmente, fungos micorrízicos de orquídeas obtidos em diferentes trabalhos. Entretanto, a identificação da espécie de isolados, a partir apenas das técnicas moleculares, pode ser limitada pela inexistência das culturas de referência identificadas que possuam informações dessa região disponíveis. Desta forma, de posse da cultura pura de *Epulorhiza* sp.1 e *Epulorhiza* sp.2,

pode-se descrever a espécie anamórfica, armazenar a cultura como referência e disponibilizar as seqüências para serem utilizadas em outros estudos.

A existência de um representante de *Epulorhiza* sp.2 entre os isolados obtidos da população ES2 mostra que o mesmo é capaz de se dispersar e crescer na região de campo graminóide da população ES1 e ES2, mesmo que de maneira menos competitiva. Porém, *Epulorhiza* sp.1 não foi obtido de raízes de *E. secundum* da população ES3, provavelmente por não ter sido dispersado para essa região ou por ser incapaz de colonizar o substrato que suporta essa população hospedeira tão eficientemente como *Epulorhiza* sp.2. Pereira (2006) observou que diferentes isolados de *Epulorhiza* sp.1 e *Epulorhiza* sp.2 são capazes de promover a germinação de sementes de *E. secundum* coletadas de plantas da ES2, porém os protocórmios germinados na presença de isolados de *Epulorhiza* sp.1, obtidos da população ES1 e ES2, desenvolviam muito mais rápido que os protocórmios germinados na presença dos isolados de *Epulorhiza* sp.2. Além disso, *Epulorhiza* sp.1 apresenta, em meio de cultura, uma taxa de crescimento até três vezes maior que *Epulorhiza* sp.2 (Tabela 2). Esses dois fatores podem ter influenciado na maior colonização de raízes de *E. secundum* das populações ES1 e ES2 por *Epulorhiza* sp.1.

Não foi encontrada nenhuma seqüência com alta identidade às seqüências dos fungos micorrízicos de *O. barbaceniae*, nem mesmo à seqüência de *C. bicornis*, um dos fungos rizoctonióides que contém condição uninucleada (Hietala et al., 1994; 2001). Mas os isolados de *O. barbaceniae* apresentaram identidade de seqüência a fungos do gênero *Ceratobasidium* (Figura 12), concordando com o agrupamento baseado nas características quantitativas, no qual esses isolados ficaram agrupados a *Ceratorhiza* sp. AGC (Figuras 4 e 5).

A avaliação da seqüência da região ITS em computador mostrou que os sítios de clivagem de enzimas de restrição estão localizados em posições semelhantes nas seqüências de isolados pertencentes a uma mesma espécie, mas estão localizados em posições diferentes quando

são comparados isolados de diferentes espécies do gênero *Epulorhiza* e isolados de diferentes gêneros: *Epulorhiza*, *Ceratorhiza* e *Rhizoctonia*. Isso foi confirmado ao avaliar a região ITS de dois isolados representativos de cada espécie de *Epulorhiza* e um representante dos fungos micorrízicos de *O. barbaceniae* pela técnica de RFLP utilizando quatro enzimas de restrição. Os dois isolados *Epulorhiza* sp.1. selecionados apresentaram o mesmo padrão bandas de RFLP, assim como os dois isolados *Epulorhiza* sp.2. Entretanto, *Epulorhiza* sp.1 e *Epulorhiza* sp.2 foram distinguidos (Figuras 13 e 14). Essa informação tem posterior aplicação na identificação de simbiontes presentes no sistema radicular de orquídeas, pois a técnica ITS-RFLP tem apresentado grande aplicação para detectar diferenças entre isolados de diferentes espécies de um mesmo gênero, assim como, entre isolados de diferentes gêneros, de uma forma rápida (Bruns et al., 1991; Taylor e Bruns, 1999; Horton e Bruns, 2001; Taylor et al., 2004; Pereira et al., 2005a; Shefferson et al., 2007). Esta técnica é sensível a pequenas variações na seqüência analisada, pois as diferenças entre taxas são, geralmente, resultado de inserções ou deleções de nucleotídeos que causam variação de tamanho nos fragmentos de DNA obtidos. Dessa forma, pode-se realizar a comparação entre isolados pelo padrão de bandas de forma simples e, assim, determinar a existência ou não de identidade em nível de espécie (Horton e Bruns, 2001).

Com base na caracterização morfológica e molecular dos isolados, é possível estabelecer a melhor estratégia de obtenção de dados para estimar a diversidade de fungos micorrízicos de orquídea. Uma vez que as análises dos dados obtidos, a partir da caracterização morfológica, apresentaram resultados semelhantes às análises dos dados obtidos por técnicas moleculares, pode-se escolher a técnica a ser adotada para estimar a diversidade com base nos recursos disponíveis. Os dados morfológicos quantitativos possibilitaram, com um menor custo, distinguir entre os três gêneros de fungos rizoctonióides estudados e detectar variabilidade entre isolados geneticamente próximos. Considerando que DH foi descartado na análise pelo critério de Singh (1981 – Tabela 3),

avaliando-se as características morfológicas quantitativas TBDA, TCMA, DBDA, DCMA, LCM e CCM, é possível estimar a diversidade de fungos rizoctonióides micorrízicos de orquídea. Desta forma, a análise da seqüência da região ITS do rDNA serviria como uma ferramenta para confirmar a identificação proposta com base na caracterização morfológica. Entretanto, dispondo de mais recursos, pode-se estimar a diversidade e identificar os simbiosomas de orquídeas apenas com a análise da seqüência da região ITS.

V. CONCLUSÕES

1. Os fungos micorrízicos isolados de *E. secundum* estudados são representantes de duas espécies do gênero *Epulorhiza*.
2. As características morfológicas possibilitam distinguir as duas espécies de fungos do gênero *Epulorhiza* e os três gêneros *Epulorhiza*, *Ceratorhiza* e *Rhizoctonia*.
3. A característica diâmetro de hifa (DH) contribui relativamente pouco com a diversidade avaliada com base nas características morfológicas quantitativas, podendo ser descartada nas análises multivariadas.
4. Há grande concordância entre os agrupamentos obtidos com base nas características morfológicas e os agrupamentos obtidos com base na análise da região ITS do rDNA dos fungos micorrízicos de orquídea estudados.
5. Há grande variabilidade intra-específica entre isolados obtidos de diferentes populações de *E. secundum*, sendo baixa entre isolados obtidos de uma mesma população.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Research**, v.25, p.3389–3402, 1997.
- Andersen, T.F.; Rasmussen, H.N. The mycorrhizal species of *Rhizoctonia*. In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G. (Eds), ***Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control***. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1996. p.379-390.
- Banniza, S.; Sy, A.A.; Bridge, P.D.; Simons, S.A.; Holderness, M. Characterization of populations of *Rhizoctonia solani* in paddy rice fields in Côte d'Ivoire. **Phytopathology**, v.89, n.5, p.414-420, 1999.
- Bonnardeaux, Y.; Brundrett, M.; Batty, A.; Dixon, K.; Koch, J.; Sivasithamparam, K. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. **Mycological Research**, V.111, p.51–61, 2007.
- Bougoure, J.J.; Bougoure, D.S., Cairney, J.W.G.; Dearnaley, J.D.W. ITS-RFLP and sequence analysis of endophytes from *Acianthus*, *Caladenia* and *Pterostylis* (Orchidaceae) in southeastern Queensland. **Mycological Research**, v.109, n.4, p.452–460, 2005.
- Bruns, T.D.; White, T.J.; Taylor, J.W. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.22, p.525-564, 1991.
- Caiafa, A.N.; Silva, A.F. Composição florística e espectro biológico de um campo de altitude no parque estadual da serra do brigadeiro, Minas Gerais – Brasil. **Rodriguésia**, v.56, n.87, p.163-173, 2005.
- Chase, M.W.; Cameron, K.M.; Barrett, R.L.; Freudenstein, J.V. DNA data and Orchidaceae systematic: a new phylogenetic classification. In: Dixon, KW; Kell, SP; Barrett, RL; Cribb, PJ (eds) **Orchid Conservation**. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah. p. 205-226, 2003.
- Cruz, C.D. **Programa Genes: Diversidade genética**. Viçosa, Editora UFV, 2008. 278p.
- Cruz, C.D.; Regazzi, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. Viçosa, Editora UFV, 1997. 394p.
- Currah, R.S.; Sigler, L.; Hambleton, S. New records and new taxa of fungi from mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. **Canadian Journal of Botany**, v.65, p.2473-2482, 1987.
- Currah, R.S.; Zelmer, C.D. A key and notes for the genera of fungi with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. **Reports of the Tottori Mycological Institute**, v.30; p.43-59, 1992.

- Currah, R.S.; Zettler, L.W., McInnis, T.M. *Epulorhiza inquilina* sp. nov. from *Platanthera* (Orchidaceae) and a key to *Epulorhiza* species. **Mycotaxon**, v.61; p.338-342, 1997.
- Dearnaley, J.D.W.; Le Brocque, A.F. Molecular identification of the primary root fungal endophytes of *Dipodium hamiltonianum* (Yellow hyacinth orchid). **Australian Journal of Botany**, v.54, p.487–491, 2006.
- Dearnaley, J.D.W. Further advances in orchid mycorrhizal research. **Mycorrhiza**, v.17, p.475–486, 2007.
- Gardes, M.; Bruns, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rust. **Molecular Ecology**, v.2, 113–118, 1993.
- Hietala, A.M.; Sem, R.; Lilja, A. Anamorphic and teleomorphic characteristics of a uninucleate *Rhizoctonia* sp. isolated from the roots of nursery grown conifer seedlings. **Mycological Research**, v.98, p.1044-1050, 1994.
- Hietala, A.M.; Sen, R. *Rhizoctonia* associated with forest trees. In: Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S.; Dijst, G. (Eds), ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1996. p.351-358.
- Hietala, A.M.; Vahala, J.; Hantula, J. Molecular evidence suggests that *Ceratobasidium bicorne* has an anamorph known as a conifer pathogen. **Mycological Research**, v.105, n.5, p.555-562, 2001.
- Horton, T.R.; Bruns, T.D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. **Molecular Ecology**, v.10, p.1855-1871, 2001.
- Junghans, D.T.; Gomes, E.A.; Barros, E.G.; Guimarães, W.V.; Araújo, E.F. Genetic diversity of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* based on RAPD-PCR analysis. **Mycorrhiza**, v.7, p.243-248, 1998.
- Kristiansen, K.A.; Taylor, D.L.; Kjoller, R.; Rasmussen, H.N.; Rosendahl, S. Identification of mycorrhizal fungi from single pellets of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences. **Molecular Ecology**, v.10, p.2089–2093, 2001.
- Kristiansen, K.A.; Freudenstein, J.V.; Rasmussen, F.N.; Rasmussen, H.N. Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.33, p.251–258, 2004.
- Leoni, L.S.; Tinte, V.C. **Flora do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, estado de Minas Gerais, Brasil v.I – Caracterização da vegetação e lista preliminar das espécies**. Carangola, Gráfica São José. 2004.

- Linhares, D.O. **Caracterização morfológica de micorrizas de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* nativas do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro.** Viçosa, UFV, 36p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2006.
- Lilja, A.; Lilja, S.; Poteri, M.; Ziren, L. Conifer seedling root fungi and root dieback in Finnish nurseries. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v.7, p.547-556, 1992.
- Ma, M.; Tan, T.K.; Wong, S.M. Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids **Mycological Research**, v.107, n.9, p.1041–1049, 2003.
- Miller, D.; Warren, R.; Miller, I.M.; Seehawer, H. **Serra dos órgãos, sua histórias e suas orquídeas.** Nova Friburgo, RJ: Editora Scart, 2006, 567p.
- Nogueira, R.E. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de orquídeas.** Viçosa, UFV, 36p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2004.
- Nogueira, R.E.; Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Lanna, M.C.; Mendonça, M. Fungos micorrízicos associados e orquídeas em campos rupestres na Região do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.3, p.417-424, 2005.
- Ogoshi, A. The genus *Rhizoctonia*. In: Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S.; Dijst, G. (Eds), ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control.** Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1996. p.1-10.
- Oliveira, S.F.; Pereira, M.C.; Guimarães, F.A.R.; Torres, D.P.; Bocayuva, M.; Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M. Fungos micorrízicos associados a *Oncidium pirarense* BCHB. J. que ocorrem no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. In: **FERTBIO, 2008.** Londrina/PR. Resumos... Londrina, SBCS/SBM/Embrapa, 2008. CD-ROM.
- Otero, J.T.; Ackerman, J.D.; Bayman, P. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. **American Journal of Botany**, v.89, p.1852–1858, 2002.
- Otero, J.T., Ackerman, J.D., Bayman, P. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. **Molecular Ecology**, v.13, p.2393-2404, 2004.
- Otero, J.T.; Flanagan, N.; Herre, E.A.; Ackerman, J.D.; Bayman, P. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Lonopsis utricularioides* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v.94, n.12, p.1944–1950, 2007.
- Pereira, M.C. **Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides.** Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2004. 25p. (Monografia)

- Pereira, M.C. **Diversidade e especificidade de fungos micorrízicos associados a *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – MG.** Viçosa, UFV, 59p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2006.
- Pereira, M.C.; Kasuya, M.C.M.; Pereira, O.L.; Costa, M.D. Associações micorrízicas em orquídeas do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – MG. In: **FERTBIO, 2006.** Bonito. Resumos... Bonito, SBCS/SBM/Embrapa, 2006. CD-ROM.
- Pereira, M.C.; Kasuya, M.C.M.; Pereira, O.L.; Costa, M.D.; Rocha, R.B. Diversidade de fungos micorrízicos *Epulorhiza* spp. isolados de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.1187-1197, 2009.
- Pereira, O.L. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécies de orquídeas neotropicais.** Viçosa, UFV, 48p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2001.
- Pereira, O.L.; Rollemberg, C.L.; Borges, A.C.; Matsuoka, K.; Kasuya, M.C.M. *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. **Mycoscience**, v.44, p.153-155, 2003.
- Pereira, O.L., Kasuya, M.C.M., Borges, A.C., Araújo, E.F. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. **Canadian Journal of Botany**, v.83, p.54-65, 2005a.
- Pereira, O.L., Kasuya, M.C.M., Rollemberg, C.L., Borges, G.M. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.191-197, 2005b.
- Rasmussen, H. N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza, **Plant and Soil**, v.244; p.149-163, 2002.
- Schäfer, C.; Wöstemeyer, J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **Journal of Phytopathology**, 136:124-136, 1992.
- Selosse, M.A.; Weiß, M.; Jany, J.L.; Tillier, A. Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. **Molecular Ecology**, v.11, p.1831–1844, 2002.
- Shan, X.C.; Liew, E.C.; Weatherhead, M.A.; Hodkiss, L.J. Characterization and taxonomy placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. **Mycologia**, v.94, n. 2, p.230-239, 2002.

- Sharon, M.; Kuninaga, S.; Hyakumachi, M.; Sneh, B. The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, v. 47, p.299-316, 2006.
- Sharon, M.; Kuninaga, S.; Hyakumachi, M.; Naito, S.; Sneh, B. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, v.49, n.2, p.93-114, 2008.
- Shefferson, R.P.; Weiß, M.; Kull, T.; Taylor, D.L. High specificity generally characterises mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. **Molecular Ecology**, v.14, p.613–626, 2005.
- Shefferson, R.P.; Taylor, D.L.; Weiß, M.; Garnica, S.; et al. The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. **Evolution**, v.61-6, p.1380–1390, 2007.
- Shefferson, R.P.; Kull, T.; Tali, K. Mycorrhizal interactions of orchids colonizing Estonian mine tailings hills. **American Journal of Botany**, v.95, n.2, p.156–164, 2008.
- Singh, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v.41, p.237-245, 1981.
- Suárez, J.P.; Weiß, M.; Abele, A.; Garnica, S.; Oberwinkler, F.; Kottke, I. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. **Mycological Progress**, v.110, p.1257–1270, 2006.
- Suárez, J.P.; Weiss, M.; Abele, A.; Oberwinkler, F.; Kottke, I. Members of Sebacinales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. **Mycological Progress**, 7:75–85, 2008.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.
- Taylor, D.L.; Bruns, T.D. Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.4510–4515, 1997.
- Taylor, D.L.; Bruns, T.D. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. **Molecular Ecology**, v.8, p.1719-1732, 1999.
- Taylor, D.L.; Bruns, T.D.; Leake, D.J.; Read, D.J. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: van der Heijden, M.G.A., Sanders, I. **Mycorrhizal Ecology**. Springer-Verlag, 2002. p.375-414.

- Taylor, D.L.; Bruns, T.D.; Hodges, S.A. Evidence for mycorrhizal races in a cheating orchid. **Proceedings of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v.271, p.35-43, 2004.
- White, T.J.; Bruns, T.D.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T. J. (eds.), San Diego, Academic Press., 1990. p.315–322.
- Zelmer, C.D.; Currah, R.S. Evidence for a fungal liaison between *Corallorhiza trifida* (Orchidaceae) and *Pinus contorta* (Pinaceae). **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.862-866, 1995.
- Zettler, L.W. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. **Selbyana**, v.18, p.188-194, 1997.
- Zettler, L. W., Delaney, T. W., Sunley, J. A. Seed propagation of epiphytic green-fly orchid, *Epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus. **Selbyana**, v.19; p.249-253, 1998.

CAPÍTULO 2

**FUNGOS MICORRÍZICOS *Epulorhiza* spp. E *Opadorhiza* spp.
ASSOCIADOS À *Epidendrum secundum* (ORCHIDACEAE) NO
PARQUE ESTADUAL DA SERRA DO BRIGADEIRO – MG**

RESUMO

Apenas fungos do gênero *Epulorhiza* têm sido isolados de *Epidendrum secundum* naturais de fragmentos de Mata Atlântica localizados no Estado de Minas Gerais. Isolados de duas espécies de *Epulorhiza* foram obtidos de populações de *E. secundum* crescendo em duas regiões de um campo de altitude localizado no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), sendo observada prevalência de uma espécie em cada uma dessas regiões e variabilidade morfológica e molecular inter e intra-específica. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de fungos micorrízicos de onze populações de *E. secundum* distribuídas no PESB. Quarenta e três isolados fúngicos foram obtidos, sendo quarenta e um pertencentes ao gênero *Epulorhiza* e dois ao gênero *Opadorhiza*. A distinção entre *Epulorhiza* e *Opadorhiza*, bem como entre algumas espécies de *Epulorhiza* spp., só foi possível pela análise da seqüência da região ITS do rDNA. A análise das características morfológicas e das seqüências da região ITS do rDNA revelaram uma grande variabilidade entre os fungos *Epulorhiza* spp. Isso, somado a larga distribuição, no PESB, de um fungo *Epulorhiza* sp. que, *in vitro*, apresenta grande eficiência em promover a germinação e o desenvolvimento de mudas de orquídea, pode explicar a abundância de *E. secundum* nos campos de altitude estudados. Conclui-se que *E. secundum* associa-se a uma grande diversidade de fungos do gênero *Epulorhiza* e também com fungos do gênero de *Opadorhiza*. Este é o primeiro relato da associação micorrízica entre *E. secundum* e *Opadorhiza* sp.

ABSTRACT

Only *Epulorhiza* fungi have been isolated from *Epidendrum secundum* growing in Atlantic Forest fragments located in Minas Gerais State. Isolates from two *Epulorhiza* species were obtained from populations of *E. secundum* growing in two regions of “campo de altitude” located in Serra do Brigadeiro State Park (SBSP), showing the prevalence of one species in each region, and inter and intra-specific morphological and molecular variability. Thus, the aim of this study was to evaluate mycorrhizal fungi diversity among eleven populations of *E. secundum* distributed in SBSP. Forty three fungal isolates were obtained, been forty one *Epulorhiza* and two *Opadorhiza*. The distinction between *Epulorhiza* and *Opadorhiza*, as well as among some species of *Epulorhiza*, was possible just by analysis of ITS rDNA sequence. The analyses of morphological characteristics and of ITS rDNA sequence show a great variability among *Epulorhiza* fungi. This, added to the large distribution, in SBSP, of a *Epulorhiza* fungi efficient to promote *in vitro* germination and seedling development in orchids, can explain the abundance of *E. secundum* in the “campos de altitude” studied. It is concluded that *E. secundum* associate with a large diversity of *Epulorhiza* fungi and also with *Opadorhiza* fungi. This is the first report of mycorrhizal association between *E. secundum* and *Opadorhiza* sp.

I. INTRODUÇÃO

O gênero *Epidendrum* é um dos gêneros da família Orchidaceae com maior número de espécies, reunindo mais de 1.100 espécies (Chase et al., 2003). Pertence à subtribo Laeliinae, da tribo Epidendreae, que está dentro da maior subfamília da família Orchidaceae, Epidendroideae (Chase et al., 2003). Os remanescentes de Mata Atlântica do Brasil, que correspondem a menos de 8 % da área original desse bioma, possuem vários representantes desse gênero (Leoni e Tinte, 2004; Caiafa e Silva, 2005; Miller et al., 2006). No Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), localizado em Minas Gerais, já foram catalogadas oito espécies *Epidendrum* (Leoni e Tinte, 2004; Caiafa e Silva, 2005). Dentre essas espécies, observa-se *Epidendrum secundum* Jacq., espécie clorofilada de hábito terrestre, epífita e, ou rupícola, comum em campos graminóides e em afloramentos rochosos de diferentes regiões de campo de altitude do PESB (Caiafa e Silva, 2005). *E. secundum* apresenta floração durante todo o ano, o que, além de facilitar sua identificação no campo, a torna uma espécie de grande aplicação na horticultura comercial e um modelo de estudo da associação micorrízica.

A associação micorrízica é essencial ao ciclo de vida das orquídeas, pois auxilia na germinação das sementes, no desenvolvimento do embrião à plântula e na manutenção da planta adulta (Arditti, 1992; Smith e Read, 1997; Peterson et al., 1998, 2004; Dearlaney, 2007). Por apresentarem sementes pequenas e desprovidas de reservas, o embrião necessita do simbiote para obter os carboidratos e os minerais necessários ao seu desenvolvimento por meio da degradação do *peloton*, enovelados de hifas fúngicas formados entre a membrana plasmática e a parede celular de células da região basal do embrião (Ramussen, 1995; Peterson et al., 2004). Nas orquídeas aclorofiladas, a dependência pelo fungo micorrízico é mantida durante todo o ciclo de vida da planta (Leake, 1994; 2005). As orquídeas clorofiladas, ao alcançarem o estágio autotrófico, dependem dos fungos micorrízicos, principalmente, para obter os minerais necessários ao metabolismo, os quais são captados por esses simbiossiontes do solo e transferidos para a planta (Djik et al., 1997;

Smith e Read, 1997). Porém, uma transferência bidirecional de carbono tem sido observada entre a planta clorofilada e o simbiote fúngico, o qual recebe mais de cinco vezes a quantidade de carbono que transferiu para a planta (Cameron et al., 2006 e 2008).

Os fungos rizotonióides são os principais simbiotes de orquídeas clorofiladas (Currah e Zelmer, 1992; Rasmussen, 2002; Taylor et al., 2002). Dentre os cinco gêneros de fungos rizotonióides capazes de estabelecerem associação com as orquídeas, representantes dos gêneros *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* e *Rhizoctonia*, têm sido isolados de orquídeas brasileiras (Pereira, 2001; Pereira et al., 2003; Nogueira, 2004; Nogueira et al., 2005; Pereira et al., 2005a,b; Linhares, 2006; Pereira et al., 2009).

Fungos do gênero *Epulorhiza* são, freqüentemente, isolados do sistema radicular de orquídeas do gênero *Epidendrum* (Nogueira, 2004; Nogueira et al., 2005; Linhares, 2006; Pereira et al., 2009) e apresentam grande eficiência em promover a germinação das sementes dessas plantas (Zettler et al., 1998,; Pereira et al., 2005b; Pereira, 2006). Zettler et al. (1998) observaram que sementes de *Epidendrum conopseum* R. Br. germinavam apenas na presença de um fungo do gênero *Epulorhiza* isolado do seu sistema radicular, o que não ocorreu ao utilizar outros três fungos: *Ceratorhiza goodyera-repentis* (Costantin e Dufour), *Moniliopsis anomala* Burgeff ex Currah e *Epulorhiza* sp., isolado de *Platanthera ciliaris* (L.) Lindl. Os fungos micorrízicos isolados de *Epidendrum rigidum* Jacq. e *Epidendrum dendrobioides* Thunb. também foram identificados como *Epulorhiza* spp. (Nogueira et al., 2005; Pereira et al., 2005b). Apenas fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza* têm sido isolados do sistema radicular de *E. secundum*, sendo observada a preferência das sementes dessa planta por fungos desse gênero em experimentos de germinação simbiótica (Linhares, 2006; Pereira, 2006; Pereira et al., 2009).

A diversidade dos simbiotes *Epulorhiza* spp. obtidos de quatro populações de *E. secundum* foi avaliada com base nas características morfológicas (Pereira et al., 2009). Baixa variabilidade morfológica foi observada entre os isolados obtidos de uma mesma população

hospedeira ou de populações próximas (Pereira et al., 2009). Entretanto, isolados de populações distantes apresentaram grande diversidade morfológica (Pereira et al., 2009). Agrupamentos semelhantes foram observados ao se caracterizar morfológica e molecularmente isolados obtidos de três dessas quatro populações (Capítulo 1). Entretanto, os isolados avaliados foram obtidos de apenas uma das serras contidas no PESB, sendo importante obter amostras de mais populações de *E. secundum* para compreender a ecologia da associação entre essa orquídea e seus simbiontes fúngicos.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade de fungos micorrízicos de onze populações de *E. secundum* distribuídas no PESB. A caracterização, a identificação e a avaliação da diversidade dos isolados foi realizada com base nas características morfológicas e na sequência da região ITS do rDNA. Características de dois isolados micorrízicos de *Ceratorhiza* sp. uninucleada e dois isolados fitopatogênicos, *Ceratorhiza* sp. AGC e *Rhizoctonia solani* AG1IA, foram também adicionadas na análise como padrão para comparação.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Isolados fúngicos

Para a análise da diversidade dos fungos micorrízicos associados a *E. secundum* do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), Minas Gerais, foram avaliados isolados da Coleção de Fungos Micorrízicos de Orquídea (CFMO) do Laboratório de Associações Micorrízicas (DMB/Bioagro/UFV) e de fungos obtidos durante a realização de novos isolamentos. Dezesesseis isolados *Epulorhiza* spp. foram selecionados dessa coleção, representando as populações ES1, ES2 e ES3 (Tabela 1). Para comparação, foram selecionados mais cinco fungos rizoctonióides. Desses fungos, três também pertencem à CFMO: um isolado de *Epulorhiza* sp., micorrízico de *Epitedrum* sp., e dois isolados de *Ceratorhiza* sp. uninucleada, micorrízicos de *Oncidium barbaceniae* Lindl. (Tabela 1). Os outros dois fungos pertencem à Coleção de Fungos Fitopatogênicos do Laboratório de Fitopatologia da UFV: um isolado de *Rhizoctonia solani* Kuhn AG11A e um isolado de *Ceratorhiza* sp. AGC.

Para isolamento de fungos associados a outras populações de *E. secundum* no PESB foram coletados segmentos de raiz de oito populações dessa orquídea crescendo em diferentes regiões de campo de altitude (Tabela 1), com a licença IEF UC/COL 032/05 Prorrogação II. A coleta foi feita utilizando uma tesoura de poda, mas de forma a não provocar a morte das plantas amostradas. No caso de plantas com parte aérea e raízes pequenas, todo o indivíduo foi coletado. As raízes ou indivíduos coletados foram embalados em sacos plásticos, devidamente identificados, separando por população e local, armazenados em bolsa térmica, contendo barra de gelo químico, e transportados para o Laboratório de Associações Micorrízicas (BIOAGRO/UFV, Viçosa/MG), onde foram mantidos em geladeira a 4 °C até realização do isolamento dos fungos micorrízicos.

Em laboratório, foi realizado o isolamento dos fungos micorrízicos, conforme descrito por Pereira et al. (2009), transferindo-se as porções do

Tabela 1: Espécie de orquídeas hospedeiras dos isolados de fungos micorrízicos estudados, designação da população, hábito e habitat das plantas das populações amostradas, localidade, cidade/UF, altitude e coordenadas das localidades dessas populações

Espécie	População	Hábito	Habitat	Localidade	Cidade/UF	Altitude	Coordenada	
<i>Epidendrum secundum</i> Jacq.	ES1	Terrestre	Campo de Altitude/Campo Graminóide	PESB/Serra das Cabeças/Totem Deitado	Araponga/MG	1706 m	S20°42'11,1"	WO42°28'32"
	ES2	Terrestre	Campo de Altitude/Campo Graminóide	PESB/Serra das Cabeças/Totem Deitado	Araponga/MG	1705 m	S20°42'10,8"	WO42°28'31,8"
	ES3	Terrestre	Campo de Altitude/Campo Graminóide próximo escrube	PESB/Serra das Cabeças/Totem Deitado	Araponga/MG	1692 m	S20°42'6,5"	WO42°28'30,1"
	ES4	Terrestre	Campo de Altitude/Campo Graminóide	PESB/Serra das Cabeças/Mamute	Araponga/MG	1717 m	S20°41'27,4"	WO42°28'17"
	ES5	Rupícola	Campo de Altitude/Afloramento Rochoso	PESB/Serra das Cabeças/Mamute	Araponga/MG	1717 m	S20°41'27,4"	WO42°28'17"
	ES6	Rupícola	Campo de Altitude/Afloramento Rochoso	PESB/Serra das Cabeças/Mamute	Araponga/MG	1717 m	S20°41'27,4"	WO42°28'17"
	ES7	Terrestre	Campo de Altitude/Campo Graminóide	PESB/Serra das Cabeças/Mamute	Araponga/MG	1706 m	S20°41'27,3"	W42°28'17,4"
	ES8	Terrestre	Campo de Altitude/Campo Graminóide	PESB/Serra das Cabeças/Totem Deitado	Araponga/MG	1712 m	S20°42'11,3"	WO42°28'32"
	ES9	Terrestre	Campo de Altitude/Campo Graminóide próximo escrube	PESB/Serra das Cabeças/Totem Deitado	Araponga/MG	1693 m	S20°42'6,8"	WO42°28'30"
	ES10	Rupícola	Campo de Altitude/Campo Graminóide	PESB/Pedra do Pato	Araponga/MG	1800 m	S20°44'42"	WO42°28'24"
	ES11	Terrestre	Campo de Altitude/Campo Graminóide	PESB/Pedra do Pato	Araponga/MG	1908 m	S20°44'44"	WO42°27'56"
<i>Epidendrum</i> sp.	ESP1	Epífita	Floresta Estacional Semidecidual	PESB/Trilha do Moinho	Araponga/MG	1315 m	S20°43'14,5"	WO42°29'00,7"
<i>Oncidium barbaciae</i> Lindl.	OB1	Rupícola	Campo de Altitude/Afloramento Rochoso	PESB/Serra das Cabeças/Totem Deitado	Araponga/MG	1700 m	S20°42'8,38"	WO42°28'30,53"

córtex contendo pelotons, obtidas de raízes colonizadas, para placas de Petri contendo 25 mL dos meios BDA (Batata Dextrose Ágar – 1 L de caldo proveniente do cozimento de 300 g de batata e pH 5,6; 15 g de glicose e 15 g de ágar) e para placas contendo 25 mL de meio FMA (Farelo de Milho Ágar – 1 L de caldo proveniente do cozimento de 30 g de farelo de milho e pH 5,6; 15 g de ágar). As placas, seladas com filme PVC, foram 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 foi transferido para novas placas de Petri contendo meio BDA e repicagens sucessivas foram realizadas para obtenção de cultura pura. Quando observada a contaminação da cultura com bactéria, foi realizada transferência sucessiva em meio BDA acrescido de Estreptomicina (50 mg L⁻¹), Ampicilina (10 mg L⁻¹) e Cloranfenicol (100 mg L⁻¹).

2. Caracterização morfológica dos fungos micorrízicos rizoctonióides

Os fungos rizoctonióides isolados, ou seja, fungos que apresentaram constrição da hifa na região do septo, ramificação da hifa logo após o septo e em ângulo reto e cadeias de células intumescidas, as células monilióides (Currah e Zelmer, 1992; García et al., 2006), foram avaliados quanto às características morfológicas qualitativas (cor, aspecto, micélio aéreo, margem, número de núcleos por hifa vegetativa e crescimento micelial ralo e translúcido na borda) e quantitativas (diâmetro da colônia, taxas de crescimento em meio BDA [Potato Dextrose Agar, ACUMEDIA] e CMA [Corn Meal Agar, ACUMEDIA], diâmetro de hifa, dimensões de célula molinióide), segundo descrito por Pereira et al. (2009).

Os dados provenientes da caracterização morfológica dos fungos obtidos dos novos isolamentos foram analisados juntamente com os

dados obtidos dos fungos estudados no Capítulo 1. Os dados referentes às características quantitativas foram submetidos à análise de variância, considerando o delineamento inteiramente ao acaso, e à comparação de médias pelo teste Scott Knott, a 5 % de significância, utilizando o programa GENES (versão 2007.0.0). Para isso, foram analisados quatro dados de diâmetro da colônia, medido 48 h após a inoculação, e quatro taxas de crescimento determinados em meio BDA e CMA. As medidas de largura de célula monilióide (LCM), comprimento de célula monilióide (CCM) e diâmetro de hifa (DH) foram organizadas em ordem crescente para seleção de quatro valores. Selecionou-se o maior valor, o menor valor, e, aleatoriamente, dois valores intermediários, buscando assim cobrir toda a amplitude da variação. Deste modo, foram analisados quatro dados de cada característica avaliada.

As características morfológicas quantitativas e qualitativas foram analisadas por técnicas biométricas, para gerar valores de distância e o agrupamento dos isolados, utilizando-se o programa GENES (Cruz e Regazzi, 1997; Cruz, 2008; Pereira et al., 2009). As características qualitativas foram analisadas como multicategóricas para cálculo da matriz de dissimilaridade, isto é, 1 – complemento, e posterior agrupamento dos isolados pelo método UPGMA (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Averages) (Cruz, 2008). As características quantitativas foram analisadas pela técnica de Variáveis Canônicas para realizar a dispersão gráfica dos isolados com base nas duas primeiras variáveis canônicas. A distância generalizada de Mahalanobis D^2 foi também calculada e gerou uma matriz de distâncias que foi utilizada para o agrupamento dos isolados pelo método de UPGMA.

3. Caracterização molecular dos fungos micorrízicos rizoctonióides

a) Obtenção do micélio e extração do DNA total dos fungos rizoctonióides isolados

O micélio dos fungos isolados foi obtido para extração de DNA a partir da inoculação de discos de 9 mm de diâmetro de cada isolado,

contendo micélio em crescimento ativo, em frascos Erlenmeyers de 50 mL que continham 10 mL de meio BDL (Potato Dextrose Broth, ACUMEDIA). O micélio obtido foi transferido para tubo Eppendorff de 1,5 mL, congelado a -86 °C e liofilizado. O micélio liofilizado foi, então, utilizado para extração de DNA total, segundo descrito por Schäfer e Wöstemeyer (1992). O DNA foi quantificado por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (Promega), contendo 0,5 µg mL⁻¹ de brometo de etídeo, e diluído em H₂O milli Q para 10 ng µL⁻¹. As amostras de DNA foram mantidas a -20 °C.

b) Amplificação e seqüenciamento da região ITS do rDNA dos fungos rizoctonióides

Para a amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do rDNA nuclear dos fungos micorrízicos rizoctonióides foi realizada reação de PCR utilizando o par de oligonucleotídeos ITS1-ITS4 (White et al., 1990) e as condições de reação descritas por Gardes e Bruns (1993).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se Exo-Sap (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante. Esses produtos foram enviados para Macrogen Inc. (Geumchun-gu, Korea do Sul) para seqüenciamento de ambas as fitas em ciclo conduzido utilizando-se BigDye TM e Automatic Sequencer 3730xl (Applied Biosystems).

c) Análise das seqüências da região ITS do rDNA dos fungos rizoctonióides

As seqüências da região ITS dos isolados amplificadas foram analisadas no programa Sequencher versão 4.5 (Gene Codes) para edição e construção dos *contigs*. Posteriormente, foram alinhadas e analisadas utilizando o programa Mega versão 4 (Tamura et al., 2007). Dendrogramas foram construídos pelo método Neighbor-Joining através da utilização do modelo de análise de nucleotídeo Kimura 2-Parameter, bootstrap com 5.000 repetições e excluindo-se gaps e dados perdidos (Sharon et al., 2008). Seqüências muito divergentes foram re-alinhadas

separadamente, para determinação de haplotipos, utilizando o programa DNA Sequence Polymorphism v4.90.1 (Rozas et al., 2003). Seqüências de um representante de cada haplotipo foram selecionadas aleatoriamente e analisadas utilizando o algoritmo BLASTn (Altschul et al., 1997) para selecionar, no banco de dados do NCBI (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), as seqüências de nucleotídeos com maior identidade a cada haplotipo. As seqüências representantes dos haplotipos e as seqüências obtidas no banco de dados foram separadas de acordo com o gênero, re-alinhadas e analisadas através dos mesmos critérios apresentados acima. Em seguida, os alinhamentos de cada um dos gêneros foram analisados para determinar o melhor modelo de evolução, utilizando-se MrModeltest para posterior análise pela estatística Bayesiana, o método MCMC (Markov chain Monte Carlo) e em 1.000.000 de gerações, realizada no programa MrBayes v3.1.

III. RESULTADOS

Pelotons intactos e degradados foram observados no córtex das amostras de sistema radicular coletados das oito populações de *E. secundum* do PESB (Tabela 1). A partir do processamento das raízes colonizadas, foram obtidos quarenta e três isolados de fungos rizoctonióides, os quais foram caracterizados morfológicamente.

Ao comparar os dados das características morfológicas qualitativas dos fungos rizoctonióides obtidos neste isolamento e dos fungos rizoctonióides selecionados da coleção, foi observado que todos os isolados de *Epidendrum* spp. apresentavam margem submersa e dois núcleos por compartimento de hifa (binucleados), havendo variações em relação ao aspecto, à coloração, ao micélio aéreo e à borda (Tabela 2). Os isolados *Ceratorhiza* sp. uninucleada obtidos de *O. barbaceniae*, o fungo *Ceratorhiza* sp. AGC e o fungo *R. solani* AG1IA assemelharam-se em relação ao aspecto, à borda e à margem, mas diferiram quanto à coloração, ao micélio aéreo e à condição nuclear (Tabela 2). Com base nessas características, foi realizado agrupamento que dividiu os isolados em dois grandes grupos, o primeiro reunindo os isolados obtidos de *Epidendrum* spp. e o segundo os isolados de *R. solani* AG1IA e *Ceratorhiza* spp. (Figura 1). Nenhuma variação foi observada entre os isolados contidos nas populações ES1, ES3 e ES11. Os isolados das demais populações de *E. secundum* apresentaram dissimilaridade de pelo menos 20 % entre isolados de uma mesma população e chegaram a apresentar 40 % de dissimilaridade entre isolados de diferentes populações (Figura 1).

Em relação às características quantitativas, observou-se que os isolados de *Ceratorhiza* spp. e *R. solani* AG1IA apresentaram as maiores médias nas características quantitativas avaliadas, enquanto os isolados de *Epidendrum* spp. apresentaram as menores médias (Tabela 2). No agrupamento baseado nas características morfológicas quantitativas, foi observada a formação de dois grandes grupos, o primeiro contendo os fungos isolados de *Epidendrum* spp. e o segundo contendo os isolados

Tabela 2: Características qualitativas e quantitativas dos fungos rizotonióides micorrízicos das populações de *E. secundum* do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro

Isolado	Características Qualitativas						Características Quantitativas					
	Aspecto	Coloração	M aéreo	Borda	Margem	C Nuclear	DBDA	DCMA	TBDA	TCMA	LCM	CCM
AG1	Cotonoso	Amarela	Abundante4	Ausente	Aérea	Multi	6,20 a	6,68 a	0,0651 a	0,0708 a	19,63 a	30,25 a
AGC	Cotonoso	Amarela	Abundante1	Ausente	Aérea	Bi	4,38 c	4,33 b	0,0458 b	0,0443 c	8,77 b	30,87 a
OB1.2G	Cotonoso	Creme	Abundante3	Ausente	Aérea	Uni	4,65 b	4,45 b	0,0458 b	0,0422 c	11,82 a	27,83 a
OB1.3H	Cotonoso	Creme	Abundante3	Ausente	Aérea	Uni	4,70 b	4,45 b	0,0464 b	0,0464 b	11,74 a	24,65 a
ESP1.4D	Liso	Creme	Escasso	Ausente	Submersa	Bi	1,48 g	1,88 f	0,0076 g	0,0217 j	8,82 b	11,19 c
ES1.2A	Liso	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,90 f	2,98 c	0,0104 f	0,0293 f	13,65 a	16,07 b
ES1.2B	Liso	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,15 e	2,70 d	0,0160 e	0,0280 g	14,17 a	16,80 b
ES1.2D	Liso	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,15 e	3,03 c	0,0163 e	0,0293 f	15,31 a	17,74 b
ES1.3A	Liso	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,30 e	2,85 c	0,0151 e	0,0262 h	12,12 a	16,46 b
ES1.3E	Liso	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,18 e	2,90 c	0,0115 f	0,0302 f	13,31 a	15,88 b
ES1.3F	Liso	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,95 f	2,95 c	0,0123 f	0,0300 f	14,80 a	16,30 b
ES2.2B	Liso	Creme	Escasso	Presente	Submersa	Bi	1,38 g	1,63 g	0,0052 h	0,0087 l	9,71 b	12,44 c
ES2.2C	Liso	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,83 f	2,33 e	0,0094 f	0,0241 i	13,69 a	15,67 b
ES2.2D	Liso	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,13 e	2,73 c	0,0191 d	0,0306 f	15,52 a	16,69 b
ES2.2F	Liso	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,15 e	2,43 e	0,0156 e	0,0259 h	12,96 a	18,05 b
ES2.3B	Liso	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,03 e	2,95 c	0,0167 e	0,0297 f	14,44 a	14,99 b
ES2.3C	Liso	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,05 e	2,98 c	0,0174 e	0,0287 f	14,18 a	15,41 b
ES3.1A	Liso	Creme	Escasso	Presente	Submersa	Bi	1,50 g	1,95 f	0,0108 f	0,0137 k	7,65 b	18,48 b
ES3.1D	Liso	Creme	Escasso	Presente	Submersa	Bi	1,48 g	1,55 g	0,0075 g	0,0089 l	7,35 b	12,48 c
ES3.1G	Liso	Creme	Escasso	Presente	Submersa	Bi	1,33 g	1,45 g	0,0073 g	0,0097 l	8,67 b	13,34 b
ES3.3F	Liso	Creme	Escasso	Presente	Submersa	Bi	1,68 f	1,98 f	0,0102 f	0,0137 k	9,87 b	12,69 c
ES4.1I	Aveludado	Creme	Abundante2	Presente	Submersa	Bi	2,05 e	2,88 c	0,0139 e	0,0318 d	14,14 a	14,61 b
ES4.1M	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,80 f	2,33 e	0,0127 f	0,0243 i	14,14 a	16,21 b
ES4.1T	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,85 f	2,98 c	0,0122 f	0,0300 f	15,47 a	16,12 b
ES4.1U	Liso	Creme	Escasso	Presente	Submersa	Bi	2,08 e	3,08 c	0,0156 e	0,0269 h	13,26 a	14,01 b
ES5.1A	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,38 g	2,55 d	0,0108 f	0,0262 h	11,50 a	11,11 c
ES5.2A	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,68 f	2,28 e	0,0134 f	0,0243 i	11,09 a	10,73 c
ES5.2B	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,83 f	2,55 d	0,0123 f	0,0243 i	11,97 a	11,64 c
ES5.2C	Aveludado	Creme	Abundante3	Presente	Submersa	Bi	1,93 f	2,78 c	0,0149 e	0,0316 d	12,40 a	17,74 b
ES5.2E	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,83 f	2,53 d	0,0118 f	0,0255 i	12,01 a	11,36 c
ES5.2F	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,80 f	2,70 d	0,0097 f	0,0302 f	13,29 a	17,66 b
ES5.3D	Liso	Creme	Escasso	Presente	Submersa	Bi	1,68 f	2,30 e	0,0127 f	0,0264 h	10,98 a	11,61 c
ES5.4A	Aveludado	Creme	Médio	Ausente	Submersa	Bi	1,70 f	2,33 e	0,0116 f	0,0229 i	12,69 a	12,05 c

Tabela 2: Continuação

Isolado	Características Qualitativas						Características Quantitativas						
	Aspecto	Coloração	M aéreo	Borda	Margem	C Nuclear	DBDA	DCMA	TBDA	TCMA	LCM	CCM	
ES6.1C	Aveludado	Creme	Médio	Ausente	Submersa	Bi	1,78 f	3,08 c	0,0175 e	0,0337 d	13,96 a	17,40 b	
ES6.1D	Aveludado	Creme	Médio	Ausente	Submersa	Bi	1,90 f	2,80 c	0,0146 e	0,0325 d	14,52 a	16,09 b	
ES6.1E	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,15 e	2,65 d	0,0148 e	0,0290 f	14,32 a	15,38 b	
ES6.1F	Aveludado	Creme	Médio	Ausente	Submersa	Bi	1,75 f	2,98 c	0,0148 e	0,0328 d	13,49 a	15,61 b	
ES6.3L	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,63 f	2,40 e	0,0104 f	0,0290 f	12,98 a	16,61 b	
ES6.3N	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,70 f	2,33 e	0,0109 f	0,0248 i	10,83 a	11,77 c	
ES6.3O	Liso	Creme	Escasso	Presente	Submersa	Bi	1,80 f	2,38 e	0,0116 f	0,0247 i	11,37 a	12,72 c	
ES7.1L	Aveludado	Creme	Abundante3	Ausente	Submersa	Bi	2,00 e	2,90 c	0,0162 e	0,0293 f	12,94 a	15,36 b	
ES7.1M	Aveludado	Creme	Abundante3	Ausente	Submersa	Bi	2,00 e	2,70 d	0,0198 d	0,0297 f	13,70 a	16,60 b	
ES7.1N	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	2,15 e	2,78 c	0,0188 d	0,0320 d	13,50 a	16,72 b	
ES7.2B	Aveludado	Creme	Abundante3	Presente	Submersa	Bi	2,33 e	3,15 c	0,0210 c	0,0320 d	13,93 a	15,87 b	
ES7.2D	Aveludado	Creme	Abundante1	Presente	Submersa	Bi	2,20 e	2,58 d	0,0148 e	0,0309 e	13,41 a	16,41 b	
ES7.2E	Aveludado	Creme	Abundante3	Presente	Submersa	Bi	1,88 f	2,40 e	0,0193 d	0,0340 d	14,83 a	16,07 b	
ES7.2F	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,88 f	2,43 e	0,0155 e	0,0285 g	12,71 a	16,10 b	
ES7.2G	Aveludado	Creme	Abundante1	Presente	Submersa	Bi	1,93 f	2,43 e	0,0189 d	0,0297 f	13,79 a	17,36 b	
ES7.3A	Aveludado	Creme	Abundante2	Presente	Submersa	Bi	2,18 e	2,63 d	0,0186 d	0,0326 d	14,23 a	17,13 b	
ES7.3E	Aveludado	Creme	Abundante2	Presente	Submersa	Bi	2,05 e	2,45 e	0,0189 d	0,0320 d	13,73 a	15,19 b	
ES7.3I	Aveludado	Creme	Abundante2	Presente	Submersa	Bi	2,20 e	2,65 d	0,0174 e	0,0283 g	14,92 a	16,67 b	
ES7.3F	Aveludado	Creme	Abundante3	Presente	Submersa	Bi	2,33 e	3,03 c	0,0212 c	0,0346 d	13,37 a	15,99 b	
ES7.3Y	Aveludado	Creme	Abundante3	Presente	Submersa	Bi	2,33 e	3,13 c	0,0217 c	0,0342 d	12,36 a	14,95 b	
ES8.1B	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,93 f	2,50 e	0,0149 e	0,0299 f	10,10 b	16,86 b	
ES9.1B	Liso	Creme	Escasso	Presente	Submersa	Bi	1,85 f	1,48 g	0,0038 h	0,0073 l	4,58 c	6,31 d	
ES9.2G	Liso	Creme	Liso	Presente	Submersa	Bi	1,23 g	1,55 g	0,0047 h	0,0087 l	4,32 c	5,80 d	
ES10.1C	Aveludado	Creme	Médio	Presente	Submersa	Bi	1,88 f	2,85 c	0,0162 e	0,0340 d	13,39 a	14,59 b	
ES10.1D	Aveludado	Castanho	Médio	Ausente	Submersa	Bi	2,78 d	2,95 c	0,0241 c	0,0264 h	9,51 b	17,91 b	
ES10.2A	Liso	Creme	Liso	Presente	Submersa	Bi	1,40 g	1,30 g	0,0028 h	0,0078 l	5,09 c	6,00 d	
ES10.2B	Aveludado	Creme	Abundante3	Presente	Submersa	Bi	2,78 d	2,95 c	0,0241 c	0,0264 h	4,03 c	4,93 d	
ES11.1A	Aveludado	Creme	Médio	Ausente	Submersa	Bi	1,83 f	2,68 d	0,0168 e	0,0330 d	12,30 a	14,89 b	
ES11.1F	Aveludado	Creme	Médio	Ausente	Submersa	Bi	2,00 e	2,70 d	0,0174 e	0,0347 d	12,71 a	14,74 b	
ES11.1G	Aveludado	Creme	Médio	Ausente	Submersa	Bi	2,00 e	2,93 c	0,0170 e	0,0333 d	12,04 a	14,80 b	
ES11.2A	Aveludado	Creme	Médio	Ausente	Submersa	Bi	1,93 f	2,63 d	0,0141 e	0,0333 d	13,01 a	15,25 b	

*M aéreo, micélio aéreo; C nuclear, condição nuclear; DBDA, diâmetro da colônia em meio BDA; DCMA, diâmetro da colônia em meio CMA; TBDA, taxa de crescimento em meio BDA; TCMA, taxa de crescimento em meio CMA; LCM, largura de célula monilióide; CCM, comprimento de célula monilióide; DH, diâmetro de hifa; CV %, coeficiente de variação em porcentagem; abundante1 - abundante no centro; abundante2 - abundante na margem; abundante3 - abundante e uniforme; abundante4 - abundante formando anéis concêntricos alternando floculação mais adensada no centro seguida de pouco adensada e outra mais adensada. Os códigos apresentados na tabela correspondem aos isolados estudados: AG1, *R. solani* AG11A; AGC, *Ceratorhiza* sp. AGC; os códigos dos demais isolados estudados são iniciados com o código da população da orquídea hospedeira, conforme apresentado na Tabela 1.

**As médias, nas colunas, seguidas de uma mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste de Scott Knott, a 5 % de significância.

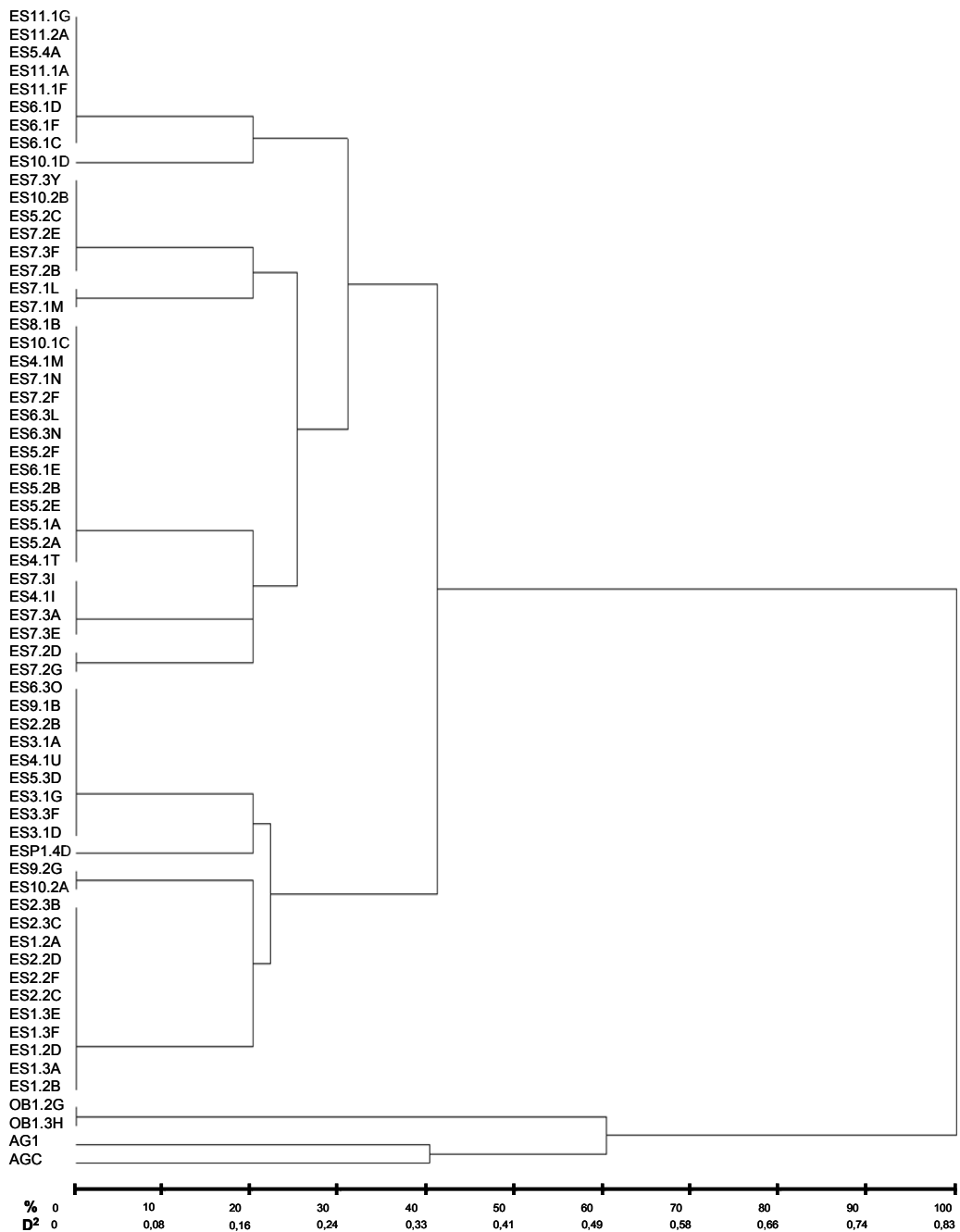


Figura 1: Agrupamento dos isolados de fungos rizoctonióides estudados gerado a partir da análise das características qualitativas utilizando a dissimilaridade calculada pela técnica multicategórica e o método UPGMA. Os códigos apresentados no agrupamento correspondem aos isolados estudados: AG1, *R. solani* AG1IA; AGC, *Ceratorhiza* sp. AGC. Os códigos dos demais isolados são iniciados com o código da população da orquídea hospedeira conforme apresentado na Tabela 1. D, dissimilaridade; %, porcentagem em relação à dissimilaridade máxima.

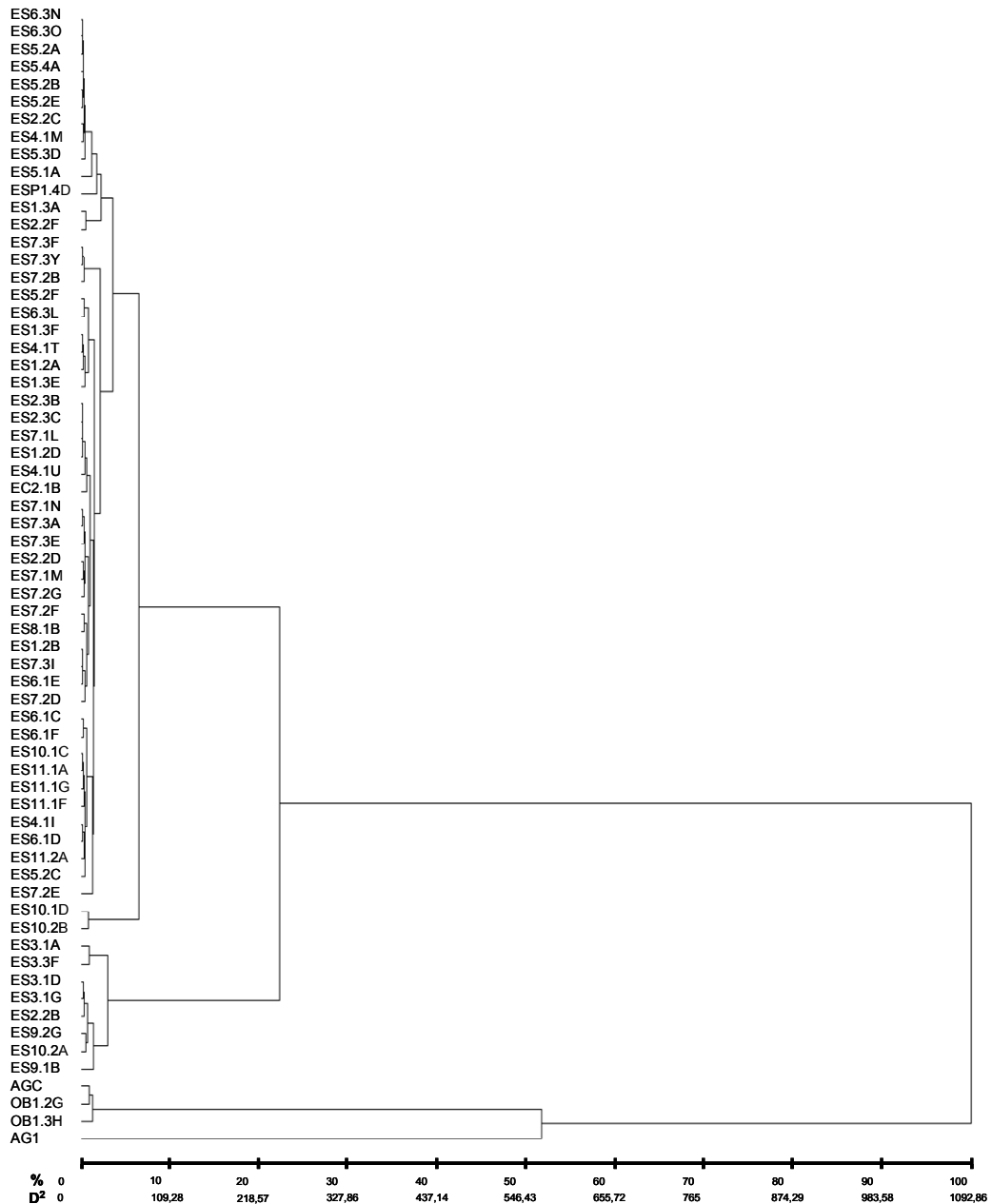


Figura 2: Agrupamento dos isolados de fungos rizoctonióides estudados gerado pela análise das características morfológicas quantitativas utilizando a distância de Mahalanobis e o método UPGMA. Os códigos apresentados no agrupamento correspondem aos isolados estudados: AG1, *R. solani* AG1IA; AGC, *Ceratorhiza* sp. AGC. Os códigos dos demais isolados são iniciados com o código da população da orquídea hospedeira, conforme apresentado na Tabela 1. D², distância de Mahalanobis; %, porcentagem em relação à dissimilaridade máxima.

R. solani e *Ceratorhiza* spp. (Figura 2). Entre os isolados simbiotes de *Epidendrum* spp., houve uma separação de, aproximadamente, 20 % de dissimilaridade, formando dois outros grupos (Figura 2). O menor grupo abrange isolados contendo as menores médias dos diâmetros de colônia, das taxas de crescimento e das dimensões de célula monilióide. Os isolados de fungos micorrízicos de *Epidendrum* spp., agrupados no maior grupo, são os que possuem as maiores médias dessas características, que em alguns casos foram maiores do que as médias observadas nos isolados de *R. solani* e *Ceratorhiza* spp. (Figura 2 e Tabela 2).

A análise da seqüência da região ITS do rDNA de isolados representantes dos grupos obtidos pela análise das características morfológicas revelou a formação de sete grupos (Figura 3). Os isolados de *Epidendrum* spp. foram distribuídos em quatro desses grupos (G1 a G4) e três deles (G1 a G3) foram ligados a um mesmo nó, enquanto o grupo G4, que continha apenas os isolados da população ES9, foi ligado aos demais grupos que possuíam os isolados de *Ceratorhiza* sp. uninucleada, de *R. solani* AG11A e *Ceratorhiza* sp. AGC (Figura 3).

Onze haplotipos foram observados na análise do alinhamento das seqüências dos isolados do grupo superior, utilizando-se o programa DnaSP (Tabela 3). Após analisar, por BLASTn, as seqüências representativas de cada haplotipo, observou-se que as seqüências dos isolados de *Epidendrum* spp. pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 (Figura 3) apresentaram grande identidade em relação às seqüências de fungos tulasnelóides. Na análise das seqüências de representantes dos haplotipos e das seqüências de maior identidade de fungos tulasnelóides, utilizando estatística Bayesiana e o melhor modelo de evolução, observou-se a separação dos isolados *Epulorhiza* spp. obtidos de *E. secundum* em quatro grupos, pois o isolado ESP1.4D, obtido de *Epidendrum* sp., foi distinguido dos isolados do grupo G1 (Figura 4).

As seqüências ITS dos isolados da população ES9, reunidas no grupo G4, apresentaram grande identidade com as seqüências de fungos do gênero *Opadorhiza*, quando submetidas à análise em BLASTn, e foram agrupadas, após análise empregando a estatística Bayesiana, a

fungos não cultiváveis *Sebacina* sp., teleomorfo de gênero *Opadorhiza*, formando um clado próximo às seqüências de *Sebacina vermifera* (Figura 5).

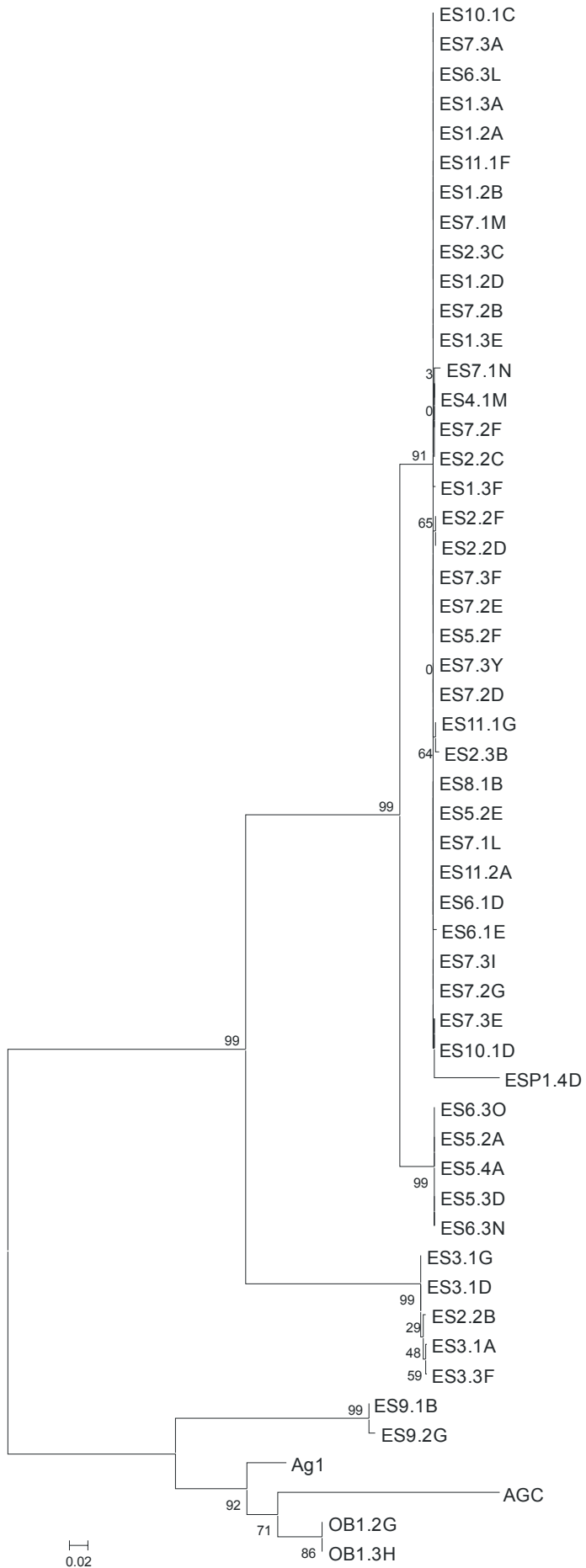


Figura 3: Agrupamento dos isolados de fungos rizoctonióides estudados, a partir da análise do alinhamento das seqüências da região ITS do rDNA utilizando o algoritmo Kimura 2-Parâmetros, o método Neighbor-Joining, bootstraps com 5000 repetições e excluindo-se *gaps* e dados perdido. Os códigos apresentados no agrupamento correspondem aos isolados estudados: AG1, *R. solani* AG11A; AGC, *Ceratorhiza* sp. AGC. Os códigos dos demais isolados são iniciados com o código da população da orquídea hospedeira conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 3: Haplotipos observados entre os fungos micorrízicos isolados de *E. secundum* e *Epidendrum* sp. e respectivos códigos dos isolados

Haplotipo	Isolados
1	ES1.2A, ES1.2B, ES1.2D, ES1.3A, ES1.3E, ES2.2C, ES2.3C, ES4.1M, ES5.2E, ES5.2F, ES6.1D, ES6.1E, ES6.3L, ES7.1L, ES7.1M, ES7.2B, ES7.2D, ES7.2E, ES7.2F, ES7.2G, ES7.3A, ES7.3E, ES7.3F, ES7.3I, ES7.3Y, ES8.1B, ES10.1C, ES10.1D, ES11.1F, ES11.2A
2	ES1.3F
3	ES2.2B, ES3.1D, ES3.1G
4	ES2.2D, ES2.2F
5	ES2.3B
6	ES3.1A
7	ES3.3F
8	ES5.2A, ES5.3D, ES5.4A, ES6.3N, ES6.3O
9	ES7.1N
10	ES11.1G
11	ESP1.4D

*Os códigos apresentados no agrupamento correspondem aos isolados estudados: AG1, *R. solani* AG1IA; AGC, *Ceratorhiza* sp. AGC. Os códigos dos demais isolados são iniciados com o código da população da orquídea hospedeira, conforme apresentado na Tabela 1.

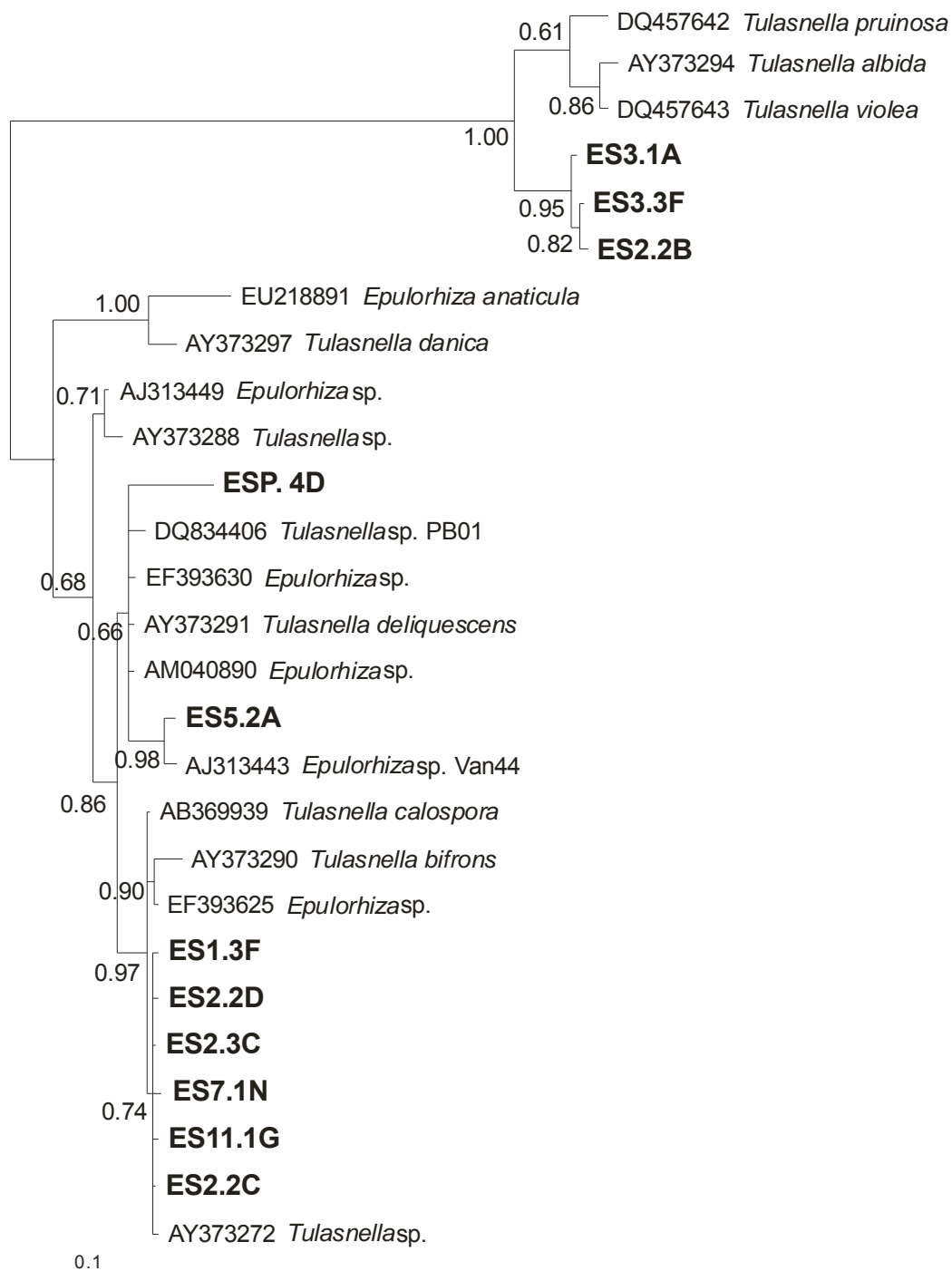


Figura 4: Agrupamento dos isolados de fungos rizotonióides *Epulorhiza* spp., micorrízicos de *Epidendrum* spp., em relação a fungos *Tulasnella* spp. e *Epulorhiza* spp., baseado na análise das seqüências da região ITS do rDNA pela estatística Bayesianan MCMC, no programa MrBayes, em 1.500.000 gerações. Os códigos em destaque no agrupamento correspondem aos isolados estudados, sendo que esses códigos são iniciados com o código da população da orquídea hospedeira conforme apresentado na Tabela 1.

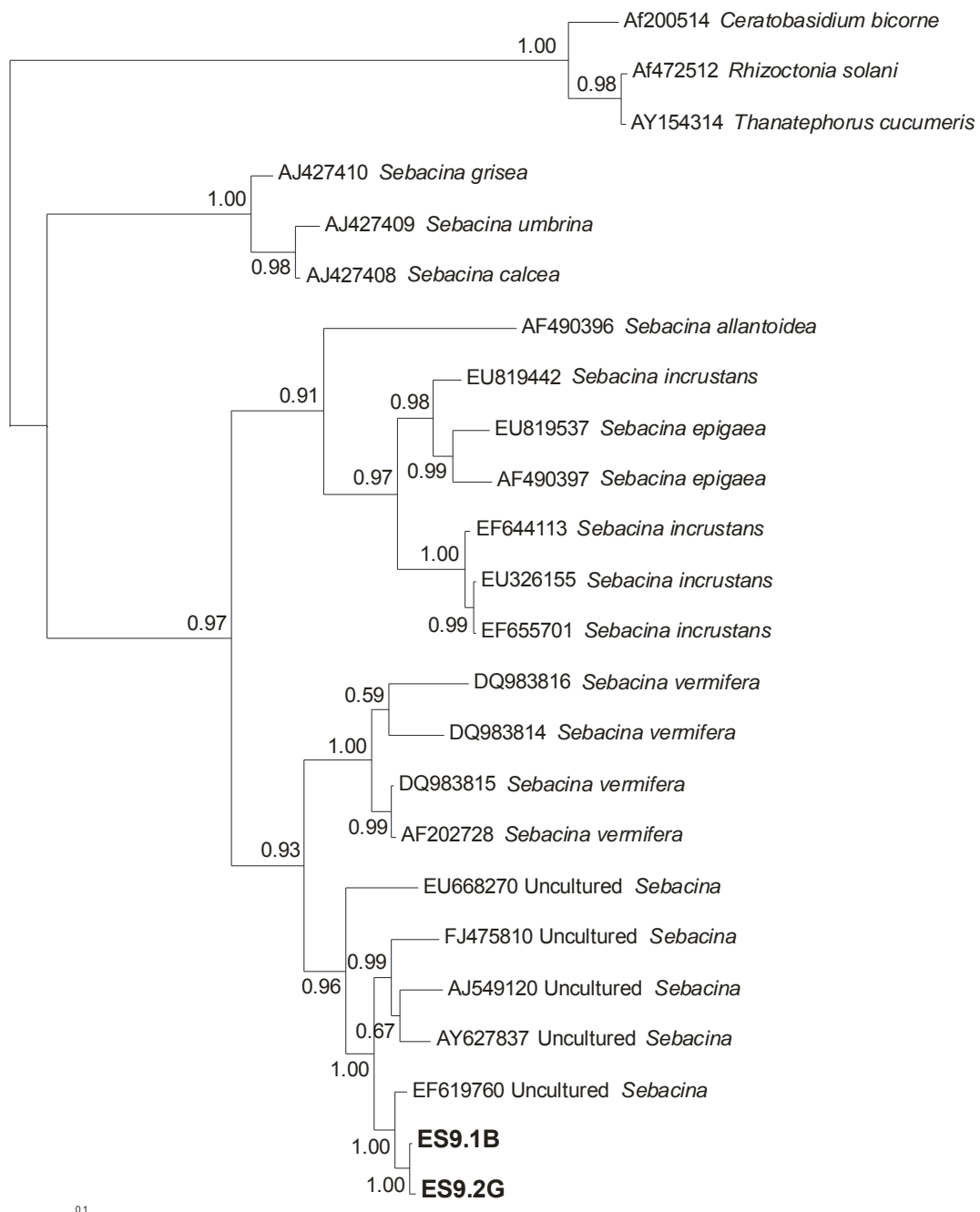


Figura 5: Agrupamento dos isolados de fungos rizoctonióides *Sebacina* sp., micorrízicos de *Epidendrum* spp., em relação a fungos *Sebacina* spp., baseado na análise das seqüências da região ITS do rDNA pela estatística Bayesianan MCMC, no programa MrBayes, em 1.500.000 gerações. Os códigos em destaque no agrupamento correspondem aos isolados estudados, sendo que esses códigos são iniciados com o código da população da orquídea hospedeira, conforme apresentado na Tabela 1.

IV. DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato da associação de *E. secundum* e de uma orquídea brasileira a fungos do gênero *Opadorhiza*. Apenas fungos *Epulorhiza* sp. haviam sido obtidos dessa espécie (Nogueira, 2004; Linhares, 2006; Pereira et al., 2009) e desse gênero de orquídea (Zettler et al., 1998; Pereira et al., 2003; 2005b; Nogueira et al., 2005), sendo os simbiontes mais freqüentemente isolados neste trabalho (Figura 3 e 4). As observações anteriores sugeriam especificidade entre a espécie de orquídea *E. secundum* e fungos do gênero *Epulorhiza*, assim como entre o gênero *Epidendrum* e esse gênero de fungo (Zettler et al., 1998; Pereira et al., 2003; 2005b; 2009; Nogueira, 2004; Nogueira et al., 2005; Linhares, 2006). Entretanto, os isolados obtidos na população ES9 de *E. secundum* foram identificados como *Opadorhiza* sp. por apresentarem grande identidade com fungos do gênero *Sebacina*, na análise das seqüências da região ITS do rDNA (Figura 3 e 5), o qual é teleomorfo do gênero *Opadorhiza* (Currah e Zelmer, 1992; Moore, 1996; García et al., 2006). A obtenção desses dois isolados, a partir de fragmentos de córtex do sistema radicular de *E. secundum*, mostra que esses fungos também podem estabelecer associação micorrízica com essa espécie de orquídea.

As populações ES3 e ES9 foram amostradas no mesmo habitat e local do campo de altitude da Serra das Cabeças, no topo da sub-serra Totem Deitado e em um campo graminóide localizado próximo a um escrube (Tabela 1). Os fungos micorrízicos obtidos da população ES3, isolados e identificados como *Epulorhiza* sp. por Pereira et al. (2009), foram comparados aos isolados da população ES9. Eles se assemelharam quanto às características quantitativas e apresentaram as menores médias para essas características (Tabela 2 e Figura 1 e 2). Entretanto, foram distinguidos com base na seqüência da região ITS (Figura 3). Fungos *Opadorhiza* sp. e *Epulorhiza* sp. são muito próximos em relação às características morfológicas, o que explica as semelhanças observadas entre os isolados de ES3 e ES9. Contudo, são diferenciados morfológicamente com base na ultra-estrutura do septo dolipórico (Morre,

1987; 1996; Currah e Zelmer, 1992; García et al., 2006), assim como pelas seqüências da região ITS do rDNA e da subunidade maior mitocondrial (Selosse et al., 2002a; b; Suárez et al., 2006; 2008).

Segundo Moore (1996), o parenteossomo de fungos de ambos os gêneros é imperfurado e constituído de três camadas. Porém, o parenteossomo de fungos de gênero *Opadorhiza* é constituído de uma camada mais eletrônica central e cercada por duas camadas menos eletrônicas, enquanto que o parenteossomo de fungos do gênero *Epulorhiza* é constituído de duas camadas eletrônicas que cercam uma camada menos eletrônica central. A observação da ultra-estrutura do septo dolipórico tem sido utilizada não apenas na identificação de simbiontes fúngicos isolados e cultivados, mas também na identificação do simbionte colonizando o sistema radicular de orquídeas. Porém, apenas essa característica não é suficiente para identificar a espécie ou gênero do simbionte, sendo necessário avaliar outras características para esse fim (Suárez et al., 2008). A análise da seqüência da região ITS do rDNA, assim como da subunidade maior mitocondrial (mtLSU), tem possibilitado a identificação dos fungos micorrízicos de orquídeas, e é, também, de grande utilidade em estudos sobre a diversidade e a especificidade nessa interação (Taylor e Bruns, 1999; Otero et al., 2002; 2004; 2007; Taylor et al., 2002; 2004; 2008; Ma et al., 2003; Suárez et al., 2006; 2008; Shefferson et al., 2007; 2008).

As características morfológicas avaliadas também diferenciaram os isolados do gênero *Epulorhiza* dos isolados de *R. solani* AG11A e *Ceratorhiza* spp., mas não foram suficientes para diferenciá-los dos isolados *Opadorhiza* sp. (Figura 1 e 2). Isso não significa que a caracterização morfológica seja dispensável, pois essas características são úteis na diferenciação e identificação de fungos micorrízicos (Currah e Zelmer, 1992; Currah et al., 1997; Ma et al., 2003; Pereira et al., 2003; 2005b), além de auxiliarem na distinção entre os isolados de um conjunto de fungos obtidos de uma mesma população de planta (Capítulo 1). Contudo, isolados fúngicos obtidos de diferentes populações, mesmo que apresentem características morfológicas semelhantes, devem ser

caracterizados de forma mais detalhada para evitar identificações equivocadas.

Isolados do grupo G1 foram, freqüentemente, obtidos de raízes de *E. secundum* coletadas em diferentes regiões de campo de altitude do PESB. Um desses isolados, ES2.3B, tem se mostrado eficiente no cultivo das espécies *E. secundum* e *Cyrtopodium cardiochilum* Lindl., promovendo, *in vitro*, a germinação de sementes, e o desenvolvimento de protocórmios, assim como, a manutenção da plântula em casa de vegetação (Pereira et al., 2007, 2008). Isso sugere que a espécie de fungo representada pelo subgrupo G1 é bem distribuída nos campos de altitude do PESB, o que garante a distribuição e a realização do ciclo de vida de *E. secundum* nessa região.

O agrupamento de representantes de G1 com *Tulasnella* sp., *Tulasnella bifrons* Bourdot & Galzin, *Tulasnella calospora* (Boud.) Juel. e *Epulorhiza* sp., baseado na análise da região ITS utilizando a estatística Baesyana (Figura 4), foi similar ao resultado obtido por McCormick et al. (2004), ao analisar seqüências da região ITS de fungos associados a raízes de *Goodyera pubescens* (Willd.) R. Br. e *Tipularia discolor* (Pursh) Nutt., orquídeas terrestres amostradas no nordeste e noroeste dos Estados Unidos da América. *T. calospora* foi considerado um simbiote universal de orquídeas, por ser encontrado em associação com várias espécies de orquídea e por apresentar uma grande capacidade de estabelecer associação simbiótica *in vitro*, entretanto, tem sido observado um problema em relação à taxonomia dessa e de algumas outras espécies do gênero *Tulasnella* (Hadley, 1970; Suárez et al., 2006).

Os isolados do grupo G2 foram agrupados a um fungo obtido de uma orquídea do gênero *Vanda* por Ma et al. (2003) e estão contidos em um clado junto a *Tulasnella deliquescens* (Juel) Juel, embora apresentem uma distância maior que 5 % (Figura 4). *T. deliquescens* é o teleomorfo de *Epulorhiza repens* (Bernard) Moore, o qual tem sido isolado do sistema radicular de orquídeas (Terashita, 1982; Pereira et al., 2005b). Os isolados contidos no subgrupo G2 foram obtidos apenas de duas populações de *E. secundum*, ES5 e ES6, amostradas em um afloramento

rochoso de um campo de altitude da Serra das Cabeças, sub-serra Mamute.

Os representantes do grupo G3, composto por fungos isolados de raízes da população ES3 de *E. secundum*, amostradas em campo graminóide próximo a escrube, e um isolado da população ES2, não apresentaram identidade em relação a nenhuma das seqüências da região ITS, de isolados fúngicos identificados, selecionadas do banco de dados obtidas (Figura 4). O clado contendo esses isolados foi unido ao clado contendo *Tulasnella albida* Bourdot & Galzin, *Tulasnella pruinosa* Bourdot & Galzin e *Tulasnella violea* (Quél.) Bourdot & Galzin (Figura 4). Simbiontes da orquídea terrestre *T. discolor* apresentaram relação semelhante a essas três espécies de fungos tulasnelóides (McCormick et al., 2004), assim como isolados das orquídeas epífitas *Pleurothallis lilijae* Foldats, *Stelis concinna* Lindl., *Stelis hallii* Lindl. e *Stelis superbiens* Lindl. (Suárez et al., 2006). Os isolados do subgrupo G2 foram obtidos apenas na sub-serra Mamute e os isolados do subgrupo G3, apenas na sub-serra Totem Deitado. Essas são sub-serras vizinhas na Serra das Cabeças e, mesmo assim, apresentam esses fungos distintos. Essa observação pode ser explicada pela separação geográfica, pela ineficiência desses isolados em produzirem estruturas que possibilitem a dispersar ou às diferenças entre os substratos contidos nessas diferentes regiões.

Os isolados *Opadorhiza* sp. foram agrupados a várias seqüências de região ITS de fungos do gênero *Sebacina*, não cultivados e não identificados morfológicamente, e formaram um ramo próximo a um segundo ramo abrangendo representantes de *Sebacina vermifera* Oberwinkler, descrito por Weiss et al. (2004) como subgrupo B dos Sebacinalles (Figura 5). Fungos desse gênero são comumente observados formando associações ectomicorrízicas e associações micorrízicas com ericáceas e orquídeas (Bougoure et al., 2005; Selosse et al., 2002a;b; 2007), mas, especialmente os do subgrupo B, são incapazes de produzir basidiocarpo e são observados em associação com ericáceas, com orquídeas clorofiladas e com briófitas (Weiss et al., 2004; Selosse et al., 2007).

A relação entre as características morfológicas vegetativas e sexuais e a seqüência de regiões conservadas do DNA dos fungos micorrízicos de orquídea pode auxiliar na taxonomia desses simbiontes, ao possibilitar uma melhor classificação dos mesmos (Taylor et al., 2002; Dearnaley, 2007). As metodologias para avaliação das características morfológicas utilizadas neste trabalho, assim como, da ultra-estrutura do septo dolipórico, já estão bem definidas (Pereira et al., 2005a; Suárez et al., 2006; Pereira et al., 2009; Capítulo 1). Da mesma forma, várias estratégias para amplificação de seqüências de regiões conservadas estão disponíveis (White et al., 1990; Taylor e Bruns, 1999; Suárez et al., 2006; 2008). Entretanto, ainda há vários desafios para a taxonomia dos fungos micorrízicos de orquídea, tais como, solucionar os problemas de identificações equivocadas, estabelecer a correspondência entre os nomes teleomórficos e anamórficos das espécies e propor a identificação, em nível de espécie, dos novos fungos micorrízicos de orquídeas detectados com base na análise da seqüência de DNA. Porém, protocolos para indução de estruturas sexuais necessitam ser testados e desenvolvidos devido à dificuldade de se induzir tais estruturas em fungos tulasnelóides e à importância dessas estruturas na identificação dos fungos rizoctonióides em nível de espécie (Taylor et al., 2002; Pereira et al., 2005a).

V. CONCLUSÕES

1. Fungos do gênero *Epulorhiza* são os principais simbiontes de *E. secundum* nas regiões de campo de altitude do PESB, mas fungos do gênero *Sebacina* também podem formar associação micorrízica com essa espécie de orquídea.
2. Pelo menos três haplotipos de fungos do gênero *Epulorhiza* associam-se a *E. secundum* no PESB.
3. A análise multivariada das características morfológicas avaliadas não diferencia os isolados de fungos do gênero *Opadorhiza* dos isolados de fungos do gênero *Epulorhiza*.
4. Há uma espécie de *Epulorhiza* sp. bem distribuída nos campos de altitude do PESB, a qual pode ser a principal responsável por garantir a distribuição e a completa ocorrência do ciclo de vida de *E. secundum* nessa região.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Research**, v.25, p.3389–3402, 1997.
- Arditti, J. **Fundamentals of orchid biology**. John Wiley & Sons, 1992. 691 p.
- Bougoure, J.J.; Bougoure, D.S., Cairney, J.W.G.; Dearnaley, J.D.W. ITS-RFLP and sequence analysis of endophytes from *Acianthus*, *Caladenia* and *Pterostylis* (Orchidaceae) in southeastern Queensland. **Mycological Research**, v.109, n.4, p.452–460, 2005.
- Caiafa, A.N.; Silva, A.F. Composição florística e espectro biológico de um campo de altitude no parque estadual da serra do brigadeiro, Minas Gerais – Brasil. **Rodriguésia**, v.56, n.87, p.163-173, 2005.
- Cameron D.D., Leake J.R., Read D.J. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **New Phytologist**, v.171, p.405–416, 2006.
- Cameron D.D., Johnson I., Leake J.R., Read D.J. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. **New Phytologist**, v.180, p.176–184, 2008.
- Chase, M.W.; Cameron, K.M.; Barrett, R.L.; Freudenstein, J.V. DNA data and Orchidaceae systematic: a new phylogenetic classification. In: Dixon, KW; Kell, SP; Barrett, RL; Cribb, PJ (eds) **Orchid Conservation**. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah. p. 205-226, 2003.
- Currah, R.S.; Zelmer, C.D. A key and notes for the genera of fungi with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. **Reports of the Tottori Mycological Institute**, v.30; p.43-59, 1992.
- Currah, R.S.; Zettler, L.W., McInnis, T.M. *Epulorhiza inquilina* sp. nov. from *Platanthera* (Orchidaceae) and a key to *Epulorhiza* species. **Mycotaxon**, v.61; p.338-342, 1997.
- Cruz, C.D.; Regazzi, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. Viçosa, Editora UFV, 1997. 394p.
- Cruz, C.D. **Programa Genes: Diversidade genética**. Viçosa, Editora UFV, 2008. 278p.
- Dearnaley, J.D.W. Further advances in orchid mycorrhizal research. **Mycorrhiza**, v.17, p.475–486, 2007.
- García, V.G.; Onco, M.A.P.; Susan, V.R. Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.4, p.55-79, 2006.

- Gardes, M.; Bruns, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rust. **Molecular Ecology**, v.2, 113–118, 1993.
- Hadley, G. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. **New Phytologist**, 69: 1015–1023, 1970.
- Leake, J. R. Tansley Review No. 69. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. **New Phytologist**, v.127, p.171-216, 1994.
- Leake, J. R. Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the 'saprophytic' plant myth. **Mycologist**, 19:113-122, 2005.
- Leoni, L.S.; Tinte, V.C. **Flora do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, estado de Minas Gerais, Brasil v.I – Caracterização da vegetação e lista preliminar das espécies**. Carangola, Gráfica São José. 2004.
- Linhares, D.O. **Caracterização morfológica de micorrizas de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* nativas do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro**. Viçosa, UFV, 36p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2006.
- Ma, M.; Tan, T.K.; Wong, S.M. Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids **Mycological Research**, v.107, n.9, p.1041–1049, 2003.
- McCormick, M.K.; Whigham, D.F.; O'Neill, J. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. **New Phytologist**, 163:425–438, 2004.
- Miller, D.; Warren, R.; Miller, I.M.; Seehawer, H. **Serra dos órgãos, sua histórias e suas orquídeas**. Nova Friburgo, RJ: Editora Scart, 2006, 567p.
- Moore, R.T. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. **Mycotaxon**, v.29, p.91-99, 1987.
- Moore, R. T. The dolipore/parentosome septum in modern taxonomy. In: Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S.; Dijst, G. (Eds), ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1996. p.13-35.
- Nogueira, R.E. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de orquídeas**. Viçosa, UFV, 36p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2004.
- Nogueira, R.E.; Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Lanna, M.C.; Mendonça, M. Fungos micorrízicos associados e orquídeas em campos rupestres na Região do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.3, p.417-424, 2005.

- Otero, J.T.; Ackerman, J.D.; BAYMAN, P.. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. **American Journal of Botany**, v.89, p.1852–1858, 2002.
- Otero, J.T.; Ackerman, J.D.; Bayman, P. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. **Molecular Ecology**, v.13, p.2393-2404, 2004.
- Otero, J.T.; Flanagan, N.; Herre, E.A.; Ackerman, J.D.; Bayman, P. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v.94, n.12, p.1944–1950, 2007.
- Pereira, M.C. **Diversidade e especificidade de fungos micorrízicos associados a *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – MG**. Viçosa, UFV, 59p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2006.
- Pereira, M.C. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae)**. Viçosa, UFV, 48p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa. 2009.
- Pereira, M.C.; Kasuya, M.C.M.; Pereira, O.L.; Costa, M.D.; Rocha, R.B. Diversidade de fungos micorrízicos *Epulorhiza* spp. isolados de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.1187-1197, 2009.
- Pereira, O.L. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécies de orquídeas neotropicais**. Viçosa, UFV, 48p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2001.
- Pereira, O.L.; Rollemberg, C.L.; Borges, A.C.; Matsuoka, K.; Kasuya, M.C.M. *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. **Mycoscience**, v.44, p.153-155, 2003.
- Pereira, O.L., Kasuya, M.C.M., Rollemberg, C.L., Borges, G.M. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.191-197, 2005a.
- Pereira, O.L., Kasuya, M.C.M., Borges, A.C., Araújo, E.F. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. **Canadian Journal of Botany**, v.83, p.54-65, 2005b.
- Peterson, R. L., Uetake, Y., Zelmer, C. Fungal symbioses with orchid protocorms. **Symbiosis**, v.25; p.29-55, 1998.
- Peterson, R.L., Massicotte, H.B., Melville, L.H. **Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology**. NRC Research Press, 2004. 173p.

- Rasmussen, H.N. **Terrestrial orchid: from seed to mycotrophic plant.** Cambridge University Press, 1995. 444p.
- Rasmussen, H. N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza, **Plant and Soil**, v.244; p.149-163, 2002.
- Rozas, J.; Sánchez-DelBarrio, J.C.; Messeguer, X., Rozas, R. DnasSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v19, p.2496-2497, 2003.
- Selosse, M.A.; Weiß, M.; Jany, J.L.; Tillier, A. Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. **Molecular Ecology**, v.11, p.1831–1844, 2002a.
- Selosse, M.A.; Bauer, R.; Moyersoen, B. Basal hymenomycetes belonging to the Sebacinaceae are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees. **New Phytologist**, 155: 183–195, 2002b.
- Selosse, M.A. Setaro, S.; Glatard, F.; Richard, F.; Urcelay, C.; Weiß, M. Sebacinales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. **New Phytologist**, v.174, p.864–878, 2007.
- Sharon, M.; Kuninaga, S.; Hyakumachi, M.; Naito, S.; Sneh, B. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, v.49, n.2, p.93-114, 2008.
- Shefferson, R.P.; Taylor, D.L.; Weiß, M.; Garnica, S.; et al. The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. **Evolution**, v.61-6, p.1380–1390, 2007.
- Shefferson, R.P.; Kull, T.; Tali, K. Mycorrhizal interactions of orchids colonizing Estonian mine tailings hills. **American Journal of Botany**, v.95, n.2, p.156–164, 2008.
- Smith, S.E., Read, D.J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 2.ed. Academic Press, 1997. 605p.
- Suárez, J.P.; Weiß, M.; Abele, A.; Garnica, S.; Oberwinkler, F.; Kottke, I. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. **Mycological Progress**, v.110, p.1257–1270, 2006.
- Suárez, J.P.; Weiss, M.; Abele, A.; Oberwinkler, F.; Kottke, I. Members of Sebacinales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. **Mycological Progress**, 7:75–85, 2008.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.

- Taylor, D.L.; Bruns, T.D. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza macula* and *C. mertensiana*. **Molecular Ecology**, v.8, p.1719-1732, 1999.
- Taylor, D.L.; Bruns, T.D.; Leake, D.J.; Read, D.J. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: van der Heijden, M.G.A., Sanders, I. **Mycorrhizal Ecology**. Springer-Verlag, 2002. p.375-414.
- Taylor, D.L.; Bruns, T.D.; Hodges, S.A. Evidence for mycorrhizal races in a cheating orchid. **Proceedings of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v.271, p.35-43, 2004.
- Taylor, D.L.; McCORMICK, M.K. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. **New Phytologist**, 177:1020–1033, 2008.
- Terashita, T. Fungi inhabiting wild orchids in Japan (II). Isolation of symbionts from *Spiranthes sinensis* var. *amoena*. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, v.23, p.319-328, 1982.
- Weiss, M.; Selosse, M.A.; Rexer, K.H.; Urban, A. Oberwinkler, F. *Sebacinales*: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. **Mycological Research**, v.108, n.9, p.1003–1010, 2004.
- White, T.J.; Bruns, T.D.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T. J. (eds.), San Diego, Academic Press., 1990. p.315–322.
- Zettler, L. W., Delaney, T. W., Sunley, J. A. Seed propagation of epiphytic green-fly orchid, *Epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus. **Selbyana**, v.19; p.249-253, 1998.

CAPÍTULO 3

DIVERSIDADE DE FUNGOS E ESPECIFICIDADE NA ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA EM ORQUÍDEAS DO GÊNERO *Epidendrum*

RESUMO

Fungos *Epulorhiza* spp. são frequentemente isolados de raízes de orquídeas do gênero *Epidendrum*, um dos gêneros da família Orchidaceae com maior número de espécies e encontrado com muita frequência em fragmentos de Mata Atlântica. Esses fungos apresentam eficiência em promover a germinação de sementes e o desenvolvimento de protocórmios e plântulas de espécies hospedeiras e não-hospedeiras. Em menor frequência, fungos *Opadorhiza* sp. têm sido relatados como micorrízicos de *Epidendrum secundum*. Com o objetivo de estudar a diversidade de fungos e a especificidade na associação micorrízica em orquídeas do gênero *Epidendrum*, amostras de raízes de sete espécies e de 21 populações desse gênero foram coletadas em fragmentos de Mata Atlântica localizados no Espírito Santo, em Minas Gerais e no Rio de Janeiro. O DNA total dos isolados foi extraído para posterior amplificação, seqüenciamento e análise da região ITS do rDNA. As seqüências obtidas apresentaram identidade com as seqüências de fungos *Sebacina*/*Opadorhiza* e *Tulasnella*/*Epulorhiza*, depositadas no banco de dados do NCBI. Maior variabilidade na seqüência da região ITS foi observada entre os isolados de *Tulasnella* spp., os quais formaram nove clados. Os fungos *Sebacina* spp. apresentaram menor variabilidade nessa seqüência, formaram três clados e foram identificados como pertencentes ao subgrupo B dos Sebacinales. Estes resultados sugerem que as orquídeas do gênero *Epidendrum* associam-se com uma grande diversidade de fungos *Tulasnella* spp., mas com uma pequena diversidade de fungos *Sebacina* spp. Além disso, os resultados também mostraram que orquídeas terrestres estabelecem associação com uma maior diversidade de fungos do que orquídeas epífitas. As orquídeas epífitas estudadas não compartilharam simbiontes com as orquídeas terrestres, sugerindo que, no campo, há algumas espécies de fungos micorrízicos capazes de associar-se especificamente com as orquídeas epífitas e outras com as orquídeas terrestres. Orquídeas *Epidendrum* spp. apresentam preferência em associar-se a fungos *Tulasnella* spp., mas também estabelecem associação com fungos *Sebacina* spp. Assim, não há especificidade entre

o gênero de orquídea *Epidendrum* e o gênero de fungo micorrízico *Tulasnella*.

ABSTRACT

Epulorhiza spp. fungi are usually isolated from roots of *Epidendrum* orchids, a genus of Orchidaceae family with one of the largest number of species and frequently found in Atlantic Forest fragments. These fungi have shown efficiency to promote seed germination and development of protocorms and seedlings of host and non host species. At lower frequency, *Opadorhiza* fungi have been reported as mycorrhizal fungi of *Epidendrum secundum*. Aiming to study fungal diversity and specificity in mycorrhizal association in *Epidendrum* orchid, roots samples of seven species and 21 populations of this genus were collected in Atlantic Forest fragments located in Espírito Santo, Minas Gerais and Rio de Janeiro States. The total DNA of isolates was extracted to subsequent amplification, sequencing and analysis of ITS rDNA sequence. The sequences obtained showed identity to fungal sequences of *Sebacina/Opadorhiza* and *Tulasnella/Epulorhiza*, deposited in the NCBI data bank. Larger variability in ITS sequence was observed among *Tulasnella* spp. isolates, which formed nine clades. *Sebacina* fungi showed less variability in this sequence, formed three clades and were identified as belonging to subgroup B of Sebaciniales. These results suggest that *Epidendrum* orchids associate with a great diversity of *Tulasnella* fungi, but with a low diversity of *Sebacina* fungi. In addition, the results show that terrestrial orchids associated with a larger diversity of fungi than epiphytic orchids. The epiphytic orchids studied did not share symbionts with terrestrial orchids, suggesting that, in nature, there are some mycorrhizal fungal species able to associate specifically with epiphytic orchids and others with terrestrial orchids. *Epidendrum* orchids showed preference for associating with *Tulasnella* fungi, although they can establish association with *Sebacina* fungi. Therefore, there is no specificity between *Epidendrum* orchid and *Tulasnella* mycorrhizal fungi.

I. INTRODUÇÃO

O gênero *Epidendrum* pertence à subtribo Laeliinae, tribo Epidendreae, e está dentro da maior subfamília da família Orchidaceae, Epidendroideae (Chase et al., 2003). É um dos gêneros com maior número de espécies, reunindo mais de 1.100 espécies (Chase et al., 2003). Suas espécies são, frequentemente, observadas em remanescentes de Mata Atlântica e foram catalogadas no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB)/MG, no Parque Nacional da Serra dos Órgãos/RJ, em reservas biológicas de Santa Teresa/ES e em regiões de restinga em Vila Velha/ES (Leoni e Tinte, 2004; Caiafa e Silva, 2005; Fontana, 2006; Miller et al., 2006; Magnago et al., 2007).

Nos ambientes naturais, a associação micorrízica em orquídea é essencial à iniciação do ciclo de vida da mesma, ou seja, à germinação das sementes e ao desenvolvimento do embrião à plântula, assim como à manutenção da planta adulta (Arditti, 1992; Smith e Read, 1997; Peterson et al., 1998; 2004; Dearlaney, 2007). Como as orquídeas produzem sementes pequenas e desprovidas de reservas, os carboidratos e os minerais necessários ao desenvolvimento do embrião são adquiridos a partir da degradação dos pelotons, os quais são enovelados de hifas do fungo simbiote formados entre a membrana plasmática e a parede celular de células da região basal do embrião (Ramussen, 1995; Peterson et al., 2004). Nas orquídeas aclorofiladas, a dependência pelo fungo micorrízico é mantida durante todo o ciclo de vida da planta (Leake, 1994; 2005). Já as orquídeas clorofiladas, ao alcançarem o estágio autotrófico, dependem dos fungos micorrízicos, principalmente, para obter os minerais necessários ao metabolismo, que são captados por esses simbiossomas do solo e transferidos para a planta (Dijk et al., 1997; Smith e Read, 1997). Porém, uma transferência bidirecional de carbono tem sido observada entre a planta clorofilada e o simbiote fúngico, de modo que o fungo recebe mais de cinco vezes a quantidade de carbono que transferiu para a planta (Cameron et al., 2006; 2008).

Os fungos rizoctonióides são os principais simbiossomas de orquídeas clorofiladas (Currah e Zelmer, 1992; Taylor et al., 2002; Rasmussen,

2002). Dentre os cinco gêneros de fungos rizoctonióides capazes de estabelecer associação com orquídeas, representantes dos gêneros *Ceratorhiza*, *Epulorhiza*, *Opadorhiza* e *Rhizoctonia* já foram isolados de orquídeas brasileiras (Pereira, 2001; Pereira et al., 2003; Nogueira, 2004; Nogueira et al., 2005; Pereira et al., 2005a; b; 2009; Linhares, 2006; Capítulo 2).

Até o momento, foram identificados simbiossiontes de apenas três espécies de orquídeas brasileiras pertencentes ao gênero *Epidendrum* e todas elas foram amostradas em remanescentes de Mata Atlântica localizados no PESB e no Parque Estadual do Itacolomi (PEI) (Nogueira, 2004; Nogueira et al., 2005; Pereira et al., 2005b; 2009; Linhares, 2006; Capítulo 2). Fungos do gênero *Epulorhiza* tem sido, freqüentemente, isolados do sistema radicular de orquídeas do gênero *Epidendrum* (Zettler et al., 1998, Nogueira, 2004; Nogueira et al., 2005; Pereira et al., 2005a; 2009; Linhares, 2006; Capítulo 2), os quais têm apresentado grande eficiência em promover a germinação das sementes dessas plantas (Zettler et al., 1998; Pereira, 2006). Populações de *Epidendrum secundum* Jacq., naturais de campos de altitude localizados no PESB, apresentaram preferência em estabelecer associação micorrízica com fungos do gênero *Epulorhiza* (Pereira et al., 2009; Capítulo 2), porém, observou-se que essa espécie de orquídea também estabelece associação micorrízica com fungos do gênero *Sebacina* (Capítulo 2).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade de fungos e a especificidade na associação micorrízica em orquídeas epífitas, terrestres e rupícolas do gênero *Epidendrum*, naturais de fragmentos de Mata Atlântica localizados nos estados de Minas Gerais, do Rio de Janeiro e do Espírito Santo, com base na análise da seqüência da região ITS do rDNA dos simbiossiontes fúngicos.

II. MATERIAL E MÉTODOS

A diversidade dos fungos micorrízicos associados a orquídeas do gênero *Epidendrum*, amostradas em diferentes regiões dos estados do Espírito Santo, de Minas Gerais e do Rio de Janeiro, foi estudada com base na seqüência da região ITS do rDNA de fungos obtidos em outros estudos, assim como de fungos isolados nesse trabalho (Tabela 1).

Os simbiontes foram isolados a partir do sistema radicular das orquídeas *Epidendrum* spp. (Tabela 1) amostradas, conforme descrito por Pereira et al. (2009). Para extração de DNA, o micélio dos isolados foi crescido em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio BDL (Potato Dextrose Broth – ACUMEDIA), transferido para tubo Eppendorff de 1,5 mL, congelado a -86 °C e liofilizado. O micélio liofilizado foi, então, utilizado para extração de DNA total, segundo descrito por Schäfer e Wöstemeyer (1992). A região ITS (Internal Transcribed Spacer) do rDNA nuclear foi amplificada em reação de PCR, utilizando-se o par de oligonucleotídeos ITS1-ITS4 (White et al., 1990) e as condições de reação descritas por Gardes e Bruns (1993).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o Exo-Sap (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante. Esses produtos foram enviados para Macrogen Inc. (Geumchun-gu, Korea do Sul) para seqüenciamento de ambas as fitas em ciclo conduzido utilizando-se BigDye TM e Automatic Sequencer 3730xl (Applied Biosystems).

As seqüências da região ITS amplificadas dos isolados foram analisadas no programa Sequencher versão 4.5 (Gene Codes) para edição e construção dos *contigs*. Posteriormente, essas seqüências foram alinhadas e analisadas por meio do programa Mega Versão 4 (Tamura et al., 2007). Dendrogramas foram construídos pelo método Neighbor-Joining, utilizando o modelo de análise de nucleotídeo Kimura 2-Parameter, bootstrap com 5000 repetições e excluindo-se *gaps* e dados perdidos (Sharon et al., 2008). As seqüências contendo menos de 25 % de dissimilaridade foram reunidas, realinhadas e analisadas utilizando o

Tabela 1: Espécies de orquídeas do gênero *Epidendrum*, hospedeiras dos fungos estudados, e o código, localidade, cidade e unidade federal das populações amostradas e a referência dos trabalhos que estudaram as populações, isolaram os fungos e obtiveram as seqüências da região ITS do rDNA

Espécie	População	Hábito	Localidade	Cidade/UF	Referência	
<i>Epidendrum chlorinum</i> Barb. Rodr.	EC1	Epífita	PESB/Serra das Cabeças/Mamute	Araponga/MG	Presente trabalho	
<i>Epidendrum denticulatum</i> Barb. Rodr.	ED1	Terrestre	Parque Municipal de Marapendi	Rio de Janeiro/RJ	Presente trabalho	
	ED4	Terrestre	Restinga da Morada do Sol	Vila Velha/ES	Presente trabalho	
<i>Epidendrum rigidum</i> Jacq.	OM6*	Epífita	si**	Pedra do Anta/MG	Pereira et al., 2005b; Nogueira, 2004	
<i>Epidendrum secundum</i> Jacq.	ES1	Rupícola	PESB/Serra das Cabeças/Totem Deitado	Araponga/MG	Pereira et al., 2009	
	ES2	Rupícola	PESB/Serra das Cabeças/Totem Deitado	Araponga/MG	Pereira et al., 2009	
	ES3	Terrestre	PESB/Serra das Cabeças/Totem Deitado	Araponga/MG	Pereira et al., 2009	
	ES4	Terrestre	PESB/Serra das Cabeças/Mamute	Araponga/MG	Capítulo 2	
	ES5	Rupícola	PESB/Serra das Cabeças/Mamute	Araponga/MG	Capítulo 2	
	ES6	Rupícola	PESB/Serra das Cabeças/Mamute	Araponga/MG	Capítulo 2	
	ES7	Terrestre	PESB/Serra das Cabeças/Mamute	Araponga/MG	Capítulo 2	
	ES8	Terrestre	PESB/Serra das Cabeças/Totem Deitado	Araponga/MG	Capítulo 2	
	ES9	Terrestre	PESB/Serra das Cabeças/Totem Deitado	Araponga/MG	Capítulo 2	
	ES10	Rupícola	PESB/Pedra do Pato	Araponga/MG	Capítulo 2	
	ES11	Terrestre	PESB/Pedra do Pato	Araponga/MG	Capítulo 2	
	ES12	Terrestre	Macaé de Cima/Trilha no Sítio do Miller	Nova Friburgo/RJ	Presente trabalho	
	ES15	Terrestre	PESB/Serra das Cabeças/Totem Deitado	Araponga/MG	Presente trabalho	
	OM16	Rupícola	si**	Nova Lima/MG	Nogueira, 2004	
	<i>Epidendrum</i> sp.1	ESP1	Epífita	PESB/Trilha do Moinho	Araponga/MG	Presente trabalho
	<i>Epidendrum</i> sp.2	ESP3	Epífita	Macaé de Cima/Trilha no Sítio do Miller	Nova Friburgo/RJ	Presente trabalho
<i>Epidendrum</i> sp.3	ESP4	Rupícola	Atalho da Valssugana Velha	Santa Teresa/ES	Presente trabalho	

*O isolado OM6 foi obtido do sistema radicular de *Polystachya concreta* (Jacq.) Garay e Sweet, porém pertence a mesma espécie do isolado OM1 obtido de *E. rigidum* (Pereira et al., 2005b). **si: sem informação.

programa DNA Sequence Polymorphism Versão 4.90.1 (Rozas et al., 2003) para determinação de haplotipos. Uma seqüência representante de cada haplotipo foi analisada, pelo algoritmo BLASTn (Altschul et al., 1997), para identificação dos haplotipos com base na identidade com seqüências depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Em seguida, as cem seqüências com maior identidade a cada haplotipo foram alinhadas e analisadas para determinação de haplotipos, sendo um representante de cada haplotipo utilizado para agrupamento com os isolados estudados. As seqüências que representam os haplotipos observados, entre as seqüências dos fungos estudados e entre as seqüências obtidas no banco de dados, foram separadas de acordo com o gênero, realinhadas e analisadas para determinar o melhor modelo de evolução utilizando MrModeltest. Os alinhamentos foram analisados no programa MrBayes Versão 3.1, com base na estatística Bayesiana, utilizando o método MCMC (Markov chain Monte Carlo) e 10.000.000 gerações.

III. RESULTADOS

Foram analisadas seqüências de 75 isolados de fungos rizoctonióides. Todos os isolados foram obtidos a partir de fragmentos do sistema radicular de orquídeas que apresentavam pelotons. Foram estudadas sete orquídeas do gênero *Epidendrum* coletadas em áreas pertencentes ao bioma Mata Atlântica, perfazendo amostragem em um total de 10 localidades e 21 populações de orquídeas (Tabela 1).

Com base na análise das 75 seqüências, pelo método Neighbor-Joining e algoritmo Kimura 2-parameter, foi possível identificar 12 grupos de fungos rizoctonióides (Figura 1). Devido à presença de muitas seqüências semelhantes, realizou-se a análise no programa DNA Sequence Polymorphism e as seqüências foram distribuídas em 28 haplotipos (Tabela 2). Após análise utilizando o algoritmo BLASTn, foram observados haplotipos com identidade à seqüência de fungos pertencentes aos gêneros *Sebacina* e *Tulasnella*. Pela análise de seqüências de haplotipos de um mesmo gênero com seqüências de grande identidade obtidas do NCBI, realizada utilizando-se a estatística Bayesiana, observou-se que os isolados *Tulasnella* spp. pertencem a nove clados diferentes (Figura 2), enquanto os isolados *Sebacina* spp. pertencem a três (Figura 3). Maior variabilidade foi observada entre os isolados *Tulasnella* spp. obtidos, pois apresentaram uma média geral calculada pelo algoritmo Kimura 2-Parameter igual a 0,25 (Figura 2). Contudo, uma menor variabilidade foi observada entre os isolados *Sebacina* spp., obtendo-se uma média geral igual a 0,19 (Figura 3). Em *E. denticulatum* e de *E. secundum* foram observados fungos micorrízicos pertencentes aos gêneros *Sebacina* e *Tulasnella*, enquanto que nos demais foram observados apenas um dos gêneros (Tabela 3).

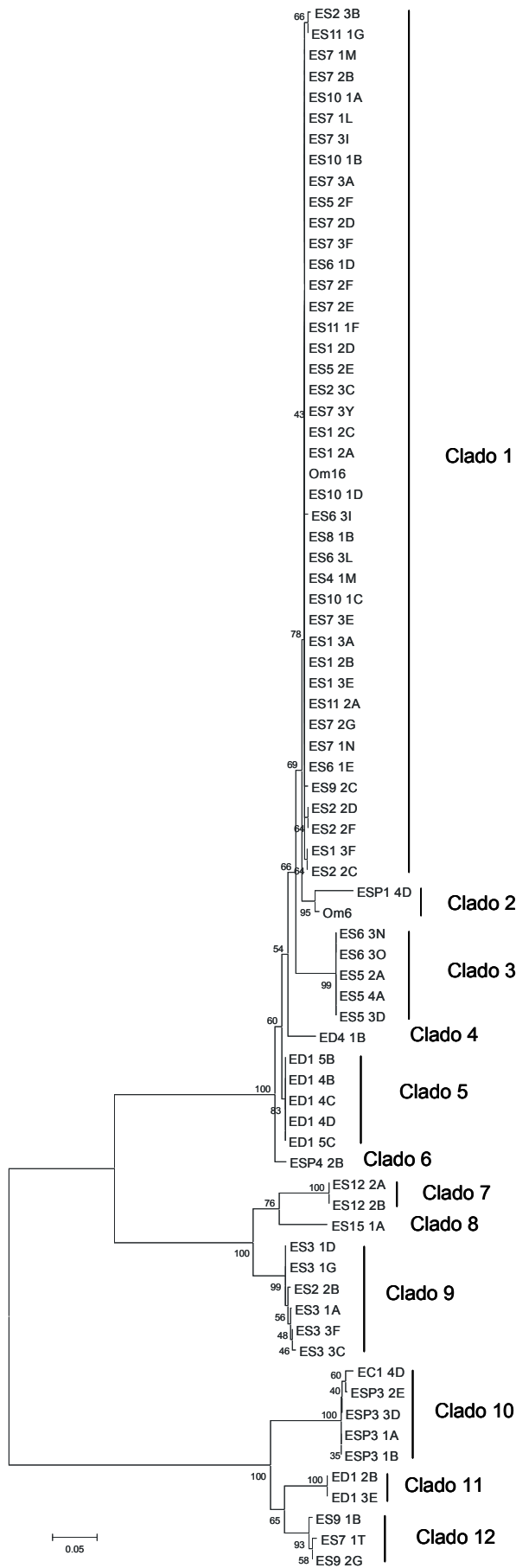


Figura 1: Agrupamento dos fungos rizoctonióides baseado na análise da seqüência da região ITS do rDNA utilizando o método Neighbor-Joining, o algoritmo Kimura 2-Parâmetros, bootstrap calculado com 5000 repetições e excluindo-se gaps e dados perdidos. Os códigos apresentados no agrupamento correspondem aos isolados estudados, sendo que esses códigos são iniciados com o código da população da orquídea hospedeira, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 2: Haplotipos observados entre os fungos micorrízicos obtidos das orquídeas do gênero *Epidendrum* e os códigos dos isolados

Haplotipo	Isolados
1	ES2.2B
2	ES3.1A
3	ES3.1D, ES3.1G
4	ES3.3C
5	ES3.3F
6	ES2.3B
7	ES1.2A, ES1.2B, ES1.2D, ES1.3A, ES1.3E, ES1.3F, ES2.2C, ES2.3C, ES1.2C, ES11.1F, ES5.2E, ES6.3L, ES6.1D, ES5.2F, ES7.1L, ES7.1M, ES7.1N, ES7.2B, ES7.2D, ES7.2E, ES7.2F, ES7.2G, ES7.3A, ES7.3E, ES7.3F, ES7.3I, ES7.3Y, ES8.1B, ES10.1A, ES10.1B, ES10.1C, ES10.1D, ES4.1M, ES11.2A, OM16
8	ES2.2D, ES2.2F
9	ES5.2A, ES5.3D, ES5.4A, ES6.3N, ES6.3O
10	ED1.4C, ED1.4D, ED1.5C, ED1.4B, ED1.5B
11	ESP1.4D
12	ES11.1G
13	ES6.1E
14	ES6.3I
15	ES9.2C
16	ED4.1B
17	ESP4.2B
18	OM6
19	ES7.1T
20	ES9.1B
21	ES9.2G
22	ESP3.1A, ESP3.1B
23	ESP3.2E
24	ESP3.3D
25	ED1.2B, ED1.3E
26	EC1.4D
27	ES15.1A
28	ES12.2A, ES12.2B

*Os códigos apresentados no agrupamento correspondem aos isolados estudados, sendo que esses códigos são iniciados com o código da população da orquídea hospedeira, conforme apresentado na Tabela 1.



Figura 2: Agrupamento dos fungos rizoctonióides *Tulasnella* spp., micorrizicos de *Epidendrum* spp., em relação a fungos *Tulasnella* spp. e *Epulorhiza* spp., baseada na análise das seqüências da região ITS do rDNA utilizando a estatística Bayesiana MCMC em 10.000.000 gerações. Os códigos em destaque no agrupamento correspondem aos isolados estudados e são iniciados com o código da população da orquídea hospedeira conforme apresentado na Tabela 1.



Figura 3: Agrupamento dos fungos rizoctonióides *Sebacina* spp., micorrízicos de *Epidendrum* spp., em relação a fungos *Sebacina* spp., baseada na análise das seqüências da região ITS do rDNA utilizando a estatística Bayesiana MCMC em 10.000.000 gerações. Os códigos em destaque no agrupamento correspondem aos isolados estudados e são iniciados com o código da população da orquídea hospedeira conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 3: Número de clados dos isolados *Sebacina* spp. e *Tulasnella* spp. obtidos das sete espécies de orquídeas do gênero *Epidendrum* estudadas. Foram consideradas as análises realizadas utilizando a estatística Bayesiana MCMC em 10.000.000 gerações

Espécie	Clados	
	<i>Tulasnella</i>	<i>Sebacina</i>
<i>Epidendrum chlorinum</i>	0	1
<i>Epidendrum denticulatum</i>	2	1
<i>Epidendrum rigidum</i>	1	0
<i>Epidendrum secundum</i>	5	1
<i>Epidendrum</i> sp.1	1	0
<i>Epidendrum</i> sp.2	0	1
<i>Epidendrum</i> sp.3	1	0

IV. DISCUSSÃO

A maioria dos isolados obtidos pertencem ao gênero *Tulasnella*. Fungos micorrízicos pertencentes ao gênero teleomórfico *Tulasnella* e seu anamorfo *Epulorhiza* são os principais simbiossiontes de orquídeas terrestres (Currah e Zelman, 1992; Dearnaley, 2007) e são, freqüentemente, isolados de orquídeas do gênero *Epidendrum* (Zettler et al., 1998, Pereira et al., 2003, 2005b; Nogueira, 2004; Nogueira et al., 2005; Linhares, 2006; Pereira, 2006; Capítulo 2). Em vida livre, esses fungos são saprófitas (Dearnaley, 2007) e apresentam grande potencial em promover a germinação de sementes, tanto de espécies hospedeiras como de não-hospedeiras, e em suportar o desenvolvimento dos protocórmios e das plântulas obtidos (Zettler et al., 1998; 1999; 2007; Pereira, 2004; 2006; Stewart e Kane, 2006; Johnson et al., 2007, Veloso et al., 2007; 2008). Por isso, esses fungos são de grande potencial para aplicação durante a produção simbiótica de mudas de orquídeas, seja para fins de reintrodução, como para fins comerciais (Pereira et al., 2002).

Entretanto, fungos do gênero *Sebacina* também foram isolados das orquídeas amostradas. Fungos pertencentes a esse gênero são simbiossiontes de espécies do gênero *Epidendrum* (Figura 3; Tabela 3; Capítulos 1 e 2), assim como de várias outras espécies de orquídeas, dentre as quais podem ser citadas: *Corallorhiza trifida* Châtel (McKendrick et al., 2000), *Neotia nidus-avis* (L) Rich. (McKendrick et al., 2002; Selosse et al., 2002), *Epipactis microphylla* (Ehrh.) Swartz (Selosse et al., 2004), *Acianthus exsertus* R.Br., *Acianthus pusillus* D.L. Jones, *Caladenia carnea* R.Br., *Pterostylis longifolia*, *Pterostylis nutans* R.Br., *Pterostylis obtusa* R.Br. (Bougoure et al., 2005), *Caladenia falcata*, *Microtis media* R. Br. (Bonnardeaux et al., 2007), *Stelis hallii* Lindl., *Stelis superbiens* Lindl., *Stelis concinna* Lind. e *Pleurothallis lilijae* Foldats (Suárez et al., 2008). Além disso, fungos *Sebacina* spp. foram eficientes ao induzir a germinação de sementes de orquídeas de outros gêneros (McKendrick et al., 2000, 2002). Os isolados *Sebacina* spp., obtidos de *Epidendrum* spp., pertencem ao subgrupo B dos Sebaciniales, descrito por Weiss et al. (2004), o qual abrange fungos que estabelecem associação com

ericáceas, com orquídeas clorofiladas e com briófitas e que são incapazes de produzir basidiocarpo (Weiss et al., 2004; Selosse et al., 2007). Fungos desse gênero apresentam, também, capacidade de formar associação ectomicorrízica e atuam como saprófitas, apresentando participação na decomposição da matéria orgânica depositada nos ambientes naturais (Rasmussen, 2002).

Cada vez mais as técnicas moleculares têm sido aplicadas em estudos sobre associações micorrízicas no campo, o que possibilita obter resultados de uma forma mais rápida e a identificação mais precisa dos simbioses fúngicos (Dearnaley, 2007). Contudo, ainda sabe-se pouco sobre muitos dos fungos detectados em associação com espécies vegetais no campo, principalmente quando se trata de simbioses de orquídeas de região tropical. Isso pode ser inferido devido à divergência observada entre a maioria das seqüências obtidas dos isolados estudados e as seqüências disponíveis no banco de dados NCBI (Figuras 2 e 3). Muitas das seqüências depositadas nesse banco de dados são oriundas de isolados identificados apenas em nível de gênero ou são seqüências amplificadas diretamente do DNA total do sistema radicular colonizado pelo simbiote fúngico. Com isso, a identificação da espécie do simbiote fúngico com base na seqüência, na maioria das vezes, é impedida devido à falta de uma cultura referência previamente identificada e que tenha seqüência disponível. Os problemas causados por identificações equivocadas também devem ser considerados, como é o caso de *T. calospora* e *T. deliquescens* (Roberts, 1999; Suárez et al., 2006). Isso pode explicar a grande variabilidade observada entre seqüências de *T. calospora* obtidas nos bancos de dados (Figura 2; Hadley, 1970; Suárez et al., 2006). Dessa forma, justifica-se realizar trabalhos que buscam identificar isolados obtidos em cultura pura, os quais possibilitam proposição de novas espécies com base nas características morfológicas e na seqüência de regiões conservadas do DNA do fungo.

O gênero *Tulasnella* foi mais amplo e diverso grupo observado neste estudo (Figuras 1, 2 e 3). Dois grandes grupos foram observados

entre os isolados desse gênero (Figura 2) e ambos contêm seqüências de culturas referências, o que confirmou a identificação proposta (Figura 2). A menor divergência na seqüência de nucleotídeos, observada entre os isolados *Sebacina* spp. obtidos das orquídeas *Epidendrum* spp., levou à inserção desses isolados em clados bem próximos no agrupamento (Figura 3). Resultados semelhantes foram observados por Bonnardeaux et al. (2007) ao estudar fungos micorrízicos pertencentes a estes dois gêneros de fungos obtidos de orquídeas da Austrália.

O isolamento de fungos pertencentes aos gêneros *Sebacina* e *Tulasnella*, a partir das espécies de orquídeas estudadas, mostrou que o gênero *Epidendrum* associa-se a uma larga gama de simbiontes fúngicos (Tabelas 1 e 3; Figuras 1, 2 e 3). Isso pode ser claramente observado em *E. secundum* e em *E. denticulatum* que estabeleceram associação com diferentes clados de um mesmo gênero e com fungos de diferentes gêneros (Tabelas 1 e 2). A partir de *E. secundum*, foram obtidos fungos endêmicos, a exemplo dos clados 3 e 9 (Figura 1), assim como, fungos amplamente distribuídos, como o clado 1, nas localidades do PESB e em um fragmento de Mata Atlântica em Nova Lima/MG (Figura 1; Tabela 1). O fato de *E. secundum* associar-se a uma grande diversidade de fungos e, ainda, contar com a larga distribuição de um simbionte eficiente na germinação de sementes e desenvolvimento de protocórmios e plântulas (Pereira, 2006; Veloso et al., 2007, 2008) contribuiu diretamente para a ampla distribuição dessa espécie nos vários fragmentos de Mata Atlântica estudados.

Durante a análise das seqüências dos simbiontes fúngicos das espécies de *Epidendrum* spp., observou-se que isolados de uma mesma população e de populações próximas apresentam pouca ou nenhuma variação na seqüência de nucleotídeos da região ITS. Dessa forma, esses isolados foram agrupados em uma mesmo clado ou em um mesmo haplotipo (Tabelas 1 e 2; Figuras 1, 2 e 3). Isso corrobora com Pereira et al. (2009) e com Capítulo 1, nos quais foram observadas grande similaridade na morfologia e na seqüência da região ITS entre isolados obtidos de uma mesma população. Logo, estudando vários isolados

obtidos de uma mesma população ou de populações próximas, um agrupamento prévio, baseado em características morfológicas, e uma posterior seleção de representativos, podem facilitar os estudos de diversidade.

A maioria dos estudos da associação micorrízica de orquídeas brasileiras têm buscado identificar os fungos micorrízicos com base em suas características morfológicas (Pereira et al., 2003; 2005a; b; 2009; Nogueira, 2004; Nogueira et al., 2005; Linhares, 2006; Capítulos 1 e 2), embora em alguns os isolados foram, também, caracterizados quanto ao padrão de restrição da região ITS (ITS-RFLP), ao padrão de bandas gerado por oligonucleotídeos aleatórios (RAPD) e à seqüência da região ITS (Nogueira, 2004; Pereira et al., 2005a; Capítulos 1 e 2). Porém, há poucas seqüências desses fungos depositadas nos bancos de dados internacionais e poucas informações existem sobre o padrão de RFLP dos mesmos. As seqüências dos fungos analisados neste trabalho mostram como é grande a variabilidade de simbiontes de orquídeas brasileiras a serem descritas (Figuras 2 e 3).

Fungos *Sebacina* spp. e *Tulasnella* spp. foram isolados de orquídeas *Epidendrum* spp. epífitas (Tabela 1), assim como já observados por Suárez et al. (2008), os quais identificaram fungos desses dois gêneros associados a orquídeas epífitas no Equador. Um isolado obtido de *Epidendrum* sp.1 epífita apresentou identidade com as seqüências de *Epulorhiza epiphytica* Pereira, Rollemberg et Kasuya (Figuras 1), fungo isolado de orquídeas epífitas *P. concreta* e *E. rigidum* e descrito por Pereira et al. (2003), e com a seqüência de uma *Epulorhiza* sp. obtida do banco de dados (Figura 2). As seqüências dos isolados obtidos das demais espécies epífitas, *E. chlorinum* e *Epidendrum* sp.3, apresentaram identidade com as seqüências de fungos *Sebacina* sp. e foram reunidas em um mesmo clado, apresentando baixa identidade em relação às seqüências obtidas do banco de dados (Figura 1 e 3). Todas as orquídeas epífitas estudadas foram amostradas em regiões bem distintas. *E. rigidum* e *Epidendrum* sp.1 foram amostradas no estado de Minas Gerais, mas em fragmentos de Mata Atlântica localizados em cidades diferentes

(Tabela 1), enquanto *E. chlorinum* e *Epidendrum* sp.3, nos estados de Minas Gerais e do Rio de Janeiro, respectivamente. Isto mostra que a preferência por um determinado gênero de fungo não é regional e nem é devido ao hábito da planta, pois fungos de ambos os gêneros foram obtidas de espécies terrestres e epífitas que cresciam em diferentes regiões estudadas.

As seqüências dos isolados de orquídeas epífitas formaram clados distintos dos isolados obtidos de orquídeas terrestres (Figuras 1, 2 e 3), isso sugere que entre os fungos *Tulasnella* sp. e *Sebacina* sp. há espécies capazes de associar-se a espécies do gênero *Epidendrum* epífitas e outras capazes de associar-se a espécies terrestres. A amostragem não permitiu discutir a especificidade das espécies epífitas amostradas, para isso seria necessário estudar outras populações das espécies e em localidades diferentes.

Especificidade entre orquídeas do gênero *Epidendrum* e fungos do gênero anamórfico *Epulorhiza* foi sugerida por trabalhos anteriores (Zettler et al., 1998, Pereira et al., 2003; 2005b; 2009; Nogueira, 2004; Nogueira et al., 2005; Linhares, 2006; Pereira, 2006). Entretanto, as observações do Capítulo 2 e deste capítulo mostram que orquídeas desse gênero estabelecem associação, preferencialmente, com fungos do gênero anamórfico *Epulorhiza* e seu teleomorfo *Tulasnella*, embora possam associar-se a fungos do gênero anamórfico *Opadorhiza* e seu teleomorfo *Sebacina*. Deste modo, os dados permitem concluir que não há especificidade entre o gênero de orquídea *Epidendrum* e o gênero de fungo micorrízico *Tulasnella*.

Segundo Bonnardeaux et al. (2007), melhores discussões sobre a especificidade na associação micorrízica são possibilitadas pela combinação de testes de germinação simbiótica com a identificação dos simbiontes fúngicos das orquídeas no campo, no lugar da utilização de apenas uma das duas estratégias. Logo, estudos de compatibilidade entre as sementes e os isolados fúngicos devem ser realizado para melhor compreensão da interação das orquídeas *Epidendrum* spp. e fungos *Sebacina* spp.

Além de serem essenciais para a germinação das sementes e para o desenvolvimento do embrião até a formação da plântula, os fungos micorrízicos participam na absorção de nutrientes pelas plantas (Smith e Read, 1997). Eles atuam na mineralização e na solubilização, disponibilizando os nutrientes presentes na fase orgânica e na fase química do solo, respectivamente (Smith e Read, 1997; Joner et al., 2000). Atuam, também, no transporte desses nutrientes, absorvendo-os do solo e canalizando-os para a planta, e ampliam a área de contato da planta com o solo, possibilitando à planta acessar nutrientes de microssítios inacessíveis ao seu sistema radicular (Smith e Read, 1997, Solaiman e Saito, 2001). Isso mostra a grande importância desses simbioses para o ciclo de vida das orquídeas em seus habitats naturais. Assim, a compreensão da diversidade de fungos e da especificidade na associação micorrízica é essencial para o desenvolvimento de estratégias de conservação das orquídeas, dos seus simbioses e de seus ambientes naturais.

V. CONCLUSÕES

1. Indivíduos adultos de orquídeas do gênero *Epidendrum* associam-se, preferencialmente, a fungos do gênero *Tulasnella*, mas também se associam a fungos do gênero *Sebacina*.
2. Os isolados de *Sebacina* spp. obtidos pertencem ao Subgrupo B dos Sebacinales.
3. Os isolados *Tulasnella* spp. apresentam maior variabilidade na sequência de nucleotídeos da região ITS do que os isolados *Sebacina* spp.
4. Orquídeas epífitas do gênero *Epidendrum* não compartilham espécies de fungos micorrízicos com as orquídeas terrestres desse gênero.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Research**, v.25, p.3389–3402, 1997.
- Arditti, J. **Fundamentals of orchid biology**. John Wiley & Sons, 1992. 691 p.
- Bonnardeaux, Y.; Brundrett, M.; Batty, A.; Dixon, K.; Koch, J.; Sivasithamparam, K. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. **Mycological Research**, v.111, p.51–61, 2007.
- Bougoure, J.J.; Bougoure, D.S., Cairney, J.W.G.; Dearnaley, J.D.W. ITS-RFLP and sequence analysis of endophytes from *Acianthus*, *Caladenia* and *Pterostylis* (Orchidaceae) in southeastern Queensland. **Mycological Research**, v.109, n.4, p.452–460, 2005.
- Caiafa, A.N.; Silva, A.F. Composição florística e espectro biológico de um campo de altitude no parque estadual da serra do brigadeiro, Minas Gerais – Brasil. **Rodriguésia**, v.56, n.87, p.163-173, 2005.
- Cameron D.D., Leake J.R., Read D.J. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **New Phytologist**, v.171, p.405–416, 2006.
- Cameron D.D., Johnson I., Leake J.R., Read D.J. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. **New Phytologist**, v.180, p.176–184, 2008.
- Chase, M.W.; Cameron, K.M.; Barrett, R.L.; Freudenstein, J.V. DNA data and Orchidaceae systematic: a new phylogenetic classification. In: Dixon, KW; Kell, SP; Barrett, RL; Cribb, PJ (eds) **Orchid Conservation**. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah. p. 205-226, 2003.
- Currah, R.S.; Zelmer, C.D. A key and notes for the genera of fungi with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. **Reports of the Tottori Mycological Institute**, v.30; p.43-59, 1992.
- Dearnaley, J.D.W. Further advances in orchid mycorrhizal research. **Mycorrhiza**, v.17, p.475–486, 2007.
- Dijk, E.; Willwms, J. H.; van Andel, J. Nutrient responses as a key factor to the ecology of orchid species. **Acta Botanica Neerlandica**, v.46; p.339-363, 1997.
- Fontana, A.P. **Distribuição das Orchidaceae ao longo de um gradiente altitudinal no estado do Espírito Santo**. Santa Teresa, ESFA, 41p. (Monografia) – Escola Superior São Francisco De Assis. 2006.
- Gardes, M.; Bruns, T.D. ITS primers with enhanced specificity for

- basidiomycets – application to the identification of mycorrhizae and rust. **Molecular Ecology**, v.2, 113–118, 1993.
- Hadley, G. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. **New Phytologist**, 69: 1015–1023, 1970.
- Johnson, T.R.; Stewart, S.L.; Dutra, D.; Kane, M.E.; Richardson, L. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae) – preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.90, p.313-323, 2007.
- Joner, E.J.; Van Aarle, I.M.; Vosatka, M. Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae: A review. **Plant and Soil**, v.226, p.199-210, 2000.
- Leake, J. R. Tansley Review No. 69. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. **New Phytologist**, v.127, p.171-216, 1994.
- Leake, J. R. Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the 'saprophytic' plant myth. **Mycologist**, 19:113-122, 2005.
- Leoni, L.S.; Tinte, V.C. **Flora do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, estado de Minas Gerais, Brasil v.I – Caracterização da vegetação e lista preliminar das espécies**. Carangola, Gráfica São José. 2004.
- Linhares, D.O. **Caracterização morfológica de micorrizas de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* nativas do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro**. Viçosa, UFV, 36p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2006.
- Magnago, L.F.S.; Pereira, O.J.; Matos, F.A.R.; Souza, P.F. Caracterização Fitofisionômica da Restinga na Morada do Sol, Vila Velha/ES. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p.456-458, 2007.
- McKendrick, S.L., Leake, J.R., Taylor, D.L.; Read, D.J. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.145, p.523-537, 2000.
- McKendrick, S.L., Leake, J.R., Taylor, D.L.; Read, D.J. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic orchid *Neotia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. **New Phytologist**, v.154, p.233–247, 2002.
- Miller, D.; Warren, R.; Miller, I.M.; Seehawer, H. **Serra dos órgãos, sua histórias e suas orquídeas**. Nova Friburgo, RJ: Editora Scart, 2006, 567p.
- Nogueira, R.E. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de orquídeas**. Viçosa, UFV, 36p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2004.

- Nogueira, R.E.; Pereira, O.L.; Kasuya, M.C.M.; Lanna, M.C.; Mendonça, M. Fungos micorrízicos associados e orquídeas em campos rupestres na Região do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.3, p.417-424, 2005.
- Pereira, M.C. **Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides**. Viçosa, UFV, 25p. (Monografia) – Universidade Federal de Viçosa. 2004.
- Pereira, M.C. **Diversidade e especificidade de fungos micorrízicos associados a *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – MG**. Viçosa, UFV, 59p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2006.
- Pereira, M.C.; Kasuya, M.C.M.; Pereira, O.L.; Costa, M.D.; Rocha, R.B. Diversidade de fungos micorrízicos *Epulorhiza* spp. isolados de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.1187-1197, 2009.
- Pereira, O.L. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécies de orquídeas neotropicais**. Viçosa, UFV, 48p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2001.
- Pereira, O.L.; Rollemberg, C.L.; Kasuya, M.C.M. Associações micorrízicas em orquídeas: perspectivas e utilização em programas de propagação simbiótica. **Orquidário**, v.16, p.40-44, 2002.
- Pereira, O.L.; Rollemberg, C.L.; Borges, A.C.; Matsuoka, K.; Kasuya, M.C.M. *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. **Mycoscience**, v.44, p.153-155, 2003.
- Pereira, O.L., Kasuya, M.C.M., Rollemberg, C.L., Borges, G.M. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.191-197, 2005a.
- Pereira, O.L., Kasuya, M.C.M., Borges, A.C., Araújo, E.F. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. **Canadian Journal of Botany**, v.83, p.54-65, 2005b.
- Peterson, R.L., Uetake, Y., Zelmer, C. Fungal symbioses with orchid protocorms. **Symbiosis**, v.25; p.29-55, 1998.
- Peterson, R.L., Massicotte, H.B., Melville, L.H. **Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology**. NRC Research Press, 2004. 173p.
- Rasmussen, H.N. **Terrestrial orchid: from seed to mycotrophic plant**. Cambridge University Press, 1995. 444p.

- Rasmussen, H. N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza, **Plant and Soil**, v.244; p.149-163, 2002.
- Roberts, P. ***Rhizoctonia*-forming Fungi: a taxonomic guide**. Royal Botanic Gardens, Kew Publishing, 1999
- Rozas, J.; Sánchez-DelBarrio, J.C.; Messeguer, X., Rozas, R. DnasSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v19, p.2496-2497, 2003.
- Schäfer, C.; Wöstemeyer, J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **Journal of Phytopathology**, 136:124-136, 1992.
- Selosse, M.A.; Weiß, M.; Jany, J.L.; Tillier, A. Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. **Molecular Ecology**, v.11, p.1831–1844, 2002.
- Selosse, M.-A.; Faccio, A.; Scappaticci; Bonfante, P. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla*, (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. **Microbial ecology**, v.47, p.416-26, 2004.
- Selosse, M.A. Setaro, S.; Glatard, F.; Richard, F.; Urcelay, C.; Weiß, M. Sebacinales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. **New Phytologist**, v.174, p.864–878, 2007.
- Sharon, M.; Kuninaga, S.; Hyakumachi, M.; Naito, S.; Sneh, B. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, v.49, n.2, p.93-114, 2008.
- Solaiman, M. Z.; Saito, M. Phosphate efflux from intraradical hyphae of *Gigaspora margarita* in vitro and its implication for phosphorus translocation. **New Phytologist**, v.151, p.525–533, 2001.
- Smith, S.E., Read, D.J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 2.ed. Academic Press, 1997. 605p.
- Stewart, S.S.; Kane, M.E. Symbiotic seed germination of *Habenaria mucroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell Tissues and Organ Culture**, v.86, p.159-167, 2006.
- Suárez, J.P.; Weiß, M.; Abele, A.; Garnica, S.; Oberwinkler, F.; Kottke, I. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. **Mycological Progress**, v.110, p.1257–1270, 2006.
- Suárez, J.P.; Weiß, M.; Abele, A.; Oberwinkler, F.; Kottke, I. Members of Sebacinales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a

- neotropical mountain rain forest. **Mycological Research**, v.7, p.75–85, 2008.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.
- Taylor, D.L.; Bruns, T.D.; Leake, D.J.; Read, D.J. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: van der Heijden, M.G.A., Sanders, I. **Mycorrhizal Ecology**. Springer-Verlag, 2002. p.375-414.
- Veloso, T.G.R.; Pereira, M.C.; Kasuya, M.C.M. Germinação simbiótica de *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchidaceae). In: **5º Congresso de Micologia, Resumos...** Recife, PE, 2007.
- Veloso, T.G.R.; Pereira, M.C.; Guimarães, F.A.R.; Torres, D.P.; Oliveira, S.F.; Pereira, O.L.; Bocayuva, M.; Kasuya, M.C.M. Cultivo de *Cyrtopodium cardiochilum* em diferente substratos. **FERTBIO, 2008**. Londrina. Resumos... Londrina, SBCS/SBM/Embrapa, 2008. CD-ROM.
- Weiss, M.; Selosse, M.A.; Rexer, K.H.; Urban, A. Oberwinkler, F. *Sebacinales*: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. **Mycological Research**, v.108, p.1003–1010, 2004.
- White, T.J.; Bruns, T.D.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T. J. (eds.), San Diego, Academic Press., 1990. p.315–322.
- Zettler, L.W.; Delaney, T.W.; Sunley, J.A. Seed propagation of epiphytic green-fly orchid, *Epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus. **Selbyana**, v.19; p.249-253, 1998.
- Zettler, L.W.; Burkhead, J.C.; Marshall, J.A. Use of a Mycorrhizal fungus from *Epidendrum conopseum* to germinate seed of *Encyclia tampensis* in vitro. **Lindleyana**, v.14, p.102-105, 1999.
- Zettler, L.W.; Piskin, K.A.; Stewart, S.L.; Hartsock, J.J.; Bowles, M.L.; Bell, T.J. Protocorm mycobionts of the Federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nutt.) Lindley, and a technique to prompt leaf elongation in seedlings. **Studies in Mycology**, v.53, p.163-171, 2005.
- Zettler, L.W.; Poulter, S.B.; McDonald, K.I. Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a Mycorrhizal fungus. **HortScience**, v. 42, p.135-139, 2007.

CAPÍTULO 4

COMPOSIÇÃO TOTAL DE ÁCIDOS GRAXOS DE FUNGOS MICORRÍZICOS DA ORQUÍDEA *Epulorhiza* spp.

RESUMO

Os fungos rizoctonióides são os principais fungos micorrízicos de orquídeas. A identificação e a análise de diversidade desses fungos têm sido realizadas pela análise de características morfológicas e moleculares. Entretanto, a composição de ácidos graxos, que é uma técnica molecular utilizada no estudo de fungos rizoctonióides fitopatogênicos, não tem sido empregada em fungos micorrízicos de orquídea. O objetivo deste trabalho foi caracterizar e agrupar os fungos rizoctonióides micorrízicos de orquídeas com base na composição de ácidos graxos, bem como comparar esse agrupamento com a análise da seqüência da região ITS do rDNA. Foram selecionados seis isolados de fungos rizoctonióides. Cinco isolados são micorrízicos de orquídea: três isolados de *Epidendrum secundum*, previamente identificados como *Epulorhiza* sp., e dois de *Epidendrum denticulatum*. O sexto é um isolado de fungo fitopatogênico *Ceratorhiza* sp. AGC. Os agrupamentos gerados com base na composição dos ácidos graxos possibilitou a distinção entre o isolado *Ceratorhiza* sp. AGC e os isolados de *Epulorhiza* spp., assim como entre as duas espécies *Epulorhiza* spp. estudadas, o que foi confirmado pela análise da região ITS do rDNA. A análise da composição de ácidos graxos pela distância de Mahalanobis distinguiu claramente os isolados de *E. denticulatum* dos dois isolados de *Epulorhiza* sp.1 obtidos de *E. secundum*, sugerindo que a essa distância gera agrupamentos com melhor resolução. A análise da composição de ácidos graxos é uma ferramenta útil na caracterização, identificação e análise da diversidade de fungos micorrízicos rizoctonióides.

ABSTRACT

Rhizoctonia-like fungi are the main orchid mycorrhizal fungi. Identification and diversity analysis of these symbionts have been performed through analysis of morphological and molecular characteristics. However, fatty acid composition, that is a molecular technique used to study phytopathogenical *Rhizoctonia*-like fungi, does not have been applied in orchid mycorrhizal fungi. The aim of this study was to characterize and to group *Rhizoctonia*-like orchid mycorrhizal fungi based on fatty acid composition, as well as to compare this cluster with analysis of ITS rDNA sequence. Six isolates of *Rhizoctonia*-like fungi were selected. Five isolates are orchid mycorrhiza: three isolates of *Epidendrum secundum*, previously identified as *Epulorhiza* spp., and two of *Epidendrum denticulatum*. The sixth is an isolate of a phytopathogenical fungi *Ceratorhiza* sp. AGC. The clusters generated based on fatty acid composition distinguished among *Ceratorhiza* sp. AGC and *Epulorhiza* spp. isolates and between the two species of *Epulorhiza* previously identified, that was confirmed by analysis of ITS rDNA sequence. The analysis of fatty acid composition by Mahalanobis distance clearly distinguished the *E. denticulatum* isolates from the two *Epulorhiza* sp.1 isolates obtained from *E. secundum*, suggesting that Mahalanobis distance produces clusters with better resolution. The analysis of fatty acid composition is a useful tool during characterization, identification and diversity analysis of *Rhizoctonia*-like mycorrhizal fungi.

I. INTRODUÇÃO

A associação com fungos micorrízicos é universal na família Orchidaceae (Arditti, 1992; Rasmussen, 1995). Esses fungos são essenciais à germinação das sementes, ao desenvolvimento do embrião à plântula e à nutrição da planta adulta no campo (Arditti, 1992; Rasmussen, 1995; Smith e Read, 1997; Peterson et al., 2004; Dearnaley, 2007). Os fungos micorrízicos de orquídea, em sua maioria, são rizoctonióides e caracterizam-se por apresentar constrição da hifa na região do septo, ramificação da hifa em ângulo reto logo após o septo, produção de cadeias de células intumescidas, as células monilióides, formação de escleródios, septo dolipórico complexo, ausência de esporos assexuados e ciclo sexual raro e de difícil observação (Stalpers e Andersen, 1996; Pereira, 2001; Taylor et al., 2002; García et al., 2006). Esses fungos podem, ainda, atuar na natureza como saprófitas, fitopatogênicos ou ectomicorrízicos (Rasmussen, 2002).

A diversidade de fungos rizoctonióides associados às orquídeas tem sido estudada pela análise da variabilidade observada nas características morfológicas e moleculares desses simbiossiontes (Horton e Bruns, 2001; Prosser, 2002; Rasmussen, 2002; Shan et al., 2002; Taylor et al., 2002; García et al., 2006; Pereira et al., 2009). As características morfológicas podem ser analisadas por técnicas biométricas para se determinar distâncias geométricas úteis na comparação e agrupamento de diferentes isolados (Currah e Zelmer, 1992; Currah et al., 1997; Pereira et al., 2009). Entretanto, o tempo e o trabalho necessários para a determinação de várias dessas características favorecem o desenvolvimento de métodos moleculares que demandem menos etapas e menos tempo (Taylor et al., 2002). As técnicas moleculares baseadas em regiões conservadas do DNA são preferencialmente aplicadas na identificação e no estudo da diversidade dos simbiossiontes fúngicos associados às orquídeas no campo, sendo a análise da seqüência da região ITS do rDNA uma das mais utilizadas (Taylor e Bruns, 1999; Otero et al., 2002, 2007; Shefferson et al., 2007, 2008; Selosse et al., 2002;

Kristiansen et al, 2004; McCormick et al., 2004; Weiss et al, 2004; Bonnardeaux et al., 2007; Suárez et al., 2006, 2008).

A composição de ácidos graxos é uma técnica molecular que vem sendo utilizada para analisar a variabilidade existente entre os isolados de fungos rizoctonióides fitopatogênicos (Johnk e Jones, 1992, 1993, 1994; Johnk et al., 1993; Baird et al., 2000; Priyatmojo et al., 2002a, 2002b; Lanoiselet et al., 2005; Sharon et al., 2006). Os grupos de anastomose (AGs), que são grupos determinados com base na capacidade ou não de fungos rizoctonióides realizarem anastomose de hifa com isolados padrões, têm sido caracterizados, diferenciados e identificados a partir da composição de ácidos graxos (Johnk e Jones, 1992, 1993, 1994; Johnk et al., 1993; Baird et al., 2000; Priyatmojo et al., 2002a; Lanoiselet et al., 2005). Entretanto, na literatura consultada, a composição de ácidos graxos não tem sido utilizada para comparação e diferenciação de fungos rizoctonióides micorrízicos de orquídea.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar fungos rizoctonióides micorrízicos de orquídeas, com base na composição de ácidos graxos, e comparar os perfis de ácidos graxos desses fungos com resultados da análise da seqüência da região ITS.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo, foram selecionados cinco isolados de fungos rizoctonióides micorrízicos de orquídea, pertencentes à Coleção de Fungos Micorrízicos de Orquídea do Laboratório de Associações Micorrízicas, BIOAGRO/UFV, e um isolado do fungo fitopatogênico *Ceratorhiza* sp. AGC (Tabela 1). Os isolados de fungos micorrízicos foram obtidos de duas espécies de orquídeas pertencentes ao gênero *Epidendrum*: três de *Epidendrum secundum* Lindl. e dois de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (Tabela 1). Os isolados de *E. secundum* foram previamente identificados como *Epulorhiza* sp. (Pereira et al., 2009), sendo que ES2.3B e ES4.1M representam uma mesma espécie e ES3.1A representa uma outra espécie (Tabela 1; Capítulos 2 e 3).

Os isolados foram crescidos em placas de Petri contendo 25 mL de meio BDA (Potato Dextrose Agar, ACUMEDIA) e incubados a 28 °C, no escuro, por três dias. Cada isolado foi crescido em tubos contendo 1 mL de meio líquido BDL (Potato Dextrose Broth, ACUMEDIA) inoculado com um disco de, aproximadamente, 9 mm de diâmetro contendo micélio ativo do isolado obtido em meio BDA. Foram realizadas três repetições por isolado. Após quatro dias de incubação no escuro, sem agitação e a 28 °C, as amostras de micélio obtidas foram congeladas a -86 °C, liofilizadas e armazenadas a -86 °C.

O Sistema de Identificação Microbiana (MIS; Microbial ID Inc., Newark, Delaware) foi utilizado para a análise da composição de ácidos graxos das amostras. Os ésteres metílicos de ácidos graxos, obtidos conforme o protocolo estabelecido para o método MIDI (Microbial Identification System, Microbial ID Inc., Newark, Delaware), foram identificados e quantificados em cromatografia gasosa, utilizando o software Sherlock (MIDI Inc., Newark, Delaware; versão 4.5). Os dados das proporções de ácidos graxos obtidos foram transformados pela raiz quadrada do arco seno, submetidos à análise de variância (ANOVA) e à comparação de médias, pelo teste Scott Knott a 5 % de significância,

utilizando-se o programa Genes (versão 2007.0.0). Os dados foram analisados pela distância Euclidiana Padronizada e pela distância de Mahalanobis, sendo as matrizes de distância calculadas empregadas para o agrupamento dos isolados, por meio do método UPGMA,.

Tabela 1: Código dos isolados, identificação da espécie fúngica, espécie do hospedeiro e local de origem dos fungos rizoctonióides estudados

Isolados	Identificação	Hospedeiro	Local de Origem
AGC	<i>Ceratorhiza</i> sp.	-	-
ES2.3B	<i>Epulorhiza</i> sp.1	<i>E. secundum</i>	PESB/Serra das Cabeças, Araponga/MG
ES3.1A	<i>Epulorhiza</i> sp.2	<i>E. secundum</i>	PESB/Serra das Cabeças, Araponga/MG
ES4.1M	<i>Epulorhiza</i> sp.1	<i>E. secundum</i>	PESB/Serra das Cabeças, Araponga/MG
ED5.1A	-	<i>E. denticulatum</i>	Restinga da Morada do Sol, Vila Velha/ES
ED5.3A	-	<i>E. denticulatum</i>	Restinga da Morada do Sol, Vila Velha/ES

Para a análise da região ITS do rDNA, foram utilizadas as seqüências dos isolados AGC, ES2.3B, ES3.1A e ES4.1M, obtidas previamente (Capítulos 1 e 2), e as seqüências dos isolados ED5.1A e ED5.3A, obtidas após extração, amplificação e seqüenciamento, como descrito no Capítulo 1. Com base nessas seqüências, os isolados foram agrupados, utilizando-se o programa MEGA versão 4 (Tamura et al., 2007), o método Neighbor-Joining e o modelo de análise de nucleotídeo Kimura 2-Parameter, com bootstrap calculado em 5.000 repetições e excluindo-se *gaps* e dados perdidos (Sharon et al., 2008). As seqüências dos isolados ED5.1A e ED5.3A foram submetidas à análise BLAST, utilizando-se o algoritmo BLASTn (Altschul et al., 1997), para identificação dos isolados baseada na identidade com seqüências de fungos depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Em seguida, as seqüências obtidas nesse banco de dados e as seqüências dos isolados estudados foram alinhadas e analisadas como descrito acima.

III. RESULTADOS

Um total de onze ácidos graxos foi detectado nos seis isolados de fungos rizoctonióides avaliados. Desses, apenas cinco foram comuns a todos os isolados (Tabela 2). A análise de variância demonstrou haver diferença significativa entre os isolados para a proporção de cada ácido graxo detectado, o que possibilitou o agrupamento dos isolados, com base em cada ácido graxo, pelo teste Scott Knott a 5 % de significância (Tabela 2). Nos agrupamentos feitos utilizando-se as distâncias Euclidiana Padronizada (D) e de Mahalanobis (D^2) e o método UPGMA, a proporção de ácidos graxos possibilitou a diferenciação entre o isolado *Ceratorhiza* sp. AGC e os isolados de *Epulorhiza* spp. e entre as duas espécies de *Epulorhiza*, previamente identificadas (Figuras 1 e 2). No agrupamento em que se utilizou a distância de Mahalanobis, os isolados de *E. denticulatum* foram reunidos em um clado e os isolados de *E. secundum*, *Epulorhiza* sp.1, foram reunidos em outro clado (Figura 2), resultado que é semelhante ao obtido no agrupamento gerado pela análise da região ITS (Figura 3). Com base na seqüência da região ITS, foi possível confirma a identificação dos isolados de *E. denticulatum* como pertencentes ao gênero *Epulorhiza*, os quais foram distinguidos dos demais isolados desse gênero com base nessa seqüência e no perfil de ácidos graxos (Figuras 2, 3 e 4).

Tabela 2: Proporção dos ácidos graxos detectados nos isolados de fungos rizoctonióides

Isolados	Ácidos graxos											
	14:00	Sum In Feature 3	16:00	17:1 ω 8c	17:0	16:0 2OH	18:3 ω 6c (6,9,12)	Sum In Feature 5	18:1 ω 9c	18:00	20:00	
AGC	1,01 a	1,47 c	11,66 a	0,47 d	0 b	0,58 a	0 b	82,86 a	0 b	1,95 b	0 b	
ES2.3B	0 c	4,70 b	5,51 d	0,97 c	0 b	0 b	0 b	55,99 b	30,73 a	2,11 b	0 b	
ES3.1A	0,51 b	5,56 b	9,17 b	1,33 b	0,33 a	0 b	0 b	44,95 c	34,12 a	3,71 a	0,36 a	
ES4.1M	0,29 b	5,64 b	7,05 c	1,86 a	0 b	0 b	0 b	47,86 c	36,06 a	1,25 b	0 b	
ED5.1A	0 c	13,15 a	8,67 b	0,94 c	0 b	0 b	0 b	41,77 d	33,06 a	2,41 b	0 b	
ED5.3A	0,31 b	11,59 a	9,00 b	0,57 d	0 b	0 b	0,27 a	41,75 d	34,86 a	1,66 b	0 b	
CV%	39,65	7,60	3,23	8,61	33,83	11,06	28,91	2,53	6,77	11,07	13,90	

Dados submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de médias Scott Knott, a 5 % de significância, após transformação das proporções obtidas pela raiz quadrada do arco seno. As médias nas colunas seguidas de uma mesma letra são estatisticamente iguais entre si. CV %, coeficiente de variação; Sum In Feature 3, corresponde a 16:1 ω 7c, ou 15 iso2OH, ou ambos; Sum In Feature 5, corresponde a 18 ANTE, ou 18:2 ω 6, 9c, ou ambos. Os códigos apresentados no agrupamento correspondem aos isolados estudados conforme apresentado na Tabela 1.

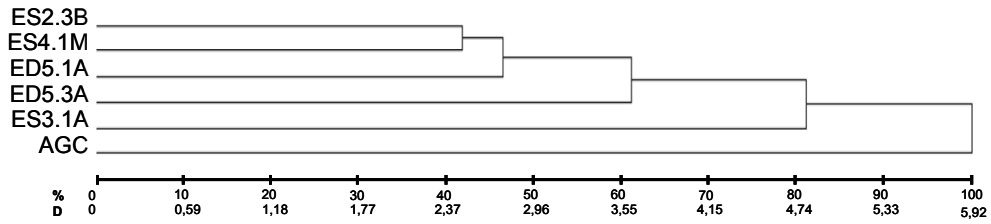


Figura 1: Agrupamento dos fungos rizoctonióides com base nas médias das proporções dos ácidos graxos, utilizando-se a Distância Euclidiana Padronizada (D) e o método UPGMA. Os códigos apresentados no agrupamento correspondem aos isolados estudados conforme apresentado na Tabela 1.

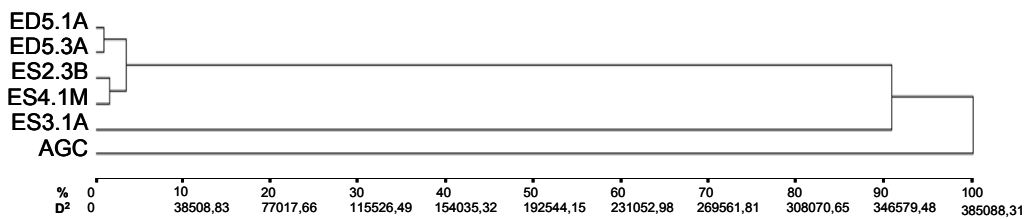


Figura 2: Agrupamento dos fungos rizoctonióides com base nas proporções dos ácidos graxos, utilizando-se a Distância de Mahalanobis (D^2) e o método UPGMA. Os códigos apresentados no agrupamento correspondem aos isolados estudados conforme apresentado na Tabela 1.

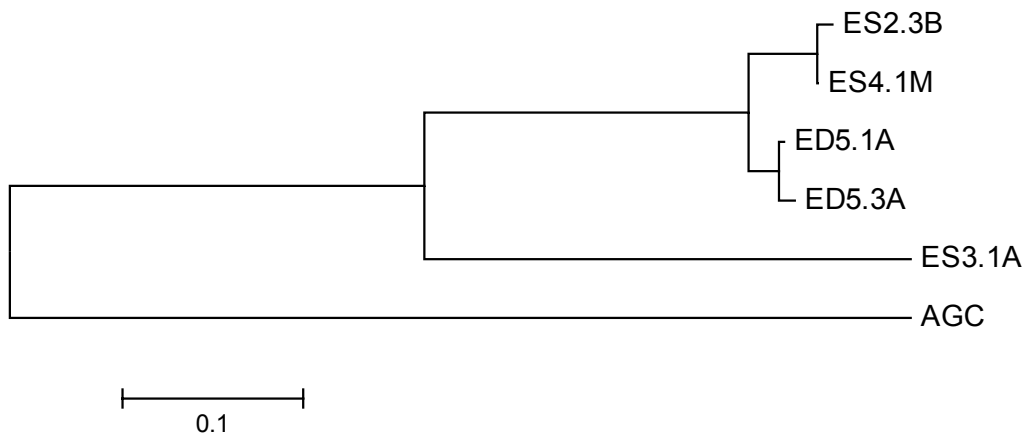


Figura 3: Agrupamento dos isolados de fungos rizoctonióides com base na sequência da região ITS do rDNA, utilizando-se o método Neighbor-Joining e a matriz de distância Kimura 2-Parâmetros. Os códigos apresentados no agrupamento correspondem aos isolados estudados conforme apresentado na Tabela 1.

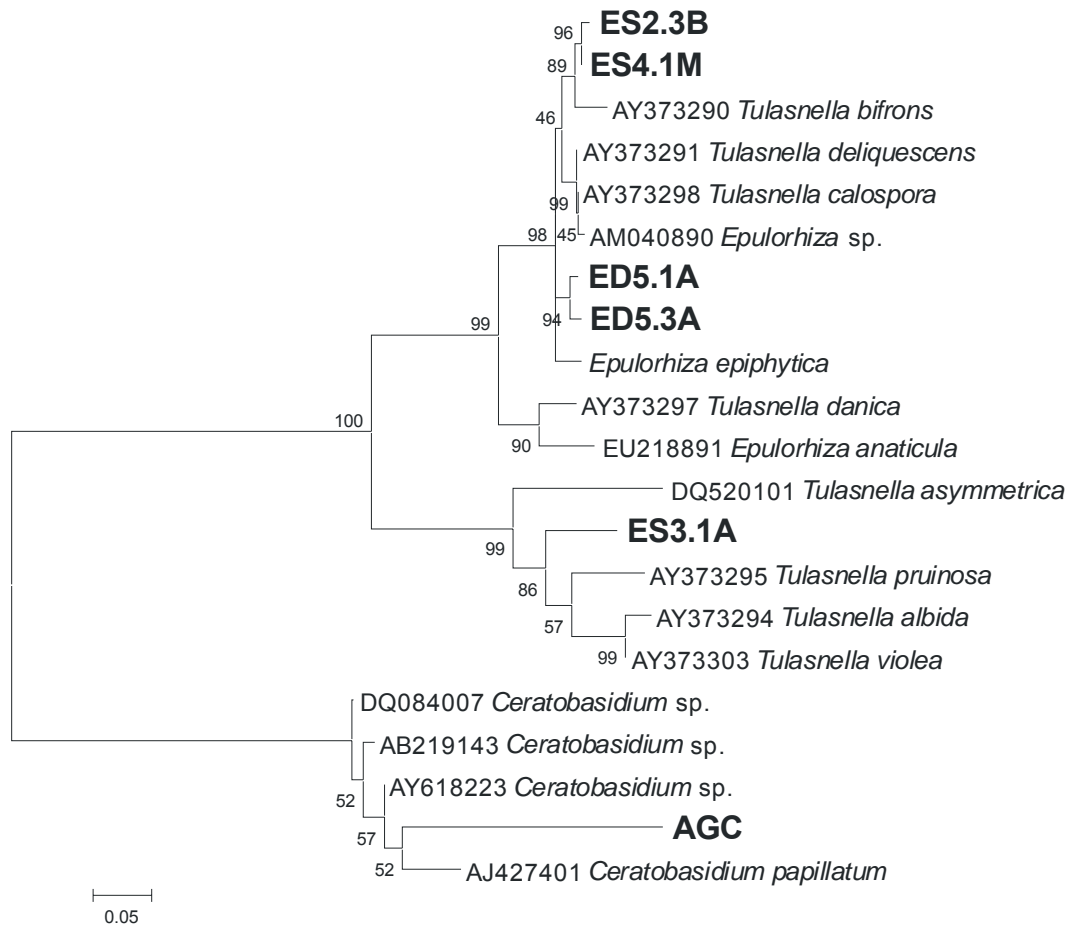


Figura 4: Agrupamento dos isolados de fungos rizoctonióides estudados e fungos *Tulasnella* spp., *Epulorhiza* spp. e *Ceratobasidium* spp., com base na seqüência da região ITS do rDNA, utilizando-se o método Neighbor-Joining, o algoritmo Kimura 2-Parâmetros, bootstrap calculado com 5000 repetições e excluindo-se gaps e dados perdidos. Os códigos em destaque no agrupamento correspondem aos isolados estudados conforme apresentado na Tabela 1.

IV. DISCUSSÃO

A composição de ácidos graxos foi, pela primeira vez, utilizada para caracterização de fungos *Epulorhiza* spp. micorrízicos de orquídeas. Com base nessa análise foi possível distinguir os diferentes gêneros e espécies de fungos estudados (Figura 1 e 2), como já observado para detectar variações entre diferentes populações e variedades de uma mesma espécie de fungos rizoctonióides fitopatogênicos (Baird et al., 2000; Priyatmojo et al., 2002a; Lanoiselet et al., 2005; Sharon et al., 2006).

A presença e, ou a ausência de alguns ácidos graxos possibilitaram a distinção de alguns grupos de fungos rizoctonióides. Os ácidos graxos 18:1 ω 9c estavam presentes apenas em isolados *Epulorhiza* spp., enquanto 16:0 2OH apenas em *Ceratorhiza* sp. AGC, e os ácidos graxos 17:00 e 20:00 apenas em *Epulorhiza* sp.2 (Tabela 2), sugerindo a utilização desses ácidos graxos como marcadores, como já vem sendo utilizados para certos grupos de microrganismos para análise da variação na comunidade microbiana em amostras de solo (Ibekwe e Kennedy, 1999; Steger et al., 2003). Contudo, mais estudos são necessários para confirmar a utilização dos ácidos graxos 18:1 ω 9c, 16:0 2OH, 17:00 e 20:00 como marcadores para os fungos rizoctonióides de orquídeas.

A proporção dos demais ácidos graxos também deve ser levado em consideração pois alguns isolados, mesmo apresentando diferenças quanto à presença ou ausência de um determinado ácido graxo, podem ser agrupados após a análise da composição total dos ácidos graxos. O isolado ED5.3A, foi o único a apresentar o ácido graxo 18:3 ω 6c (6,9,12) e foi agrupado ao ED5.1A, também obtido de *E. denticulatum* (Tabela 2; Figuras 1 e 2). Um outro exemplo são os três isolados obtidos de *E. secundum* que apresentaram proporções de sum in feature 3 iguais, mas eles representaram duas espécies diferentes que foram separadas na análise final da composição de ácidos graxos (Figuras 1 e 2).

Houve concordância entre os agrupamentos obtidos a partir da análise da composição de ácidos graxos e os agrupamentos gerados pela análise da região ITS (Figuras 1, 2 e 3). Isso reforça a utilização do método MIDI de extração, detecção e quantificação de ácidos graxos na caracterização de fungos e na identificação das espécies de rizoctonióides fitopatogênicos (Lanoiselet et al., 2005; Sharon et al., 2006). Observou-se variabilidade na composição de ácidos graxos entre os isolados de *Epulorhiza* sp.1, assim como entre os isolados de *E. denticulatum* (Figuras 1 e 2), o que pode ser consequência de variações intra-específicas, justificando sua aplicação na análise de variabilidade dentro de populações, como sugerido por Sharon et al. (2006).

Apesar da distância Euclidiana Padronizada ser mais utilizada para analisar quantitativamente os dados da composição de ácidos graxos (Baird et al., 2000; Priyatmojo et al., 2002a; Lanoiselet et al., 2005), verificou-se que ao se comparar os agrupamentos gerados utilizando-se os diferentes métodos para cálculo de distâncias, a distância de Mahalanobis aumenta a resolução da análise, já que a distância Euclidiana Padronizada não foi capaz de distinguir entre os isolados de *E. denticulatum* e os isolados de *Epulorhiza* sp.1, simbiontes de *E. secundum* (Figura 1, Tabela 1). Possivelmente, isso ocorre pelo fato de o cálculo da distância de Mahalanobis considerar as variâncias e covariâncias residuais, corrigindo distorções contidas na análise (Cruz e Regazzi, 1997; Cruz, 2008), que se devem à existência de alta correlação entre os caracteres avaliados, ou seja, os ácidos graxos detectados. Diferentes técnicas multivariadas devem ser utilizadas durante a análise de dados, o que possibilita a validação dos resultados observados.

A análise da composição de ácidos graxos é uma ferramenta promissora na caracterização de isolados de fungos micorrízicos de orquídea, pois o método MIDI mostrou-se sensível às variações existentes entre fungos de uma mesma espécie e de diferentes espécies e gêneros de fungos rizoctonióides (Figuras 2 e 3), o que também foi observado para outros fungos rizoctonióides, utilizando essa técnica (Baird et al., 2000; Lanoiselet et al., 2005; Sharon et al., 2006).

O armazenamento dos perfis de ácidos graxos dos fungos estudados no Sistema de Identificação MIDI pode contribuir para a construção de uma biblioteca de fungos rizotonióides, possibilitando a utilização dessa técnica na caracterização, identificação e análise da diversidade de fungos micorrízicos de orquídea.

V. CONCLUSÕES

1. A análise da composição de ácidos graxos permite a distinção das diferentes espécies e dos diferentes gêneros de fungos rizoctonióides.
2. Há uma maior resolução nos dados analisados quando se utiliza a distância de Mahalanobis para agrupamento dos isolados com base na composição de ácidos graxos, o que coincide com o agrupamento baseado na análise da seqüência da região ITS.
3. A análise da composição de ácidos graxos é uma ferramenta útil na caracterização, identificação e análise da diversidade de fungos micorrízicos de orquídea.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Research**, v.25, p.3389–3402, 1997.
- Arditti, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York, John Wiley & Sons, 1992. 691p.
- Baird, R.E.; Gitaitis, R.D.; Carling, D.E.; Baird, S.M.; Alt, P.J.; Mullinix, B.G. Determination of whole-cell fatty acid profiles for the characterization and differentiation of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-4 and AG-7. **Plant Disease**, 84:785-788, 2000.
- Bonnardeaux, Y.; Brundrett, M.; Batty, A.; Dixon, K.; Koch, J.; Sivasithamparam, K. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. **Mycological Research**, v.111, p.51–61, 2007.
- Cruz, C.D. **Programa Genes: Diversidade genética**. Viçosa, Editora UFV, 2008. 278p.
- Cruz, C.D.; Regazzi, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. Viçosa, Editora UFV, 1997. 394p.
- Currah, R.S.; Zelmer, C.D. A key and notes for the genera of fungi with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. **Reports of the Tottori Mycological Institute**, v.30; p.43-59, 1992.
- Currah, R.S.; Zettler, L.W., McInnis, T.M. *Epulorhiza inquilina* sp. nov. from *Platanthera* (Orchidaceae) and a key to *Epulorhiza* species. **Mycotaxon**, v.61; p.338-342, 1997.
- Dearnaley, J.D.W. Further advances in orchid mycorrhizal research. **Mycorrhiza**, v.17, p.475–486, 2007.
- García, V.G.; Onco, M.A.P.; Susan, V.R. Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.4, p.55-79, 2006.
- Horton, T.R., Bruns, T.D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. **Molecular Ecology**, v.10, p.1855-1871, 2001.
- Ibekwe, A.M.; Kennedy, A.C. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as a tool to investigate community structure of two agricultural soils. **Plant and Soil**, v.206, p.151-161, 1999.
- Johnk, J.S.; Jones, R.K. Determination of whole-cell fatty acids in isolates of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. **Phytopathology**, v.82, p.68-72, 1992.
- Johnk, J.S.; Jones, R.K. Determination of populations of AG-2-2 of *Rhizoctonia solani* by analysis of cellular fatty acids. **Phytopathology**, v.83, p.278-283, 1993.
- Johnk, J.S.; Jones, R.K.; Shew, H.D.; Carling, D.E. Characterization of populations of *Rhizoctonia solani* AG-3 from Potato and Tobacco. **Phytopathology**, v.83, p.854-858, 1993.

- Johnk, J.S.; Jones, R.K. Comparison of whole-cell fatty acid composition in intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* AG-1. **Phytopathology**, v.84, p.271-275, 1994.
- Kristiansen, K.A.; Freudenstein, J.V.; Rasmussen, F.N.; Rasmussen, H.N. Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.33, p.251–258, 2004.
- Lanoiselet, V.M.; Cother, E.J.; Cother, N.J.; Ash, G.J.; Harper, J.D.I. Comparison of two total cellular fatty acid analysis protocols to differentiate *Rhizoctonia oryzae* and *R. oryzae-sativae*. **Mycologia**, v.97, p.77–83, 2005.
- McCormick, M.K.; Whigham, D.F.; O'Neill, J. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. **New Phytologist**, v.163, p.425–438, 2004.
- Otero, J.T.; Ackerman, J.D.; BAYMAN, P.. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. **American Journal of Botany**, v.89, p.1852–1858, 2002.
- Otero, J.T.; Flanagan, N.; Herre, E.A.; Ackerman, J.D.; Bayman, P. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v.94, n.12, p.1944–1950, 2007.
- Pereira, M.C.; Kasuya, M.C.M.; Pereira, O.L.; Costa, M.D.; Rocha, R.B. Diversidade de fungos micorrízicos *Epulorhiza* spp. isolados de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.1187-1197, 2009.
- Pereira, O.L. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécies de orquídeas neotropicais**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2001. 48p. (Dissertação de Mestrado)
- Peterson, R.L., Massicotte, H.B., Melville, L.H. **Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology**. NRC Research Press, 2004. 173p.
- Priyatmojo, A.; Yamauchi, R.; Carling, D.E.; Kageyama, K.; Hyakumachi, M. Differentiation of Three Varieties of *Rhizoctonia circinata*; var. *circinata*, var. *oryzae* and var. *zeae* on the Basis of Cellular Fatty Acid Composition. **Journal of Phytopathology**, v.150, p.1-5, 2002a.
- Priyatmojo, A.; Yamauchi, R.; Kageyama, K.; Hyakumachi, M. Whole-Cell Fatty Acid Composition to Characterize and Differentiate Isolates of *Rhizoctonia* Species Associated with Turfgrass Diseases in Japan. **Journal of Genetic of Plant Pathology**, v.68, p.1-7, 2002b.
- Prosser, J.I. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. **Plant and Soil**, 244:9–17, 2002.
- Rasmussen, H.N. **Terrestrial orchid: from seed to mycotrophic plant**. Cambridge University Press, 1995. 444p.
- Rasmussen, H. N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza, **Plant and Soil**, v.244; p.149-163, 2002.

- Selosse, M.A.; Weiß, M.; Jany, J.L.; Tillier, A. Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. **Molecular Ecology**, v.11, p.1831–1844, 2002.
- Shan, X.C.; Liew, E.C.; Weatherhead, M.A.; Hodkiss, L.J. Characterization and taxonomy placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. **Mycologia**, v.94, n. 2, p.230-239, 2002.
- Sharon, M.; Kuninaga, S.; Hyakumachi, M.; Sneh, B. The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, v. 47, p.299-316, 2006.
- Sharon, M.; Kuninaga, S.; Hyakumachi, M.; Naito, S.; Sneh, B. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, v.49, n.2, p.93-114, 2008.
- Shefferson, R.P.; Taylor, D.L.; Weiß, M.; Garnica, S.; et al. The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. **Evolution**, v.61-6, p.1380–1390, 2007.
- Shefferson, R.P.; Kull, T.; Tali, K. Mycorrhizal interactions of orchids colonizing Estonian mine tailings hills. **American Journal of Botany**, v.95, n.2, p.156–164, 2008.
- Smith, S.E.; Read, D.J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 2.ed. Academic Press, 1997. 605p.
- Stalpers, J.A.; Andersen, T.F. A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia* S.L. In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G. (Eds), ***Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control**. Kluwer Academic Publishers, 1996. p.49-63.
- Steger, K.; Jarvis, A.; Smars, S.; Sundh, I. Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost. **Journal of Microbiological Methods**, v.55, n.2, p.371-382, 2003.
- Suárez, J.P.; Weiß, M.; Abele, A.; Garnica, S.; Oberwinkler, F.; Kottke, I. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. **Mycological Research**, v.110, p.1257–1270, 2006.
- Suárez, J.P.; Weiß, M.; Abele, A.; Oberwinkler, F.; Kottke, I. Members of Sebacinales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. **Mycological Research**, v.7, p.75–85, 2008.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.

- Taylor, D.L.; Bruns, T.D. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza macula* and *C. mertensiana*. **Molecular Ecology**, v.8, p.1719-1732, 1999.
- Taylor, D.L.; Bruns, T.D.; Leake, D.J.; Read, D.J. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: van der Heijden, M.G.A., Sanders, I. **Mycorrhizal Ecology**. Springer-Verlag, 2002. p.375-414.
- Weiss, M.; Selosse, M.A.; Rexer, K.H.; Urban, A. Oberwinkler, F. *Sebacinales*: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. **Mycological Research**, v.108, p.1003–1010, 2004.

CONCLUSÕES GERAIS

1. As características morfológicas permitem a distinção entre os gêneros de fungos rizoctonióides *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* e *Rhizoctonia*, mas não permitem a distinção entre os gêneros *Epulorhiza* e *Opadorhiza*.
2. Fungos do gênero *Tulasnella/Epulorhiza* são os principais simbiontes de *E. secundum* nas regiões de campo de altitude do PESB, mas fungos do gênero *Sebacina/Opadorhiza* também podem formar associação micorrízica com essa espécie de orquídea.
3. Há grande variabilidade intra-específica entre os isolados obtidos de diferentes populações de *E. secundum*, mas essa variabilidade é baixa entre os isolados obtidos de uma mesma população.
4. Pelo menos três haplotipos de fungos do gênero *Epulorhiza* associam-se com *E. secundum* no PESB.
5. Há uma espécie de *Epulorhiza* sp. bem distribuída nos campos de altitude do PESB, a qual pode ser a principal responsável em garantir a distribuição e a completa ocorrência do ciclo de vida de *E. secundum* nessa região.
6. Indivíduos adultos de orquídeas do gênero *Epidendrum* associam-se, preferencialmente, a fungos do gênero *Tulasnella*, embora possam se associar a fungos do gênero *Sebacina*.
7. Os isolados *Tulasnella* spp. apresentam maior variabilidade na seqüência de nucleotídeos da região ITS do que os isolados *Sebacina* spp.
8. Orquídeas epífitas do gênero *Epidendrum* não compartilham espécies de fungos micorrízicos com as orquídeas terrestres desse gênero.
9. A análise da composição de ácidos graxos, utilizando-se a distância de Mahalanobis e o método UPGMA, permite a distinção das diferentes espécies e dos diferentes gêneros de fungos rizoctonióides, sendo uma ferramenta útil na caracterização e identificação de fungos micorrízicos de orquídea.