

OLINTO LIPARINI PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE FUNGOS
MICORRÍZICOS DE SETE ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS
NEOTROPICAIS**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de “Magister
Scientiae”

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
NOVEMBRO DE 2001

OLINTO LIPARINI PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE FUNGOS
MICORRÍZICOS DE SETE ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS
NEOTROPICAIS**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de “Magister
Scientiae”

APROVADA: 29 de novembro de 2001

Prof^ª . Elza Fernandes de Araújo
(Conselheira)

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Conselheiro)

Prof. Robert Weingart Barreto

Prof^ª . Marisa Vieira de Queiroz

Prof^ª . Maria Catarina Megumi Kasuya
(Orientadora)

BIOGRAFIA

OLINTO LIPARINI PEREIRA, filho de Olinto Soares Pereira e Vitória Luíza Liparini Pereira, nasceu na cidade de São Paulo-SP, no dia 26 de janeiro de 1975.

Iniciou os estudos básicos na cidade de Volta Redonda-RJ, terminando-os na cidade de Belo Horizonte-MG.

No ano de 1994 iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em 1999.

Em agosto de 1999 iniciou o programa de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa-MG, concentrando seus estudos na área de Microbiologia do Solo.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Histórico.....	2
2.2. Germinação das sementes de orquídeas.....	2
2.3. Taxonomia dos fungos micorrízicos de orquídeas.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Espécies de orquídeas estudadas.....	9
3.2. Isolamento.....	10
3.3. Caracterização morfológica.....	10
3.4. Indução de fase sexuada.....	11
3.5. Anastomose de hifas.....	12
3.6. Caracterização molecular.....	12
3.6.1. Extração de DNA total.....	12
3.6.2. Amplificação da região ITS do rDNA.....	13
3.6.3. Análise por PCR-RFLP da região ITS do rDNA.....	13
3.6.4. Análise por RAPD.....	14
3.7. Análise dos dados.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1. Caracterização morfológica.....	16

4.2. Caracterização molecular.....	28
4.3. Análise de correlação e de coincidência entre a caracterização morfológica e a caracterização molecular.....	37
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

RESUMO

PEREIRA, Olinto Liparini, M.S. Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2001. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécies de orquídeas neotropicais.** Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Conselheiros: Arnaldo Chaer Borges e Elza Fernandes de Araújo.

Sete fungos micorrízicos foram isolados de “pelotons” das orquídeas *Epidendrum rigidum*, *Isochillus lineares*, *Maxillaria marginata*, *Oncidium flexuosum*, *Oncidium varicosum*, *Oceoclades maculata* e *Polystachia concreta*. Todas essas orquídeas são nativas do Brasil, sendo *O. maculata* de habitat terrestre e as demais epífitas. Três isolados fúngicos foram classificados como *Epulorhiza* e quatro como *Ceratorhiza*, ambos pertencentes ao grupo Mycelia sterilia, basidiomicetos similares a *Rhizoctonia*. O fungo isolado de *O. maculata* foi classificado como sendo *E. repens* e os dois outros isolados classificados como *Epulorhiza* são idênticos entre si e diferenciaram-se das espécies já relatadas para esse gênero, podendo ser considerados como uma nova espécie. Dois isolados classificados como *Ceratorhiza* são idênticos e provavelmente pertencentes a uma mesma espécie, enquanto os outros dois diferem desses e também entre eles. Assim, esses isolados parecem pertencer a três espécies distintas de *Ceratorhiza*. Os agrupamentos efetuados após a caracterização morfológica e pelas técnicas moleculares de PCR-RFLP da região ITS do rDNA e de RAPD, foram condizentes. Este é o primeiro relato taxonômico da caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos isolados de orquídeas brasileiras.

ABSTRACT

PEREIRA, Olinto Liparini, M.S. Universidade Federal de Viçosa, november, 2001. **Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi from seven Neotropical orchid species.** Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Committee Members: Arnaldo Chaer Borges and Elza Fernandes de Araújo.

Seven mycorrhizal fungi were isolated from pelotons of the orchids *Epidendrum rigidum*, *Isochillus lineares*, *Maxillaria marginata*, *Oncidium flexuosum*, *Oncidium varicosum*, *Oceoclades maculata* and *Polystachia concreta*. All of these species are Brazilian native orchids. Only *O. maculata* is a terrestrial species while the others are all epiphytic. These isolates were morphologically classified as *Epulorhiza* or *Ceratorhiza* (Mycelia sterilia: anamorphic basidiomycetes) known as *Rhizoctonia*-like. The isolate from *O. maculata* was classified as *E. repens* and the two others isolates belonging to this genus were morphologically identical but distinct from known species of *Epulorhiza*, and are describing as representing a new species. Two isolates classified as *Ceratorhiza* are identical and may belong to the same species, while two others appear to belong to two different taxa. So, they can belong to three distinct species of *Ceratorhiza*. The results of PCR-RFLP from ITS region of rDNA and RAPD analysis are in accordance to the morphological taxonomy. This is the first report of the morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from Brazilian orchids.

1. INTRODUÇÃO

A família das orquidáceas é reconhecidamente uma das maiores famílias do reino vegetal, com mais de 30 mil espécies já registradas em todo o mundo, entre terrestres, epífitas e rupícolas.

O Brasil possui uma grande biodiversidade dessas espécies, principalmente das epífitas. No entanto, o desbravamento de áreas como as do cerrado e a derrubada de matas, como a mata atlântica e a floresta amazônica, têm levado à extinção de algumas espécies. A grande maioria dessas espécies encontra-se em diversas listas de prioridade máxima de conservação, por possuírem baixo sucesso reprodutivo ou habitat restrito.

No aspecto comercial, as orquídeas são reconhecidamente uma das plantas ornamentais que alcançam altos valores no mercado interno e externo. No entanto, muitas das espécies com potencial para a comercialização, ou aquelas que necessitam ser reintroduzidas, não se multiplicam pelos métodos convencionais de cultura de tecidos quando inexistente a associação com fungos micorrízicos, o que ocorre obrigatoriamente na natureza.

Diante do exposto, o conhecimento das estratégias reprodutivas das orquídeas, bem como a caracterização dos fungos micorrízicos associados, é de grande importância para a reintrodução, conservação e manejo dessa espécie vegetal. Assim, os objetivos deste trabalho foram de caracterizar a morfologia e analisar a diversidade genética de fungos micorrízicos isolados de sete espécies de orquídeas brasileiras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

A relação funcional entre a nutrição em orquídeas e a presença de fungos micorrízicos foi sugerida por Frank em 1891 (Andersen & Rasmussen, 1996) que, com base em sua experiência com outros tipos de micorrizas, assumiu tratar-se de uma associação mutualista onde o endófito seria muito difícil, ou mesmo impossível, de ser cultivado fora da raiz, em razão dos seus requerimentos nutricionais específicos.

No trabalho que registra o primeiro isolamento de fungos micorrízicos de orquídeas e a síntese *in vitro* de plântulas com micorrizas incluiu-se a descrição desses fungos como membros do gênero *Rhizoctonia*, sendo três as espécies: *R. repens*, *R. mucoroides* e *R. lanuginosa* (Andersen & Rasmussen, 1996). Outros anamorfos micorrízicos em orquídeas foram em seguida descritos (Andersen & Rasmussen, 1996), bem como teleomorfos de *Rhizoctonia* associados às orquídeas australianas (Warcup & Talbot, 1967; 1971; 1980) e norte americanas (Currah *et al.*, 1987; 1989; 1997; Currah & Zelmer, 1992; Zelmer & Currah, 1995). No Japão, fungos do gênero *Armillaria* vêm sendo descritos como micorrízicos de orquídeas (Terashita, 1982 e 1985; Terashita & Chuman, 1987).

2.2. Germinação das sementes de orquídeas

A associação micorrízica em orquídeas é caracterizada pela formação de uma estrutura fúngica adensada, denominada de “peloton” ou novelo (Warcup & Talbot, 1967). Entre a germinação da semente e o estabelecimento da nutrição autotrófica da plântula, a orquídea passa por uma etapa heterotrófica em que é

chamada de protocórmio. O protocórmio utiliza-se dos produtos da digestão enzimática do “peloton” para a nutrição e o acréscimo de biomassa até o estágio autotrófico e o estabelecimento da planta adulta, fenômeno esse denominado de micoheterotrofismo (Harvais & Hadley, 1967; Arditti, 1979; Rasmussen, 1995).

Em sementes imaturas de orquídeas, o amido é a principal fonte de carbono. No entanto, com a maturação, esse amido é substituído por proteínas, lipídeos e fontes de reserva complexas, como a celulose e a hemicelulose (Harvais, 1974). O acréscimo de compostos protéicos implica em dormência da semente de algumas das espécies do gênero *Disperis*, *Disa* e *Huttonaea* (Manning & van Staden, 1987).

A dormência em sementes de orquídeas é uma característica evolutivamente importante, uma vez que a quantidade de reservas é mínima, ou seja, suficiente apenas para manter o nível basal de respiração até o seu contato com o micossimbionte (Hadley, 1982). Dessa forma, por não possuir reserva energética suficiente para remobilização dos lipídeos, a semente não germina sem que haja uma fonte externa de açúcar, como a glicose ou sacarose. Na natureza a planta obtém essa fonte externa de açúcar graças à associação simbiótica que viabiliza energeticamente a germinação. Isto leva a uma dependência do hospedeiro em relação ao fungo micorrízico (Hadley, 1982).

2.3. Taxonomia dos fungos micorrízicos de orquídeas

Os fungos que formam as micorrizas em orquídeas são, usualmente, pertencentes a espécies de basidiomicetos que não apresentam conidiogênese na fase assexuada (Mycelia Sterilia) e, no estágio anamórfico são classificados como *Rhizoctonia* spp. ou gêneros afins. No entanto, há relatos de associações com outros grupos de fungos, como *Armillaria* spp. (Cha, 1996), Aphyllophorales (Umata, 1995) e *Lentinula* spp. (Umata, 1998).

O gênero *Rhizoctonia* foi descrito em 1815 por De Candolle (Ogoshi, 1996) sendo a espécie tipo, *R. crocorum*. No entanto, *R. solani* é a mais conhecida

espécie deste gênero, por ser um patógeno cosmopolita e de extrema importância agrícola e florestal (Ogoshi, 1996).

O gênero *Rhizoctonia* contém tanto espécies fitopatogênicas, como também micorrízicas. Fungos desse gênero formam micorrizas principalmente na família Orchidaceae, mas tem sido observados também em associação com *Gentiana* spp. (Gentianaceae) e briófitas do gênero *Aneura* (Andersen & Rasmussen, 1996). Há também relatos desses fungos com associação endofíticas em espécies florestais, como *Pinus* spp. (Hietala & Sen, 1996; Sen *et al.*, 1999).

As espécies de *Rhizoctonia* foram reagrupadas em diferentes gêneros, com base na conexão anamorfo-teleomorfo e na ultraestrutura do septo (Moore, 1987). Esses anamorfos foram incluídos em quatro grupos distintos do reino Fungi, a saber: Ascomycetes, Ustomycetes, Homobasidiomycetes e Heterobasidiomycetes. Foram reconhecidos os gêneros: *Moniliopsis*, *Ceratorhiza*, *Epulorhiza*, *Ascorhizoctonia* e *Rhizoctonia* (Moore, 1987) e o gênero anamorfo *Opadorhiza* T. F. Andersen & R. T. Moore (Moore, 1996), para acomodar isolados com fase sexuada em *Sebacina*.

A caracterização e identificação de *Rhizoctonia* spp. é também realizada pelo método que envolve a análise de anastomose de hifas com isolados padrões, conhecidos como grupos de anastomoses ou AGs (Carling, 1996). Segundo esse método, o isolado em estudo é colocado para crescer junto a isolados padrões, sendo a reação de anastomose observada na zona de confluência das colônias e categorizada pela análise e interpretação do tipo de reação citológica. O pareamento de isolados pode ser feito por diversas técnicas, sendo mais comuns pareamentos em placa de Petri com ágar-água, papel celofane sobre ágar e crescimento em lâmina (Carling, 1996). Para a categorização do tipo de reação citológica tem sido utilizada a descrita por Carling *et al.* (1988).

O conceito de grupos de anastomose possibilitou um melhor entendimento da diversidade genética do grupo e se constituiu em uma importante ferramenta, de uso prático, no estudo do complexo *Rhizoctonia* (Carling *et al.*, 1994; Carling 1996).

Até o momento, os isolados multinucleados de *R. solani* (*T. cucumeris*) estão agrupados em 12 AGs e os binucleados de *Ceratorhiza* spp. (*Ceratobasidium* spp.) em 21 AGs (Carling, 1996).

Os gêneros mais comuns de fungos micorrízicos isolados de orquídeas, principalmente de espécies terrestres do Hemisfério Norte, são: *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* e *Moniliopsis* (Currah & Zelmer, 1992). Não há registro do gênero *Ascorhizoctonia* ou de *Chrysorhiza* (anamorfo de *Waitea*) como micorrízico em orquídeas (Andersen & Rasmussen, 1996).

A taxonomia de fungos micorrízicos de orquídeas é dificultada não só pela característica de não produzirem conídios na fase assexuada, mas também pela dificuldade de indução da fase sexuada (Currah & Zelmer, 1992). Em estudo sobre a morfologia de hifas de *Rhizoctonia* foram demonstrados os problemas relativos ao uso de características morfológicas tradicionais para a delimitação de espécies dentro desse gênero (Andersen, 1990) e a taxonomia proposta por Moore (1987) foi acatada como a melhor para o estabelecimento de características confiáveis da anamorfa. Até 1994 havia 119 espécies e subespécies de *Rhizoctonia* descritas (Andersen & Stalpers, 1994). Entretanto, esses autores verificaram que, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, 48 espécies não eram válidas (nomina nuda e provisórios, 30 espécies foram excluídas após exame da descrição e tipo, 9 consideradas de classificação duvidosa, entre essas *R. repens* e *R. goodyera-repentis*, 7 espécies foram consideradas sinonímias de *R. crocorum*, 17 de *R. solani* e 1 de *R. oryzae-sativae*, permanecendo somente 7 espécies para as quais a classificação foi considerada correta.

O estudo da taxonomia de fungos micorrízicos em orquídeas durante um longo período ficou limitado às tentativas de indução da fase sexuada ou ao uso da microscopia eletrônica de transmissão. Os estudos que relacionam as características químicas, morfológicas e nucleares com a ultraestrutura em espécies endofíticas afins a *Rhizoctonia* de orquídeas selvagens na Itália (Marchisio *et al.*, 1985), complementados pelos trabalhos de Moore (1987), constituíram-se em base para a proposição de chave de classificação proposta por Currah & Zelmer (1992). Utilizando-se essa chave dicotômica foi possível a

separação dos gêneros de fungos micorrízicos mais comuns de orquídeas: *Epulorhiza*, *Ceratorhiza* e *Moniliopsis*, baseando-se na condição nuclear e em características morfológicas culturais. As características culturais do micélio, as hifas ou células monilióides que permaneçam estáveis em meios de cultura específicos (BDA e CMA) podem ser consideradas para a validação de novas espécies nesse grupo (Zelmer & Currah, 1995). Posteriormente, Currah *et al.* (1997) propuseram uma chave para as espécies do gênero *Epulorhiza*. Essas duas chaves, facilitaram bastante os estudos de micorrizas em orquídeas.

A distinção entre os gêneros *Epulorhiza* e *Ceratorhiza* pode ser feita com o uso de um simples teste enzimático, uma vez que a grande maioria das espécies do gênero *Ceratorhiza* (com exceção somente de *C. pernacatena*) produz polifenol-oxidades em meios de cultivo acrescido de ácido tânico ou gálico, enquanto espécies de *Epulorhiza* mostram-se negativas para essa enzima (Zelmer *et al.*, 1996).

Os estudos taxonômicos de fungos micorrízicos em Orchidacea têm sido limitado pelas dificuldades inerentes a taxonomia da fase imperfeita desses fungos, sendo as sete espécies reconhecidamente aceitas (Quadro 1) consideradas insuficientes para englobar a provável biodiversidade desses fungos (Currah & Zelmer, 1992; Zelmer & Currah, 1995; Currah *et al.*, 1997).

Quadro 1 – Táxons aceitos do grupo *Rhizoctonia* e *Rhizoctonia*-like, associados à espécies de orquídeas¹.

Fungo micorrízico	Espécie Hospedeira
<i>Ceratorhiza pernacatena</i> Zelmer & Currah	<i>Platanthera praeclara</i>
<i>Moniliopsis anomala</i> Burgeff & Currah	<i>Coeloglossum viride</i>
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	<i>Dactylorhiza purpurella</i> , <i>Spirantes</i> sp., <i>Vanilla</i> sp.,
<i>Epulorhiza albertensis</i> Currah & Zelmer	<i>Platanthera orbiculata</i>
<i>E. anaticula</i> (Currah) Currah	<i>Platanthera obtusata</i>
<i>E. calendulina</i> Zelmer & Currah	<i>Platanthera</i> , <i>Calypso</i> , <i>Coeloglossum</i> , <i>Amerorchis rotundifolia</i>
<i>E. repens</i> (Bernard) Moore	<i>Goodyera repens</i> , <i>Dactylorhiza</i> , <i>Diuris</i> , <i>Acianthus</i> , <i>Caladenia</i> , <i>Thelymitra</i> , <i>Lyperanthus</i> , <i>Dendrobium</i> , <i>Platanthera</i> , <i>Coeloglossum</i>
<i>E. inquilina</i> Currah, Zettler & McInnis	<i>Platanthera clavellata</i> , <i>P. cristata</i> , <i>P. integrilabia</i>

¹Adaptado de: Warcup & Talbolt (1967), Warcup (1981), Currah & Zelmer (1992), Zelmer & Currah (1995), Andersen & Rasmussen, (1996), e Currah *et al.*(1997)

Nas últimas duas décadas os marcadores moleculares derivados da análise direta do polimorfismo das seqüências de DNA têm sido utilizados como ferramentas para a caracterização em *Rhizoctonia* (Liu *et al.*, 1992; 1993; 1995; Liu and Sinclair, 1993, Vilgalys & Cubeta, 1994; Cubeta & Vilgalys, 1997), bem como para estudos de taxonomia e filogenia desse fungo (Vilgalys & Cubeta, 1994).

A técnica de PCR-RFLP da região ITS do rDNA tem sido utilizada em estudos taxonômicos e ecológicos e se mostrou como uma ferramenta importante para a distinção e o agrupamento de fungos no nível de espécie (White *et al.*, 1990). A região ITS (Internal Transcribed Spacer) é a que tem sido mais utilizada em estudos de taxonomia e filogenia (White *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1993; Vilgalys & Cubeta, 1994).

A variação genética, que dá suporte ao conceito de AGs de *R. solani*, vem sendo constatada por estudos que utilizam regiões do genoma evolutivamente conservados, como o rDNA (Liu *et al.*, 1992; 1993; 1995; Liu and Sinclair, 1993; Cubeta & Vilgalys, 1997). Evidências baseadas na técnica de RFLP do rDNA indicam que diferentes AGs são geneticamente divergentes em *R. solani* (Vilgalys & Gonzales, 1990). A mesma técnica confere suporte ao conceito de AGs em rizoctonias binucleadas (Cubeta *et al.*, 1991).

A técnica de RAPD baseia-se na reação de amplificação de regiões aleatórias do genoma, utilizando-se oligonucleotídeos de seqüência aleatória como iniciadores, e tem sido utilizada para a determinação da diversidade genética em *Rhizoctonia* (Liu *et al.*, 1992; Duncan *et al.*, 1993).

Os marcadores RAPD têm sido uma das técnicas utilizadas em análises de indivíduos em uma população e utilizada com sucesso para análises de variação genética entre os principais AGs em *R. solani* (Duncan *et al.*, 1993) e também com rizoctonias micorrízicas de orquídeas (Tham *et al.*, 2001).

A anastomose de hifas é uma característica útil no processo de caracterização de rizoctonias binucleadas, porém alguns dos isolados não apresentam anastomose com eles mesmos ou com nenhum outro, impedindo que estes sejam agrupados no conceito de AG (Carling, 1996). Muitos destes taxa são

também isolados do solo, sem informação sobre possíveis hospedeiros, o que limita o uso de isolados testes no processo de caracterização. No Brasil, a caracterização de rizoctonias binucleadas pelo método de anastomose de hifas encontra sérias limitações pela inexistência de uma coleção completa de AGs binucleados.

Devido a essas dificuldades, técnicas moleculares como PCR-RFLP da região ITS do rDNA e RAPD são bastante convenientes na caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp. binucleadas (e multinucleadas) uma vez que o agrupamento dos isolados baseado nos padrões de restrição (RFLP) ou amplificação de regiões aleatórias (RAPD) são muitas vezes condizentes com outros métodos de agrupamento em *Rhizoctonia*.

O isolamento, a caracterização e a identificação dos tipos de fungos micorrízicos de orquídeas brasileiras é uma das primeiras etapas para a sua futura utilização em programas de micorrização controlada, visando a reintrodução de espécies ameaçadas de extinção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Associações Micorrízicas e no Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO/UFV, no Laboratório de Patologia Florestal e no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia/UFV.

3.1. Espécies de orquídeas estudadas

As sete espécies de orquídeas selecionadas pela disponibilidade e facilidade de acesso para o trabalho são nativas da Mata Atlântica do Estado de Minas Gerais de áreas nativas remanescentes (Quadro 2). As amostras de raízes saudáveis das orquídeas foram coletadas em habitat nativo, trimestralmente durante o ano de 2000 e transportadas para serem examinadas no laboratório. A identificação das espécies foram feitas no próprio local de coleta ou quando necessário, com o auxílio de herbários depositados no departamento de botânica da UFV. Parte dessas amostras de raízes foram seccionados transversalmente em criomicrotomo (LEICA CM 1850) com espessura de 30 µm para exame em microscópio ótico quanto a presença de “pelotons” nas células corticais e também para o registro fotográfico.

Quadro 2 – Espécies, subtribo, habitat e local de coleta das orquídeas estudadas.

Espécies de orquídeas	Habitat	Local de coleta
<i>Epidendrum rigidum</i> Jacq.	epifítico	Pedra do Anta/MG
<i>Isochillus lineares</i> (Jacq.) R. Br.	epifítico	Carangola/MG
<i>Maxillaria marginata</i> (Lindl.) Fenzl	epifítico	Carangola/MG
<i>Oncidium flexuosum</i> Sims	epifítico	Viçosa/MG
<i>O. varicosum</i> Lindl.	epifítico	Viçosa/MG
<i>Oceoclades maculata</i> (Lindl.) Lindl.	terrestre	Viçosa/MG
<i>Polystachia concreta</i> (Jacq.) Garay & Sweet	epifítico	Pedra do Anta/MG

3.2. Isolamento

Amostras das raízes de orquídeas (Quadro 2) foram lavadas em água de torneira corrente por 10 min, cortadas em fragmentos de 2-3 cm e desinfestadas superficialmente, por imersão em etanol 70% durante 1 min e 5 min em solução de hipoclorito de sódio 2%, seguindo-se de cinco lavagens sucessivas em água destilada estéril. O velame foi retirado com bisturi estéril e as raízes foram maceradas em almofariz de porcelana, previamente autoclavado. O macerado foi espalhado superficialmente em placa de Petri contendo 10 mL de meio BDA, com e sem cloranfenicol (50 mg L^{-1}). As placas foram incubadas a 28°C e observadas diariamente em microscópio óptico invertido para o isolamento direto do micélio crescido a partir do “peloton”, efetuando-se a transferência para outra placa contendo meio Melin-Norkran’s modificado MNM (Marx, 1969). Culturas estoques foram cultivadas em BDA e discos de 9 mm de diâmetro, contendo micélio, foram armazenados em água destilada esterilizada e estocados a 4°C .

3.3. Caracterização morfológica

As características de crescimento da colônia a 26°C foram descritas em meios de cultura. Os isolados foram cultivados em meio BDA (Difco) e foram observadas a coloração (branca, creme ou marrom), aspecto da colônia (grumoso, aveludado ou liso), abundância de micélio aéreo (abundante ou escasso) e feitas a medição do diâmetro das hifas vegetativas. O exame da morfologia e a medição do tamanho das células monilióides foram feitas em micélio desses isolados cultivados em meio de fubá (Currah, 1986; Currah *et al.*, 1987; 1989; 1997; Currah & Zelmer, 1992; Zelmer & Currah, 1995).

Foram também feitas observações da morfologia de células monilióides e caracterização do micélio em meio de aveia (30 g de aveia, 15 g de ágar, 1000 mL de água), extrato de malte ágar (16 g de extrato de malte, 12 g de ágar, 1000 mL de água), ALC (Ágar-Leite de Coco: 10 mL de leite de coco, 15 g de ágar, 1000 mL de água) e ágar-água (1,5% de ágar), conforme descrito por Zelmer & Currah (1995).

A coloração de núcleos foi feita com Giensa-HCl (Sakena, 1961) e a detecção de polifenol-oxidases verificando-se a presença ou ausência de formação de halo em meio extrato de malte, pela adição de ácido tânico, após o crescimento (Davidson *et al.*, 1938). A atividade da celulase pelos fungos foi observada após o crescimento em meio mineral contendo carboximetilcelulose, pela adição de vermelho de Congo. A presença de halo transparente ao redor da colônia era o indicativo da atividade celulolítica (Teather & Wood, 1982).

Para a identificação dos isolados seguiu-se a proposição de Moore (1987) e de Currah & Zelmer (1992), a qual se baseia nas características morfológicas, adotando-se a chave e notas para fungos micorrízicos em orquídeas.

Para confirmação do tipo de parenteossoma e obtenção de imagens da ultraestrutura do septo, discos contendo micélio do fungo cultivado em BDA a 28°C por 7 dias foram fixados em solução de glutaraldeído 3% em tampão cacodilato HCl 0,05M, pH 6,9. O tempo de fixação foi de 12 horas à 4°C. Após 6 lavagens de 10 minutos cada, com tampão cacodilato, os discos foram tratados com solução de tetróxido de ósmio 1%, no mesmo tampão do fixador, por 4 horas à 4°C. A seguir, as amostras foram novamente lavadas em tampão cacodilato conforme descrito, desidratadas em soluções de concentração crescente de etanol e embebidas em resina epoxi Spurr, utilizando-se como contrastante acetato de uranila (por 30 minutos) e citrato de chumbo (por 15 minutos). Os blocos foram preparados para microtomia com navalha de diamante e foram obtidos cortes ultrafinos com 80-100 nanômetros de espessura. Os cortes foram montados e levados à observação em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 operando a 80 kV.

3.4. Indução de fase sexuada

A indução da fase sexuada dos isolados foi conduzida conforme as seguintes técnicas:

a) Infecção de plantas (Flentje, 1956): ramos de eucalipto e plântulas de tomate foram inoculados com uma suspensão micelial, do isolado após o seu crescimento em meio MNM por 10 dias. Para a obtenção do inóculo e a tentativa de infecção das plantas, o micélio foi lavado, fragmentado e distribuído na

superfície foliar dos referidos possíveis hospedeiros e colocadas sob nebulização em câmara de nevoeiro. Durante o período de uma a duas semanas foram feitas observações diárias e foram montadas lâminas para observação das estruturas formadas sobre a superfície foliar.

b) Solo-sobre-cultura (Tu *et al.*, 1969): Os isolados foram cultivados em BDA acrescido de 5% de extrato de levedura. Discos de micélio, de 9 mm de diâmetro foram retirados das bordas das colônias com 3 dias de idade e semeados em BDA acrescido de 0,75% de extrato de levedura, seguindo-se a incubação a 28°C, no escuro. Após cinco dias a tampa da placa foi removida e a cultura coberta com 100g de solo estéril. A placa foi regada com água destilada estéril 2 vezes ao dia, e colocada sob iluminação constante, em câmara de nevoeiro. Durante o período de 40 dias, de dois em dois dias, foram montadas lâminas para observação das estruturas formadas sob a superfície do solo.

3.5. Anastomose de hifas

Foi feita a combinação dos 7 isolados para a verificação do pareamento em placa de Petri de 10 cm de diâmetro contendo 10 mL de ágar-água. Do centro da placa foram retirados 9 cm² do meio (3 x 3 cm) e as culturas utilizadas para o pareamento foram semeadas em extremidades opostas. As placas foram incubadas a 28°C e a região sem o meio de cultura, no centro da placa de Petri, foi monitorada diariamente em microscópio invertido, para a verificação de presença de anastomose de hifas (Carling, 1996).

3.6. Caracterização molecular

3.6.1 Extração de DNA total

A extração de DNA total foi realizada conforme descrito por Speach *et al.* (1982) com algumas modificações. Os isolados foram cultivados em MNM por 15 dias à 28°C. O micélio foi filtrado em gaze e, em seguida, triturado em almofariz de porcelana, com auxílio de um pistilo de porcelana e na presença de nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para um tubo Eppendorf de 1,5 mL e a ele adicionado 400 µL de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 8,0;

NaCl 250 mM; Na₂EDTA 50 mM pH 8,2; SDS 2%). O tubo Eppendorf foi deixado em banho-maria à 70°C por 30 minutos e, em seguida, 350 µL de Acetato de Potássio 5M foram adicionados e o tubo transferido para um recipiente com gelo, por 30 minutos. Logo após, a mistura foi centrifugada por 10 minutos à 8.160 g e o sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorf, seguindo-se a adição de 500 µL de fenol-clorofórmio ao tubo Eppendorf e nova centrifugação a 11.750 g por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo Eppendorf e o processo repetido. Para a precipitação do DNA foi feita a adição de um volume de isopropanol e a incubação do tubo a -20°C por, no mínimo, 2 horas. A seguir, foi feita a centrifugação por 5 minutos a 11.750 g, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado com 50µL de TE (Tris-HCl 10 mM [pH 8,0]; EDTA 1 mM). A essa suspensão foram adicionados 3 µL de RNAase (4µg/mL) e o tubo Eppendorf deixado no banho-maria por 2 horas à 30°C. O DNA total extraído foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

3.6.2 Amplificação da região ITS do rDNA

O par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação da região ITS (ITS1 – 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' / ITS4 – 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') do rDNA (White *et al.*, 1990) foram os sintetizados pela Gibco-BRL / Life Technologies, Inc. Os parâmetros de amplificação foram: 40 ciclos, cada ciclo constituído de um passo de desnaturação a 94°C por 1 min, um passo de anelamento a 52°C por 1 min e um passo de extensão a 72°C por 1 min e 30 s. Após os 40 ciclos, foi feito um passo de extensão final a 72°C por 7 min. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µL, contendo: 10 ng de DNA; 40 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3); KCl 50 mM; MgCl₂ 2 mM; cada dNTP (dGTP, dCTP, dATP, dTTP) 0,1 mM e uma unidade de *Taq* DNA polimerase.

3.6.3 Análise por PCR-RFLP da região ITS do rDNA

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE (Tris-borato 79 mM; EDTA 5 mM) e outra parte, precipitada e utilizada para análise com enzimas de restrição. A precipitação foi feita com adição de acetato de amônio na concentração final de 2,5 M e 2,5 volumes de etanol absoluto. As amostras foram mantidas a -20°C por 12 horas e centrifugadas a 14.000 g por 30 min. O precipitado foi lavado com etanol 70%, ressuspendido em 30 μL de água Milli-Q e digerido com as endonucleases de restrição: *Alu* I (Stratagene), *Hinf* I (Stratagene), *Hae* III (BRL) e *Cla* I (Promega). Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de brometo de etídeo. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta com câmera Polaroid MP4 e digitalizados em um sistema processador de imagens (Eagle Eye II – Stratagene).

3.6.4 Análise por RAPD

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 20 μL contendo 10 ng de DNA total, 40 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador, Tris-HCl 10mM (pH 8,3), KCl 50mM, MgCl_2 2mM, 100 μM de cada um dos desoxinucleosídeos trifosfatados (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) e uma unidade de *Taq* DNA polimerase. Os oligonucleotídeos utilizados foram: OPH 06, OPD 04, OPG 11, OPF 14, OPH 03, OPP 01, OPG 05, OPE 02, OPC 02, OPC 05, OPC 08, OPC 13, OPJ 02, OPW 07, OPH 14, OPW 02, OPE 19. As amplificações foram feitas em termociclador (PTC-100 MJ Research, Inc.) programado para 40 ciclos, sendo que cada ciclo consistiu de uma etapa de desnaturação (60 segundos a 94°C), uma etapa de anelamento (60 segundos a 50°C) e uma etapa de alongamento (90 segundos a 72°C). Após os 40 ciclos e uma etapa extra de alongamento (7 minutos a 72°C) a temperatura foi reduzida a 4°C , mantendo-se assim até que as amostras fossem retiradas. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídeo. Os géis foram digitalizados em um sistema processador de imagens (Eagle Eye II – Stratagene).

3.7. Análise dos dados

Com base nos dados morfológicos, foram feitas análises de agrupamento para os dados qualitativos (cor, micélio aéreo, margem, aspecto, condição nuclear) e detecção de enzimas. O índice de similaridade utilizado foi de coincidência simples, uma vez que para todas as características as variáveis foram transformadas em dados binários. A análise de agrupamento foi feita pelo método UPGMA (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Averages) com o uso do programa Statistica 4.2 para Windows®.

Os dados moleculares foram analisados considerando-se a presença (1) e a ausência (0) de determinadas bandas de DNA, sendo os resultados utilizados para determinação das distâncias genéticas entre os isolados pelo procedimento do complemento aritmético do índice de Jaccard, utilizando-se o programa GENES (Cruz, 1994). As distâncias genéticas foram utilizadas para agrupar os isolados pelo método UPGMA e pelo agrupamento de Tocher com o uso do programa Statistica 4.2 para Windows®. Análises de correlação de Pearson foram feitas utilizando-se do mesmo programa estatístico. O tamanho das bandas separadas por eletroforese em gel de agarose, foram estimados pelo programa KbCalc.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização morfológica

Foram observados “pelotons” nos cortes transversais das raízes de todas as espécies de orquídeas estudadas. Com a exceção de *E. rigidum* (Figura 1A) e *M. marginata* (Figura 1B) as demais espécies apresentavam-se com mais de 50% das células do córtex colonizadas. Os “pelotons” nas raízes de *E. rigidum* apresentavam-se com distribuição restrita e pouco numerosos (colonização de cerca de 2%), concentrando-se em um único lado da raiz e aparentemente intactos não degradados. Nas demais espécies, os “pelotons” apresentavam-se bem distribuídos por todo o córtex da raiz e em todos os estádios de desenvolvimento, aparentemente intactos (Figura 1C e D) ou degradados (Figura 1E e F). Em *O. flexuosum* foi observada a presença de hifas na extensão do velame, fora da região do córtex da raiz. Esse tipo de distribuição é incomum mas tem sido observado em fungos encontrados associados às espécies de orquídeas epífitas tropicais (Richardson *et al.*, 1993).

Os fungos isolados diretamente dos “pelotons” eram todos rizoctonióides, binucleados, pertencentes aos gêneros: *Ceratorhiza* e *Epulorhiza* (Quadro 3). Nenhum fungo multinucleado, pertencente ao gênero *Moniliopsis* foi encontrado. Na etapa de isolamento, após a desinfestação, a maceração e distribuição do macerado sobre meio BDA, o monitoramento diário do crescimento da hifa, com o uso de microscópio ótico invertido, assegurou o isolamento do fungo formador do “peloton” no hospedeiro, uma vez que essa estrutura se desprende da célula vegetal e pode ser observada sobre o meio de cultura. Essa técnica é recomendada para assegurar o isolamento do fungo formador do “peloton” quando da impossibilidade de uso de micromanipulador.

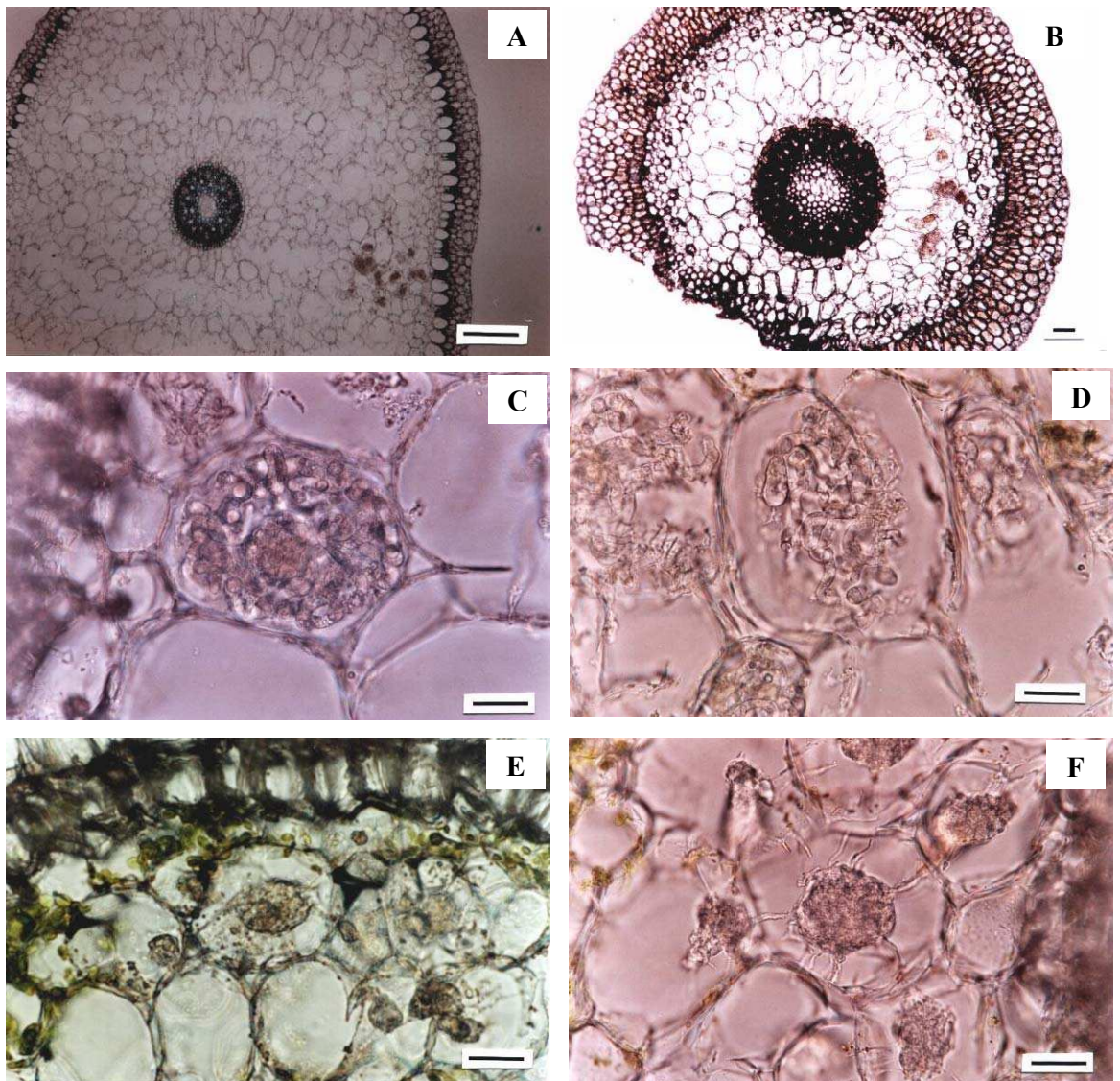


Figura 1. Cortes transversais de raízes de orquídeas mostrando a presença de “pelotons”. Em *E. rigidum* (A), *M. marginata* (B), *O. maculata* (C), *I. lineares* (D), *O. varicosum* (E) e *P. concreta* (F). Escalas: 1 μm (C), 2,5 μm (D, E e F), 10 μm (A e B).

Quadro 3 – Código, hospedeiro e identificação preliminar dos 7 isolados de fungos micorrízicos das orquídeas estudadas.

Cód. do isolado	Hospedeiro	Classificação ¹
M1	<i>Epidendrum rigidum</i>	<i>Epulorhiza</i>
M2	<i>Oncidium flexuosum</i>	<i>Ceratorhiza</i>
M3	<i>Isochillus lineares</i>	<i>Ceratorhiza</i>
M4	<i>Maxillaria marginata</i>	<i>Ceratorhiza</i>
M5	<i>Oceoclades maculata</i>	<i>Epulorhiza</i>
M6	<i>Polystachia concreta</i>	<i>Epulorhiza</i>
M7	<i>Oncidium varicosum</i>	<i>Ceratorhiza</i>

¹Classificação segundo (Currah & Zelmer, 1992)

O isolamento do fungo micorrízico é dificultado quando não se dispõe de microscópio invertido, e que leva muitas vezes ao isolamento de fungos endofíticos, pertencentes ao grupo *Mycelium radialis atrovirens* (Melin, 1922), atualmente denominados de “endófitos septados escuros” (Jumpponen & Trappe, 1998). Como esses fungos endofíticos comumente colonizam o tecido intercelularmente, as técnicas mais usuais de isolamento, sem a maceração e o monitoramento (somente com o corte do tecido vegetal após a desinfestação), favorecem o isolamento deste grupo de organismos que, provavelmente, têm o primeiro contato com os nutrientes do meio de cultura e apresentam a maior taxa de crescimento.

Pode-se observar que isolados de *Ceratorhiza* possuem taxa de crescimento maior do que a dos isolados de *Epulorhiza*, micélio aéreo mais abundante e margem não submersa (Quadro 4) como descrito por Currah & Zelmer (1992).

Além disso, isolados de *Ceratorhiza* possuem hifa vegetativa de maior diâmetro, células monilióides maiores (Quadro 5) e de formato cilíndrico, clavado ou em formato de barril, enquanto os isolados de *Epulorhiza* possuem células monilióides menores, globosas ou elipsóides. *Epulorhiza* possui célula vegetativa de diâmetro bem menor do que em *Ceratorhiza* (Quadro 5), característica importante para o uso da chave de Currah & Zelmer (1992).

Todos os isolados de *Ceratorhiza* foram positivos para polifenol-oxidases, enquanto os de *Epulorhiza* foram negativos para a referida enzima (Quadro 5). Esse teste enzimático é considerado de importante valor taxonômico em auxílio

das características morfológicas, para se separar esses dois gêneros (Zelmer *et al.*, 1996).

Quadro 4 – Avaliação do crescimento em diferentes meios de cultivo, micélio aéreo, cor, margem e aspecto das colônias dos 7 isolados de fungos micorrízicos de orquídeas após 72 horas a 26°C no escuro.

Cód. *	Diâmetro da colônia (cm)**					Cor ***	Micélio aéreo	Margem	Aspecto
	BDA	FA	AA	AEM	ALC				
M1	1,4	1,4	1,0	1,2	1,0	Cr	escasso	submersa	grumoso
M2	7,0	6,5	5,0	4,5	5,5	Ma	abundante	aérea	aveludado
M3	8,2	8,5	8,5	7,5	7,5	Br	abundante	aérea	aveludado
M4	8,0	8,3	8,5	7,5	7,5	Br	abundante	aérea	aveludado
M5	4,0	5,5	3,5	2,0	5,0	Cr	escasso	submersa	liso
M6	1,5	1,4	1,0	1,4	1,0	Cr	escasso	submersa	grumoso
M7	8,0	8,5	8,5	7,0	8,5	Ma	abundante	aérea	aveludado

*Código de identificação do isolado conforme Quadro 3.

**BDA=batata dextrose ágar; FA= fubá ágar; AA=ágar-aveia; AEM=ágar extrato de malte; ALC=ágar leite de coco

***Cr=creme; Ma=marrom; Br=branco

Quadro 5 – Condição nuclear, tamanho de células monilióides, diâmetro da hifa vegetativa e detecção de enzimas para os 7 isolados de fungos micorrízicos de orquídeas.

Cód.	Condição nuclear	Células Monilióide (FA)*	Hifa vegetativa (BDA)**	Enzimas***	
				P	C
		----- µm -----			
M1	binucleado	7,0-10 x 8,0-9,5	2,0	-	+
M2	binucleado	20-26 x 8,0-10	5,0-6,0	+	+
M3	binucleado	17-25 x 9,5-14	4,0-5,0	+	+
M4	binucleado	17-27 x 9,5-14	4,0-5,0	+	+
M5	binucleado	14-16 x 10-15	2,0-3,0	-	+
M6	binucleado	7,0-10 x 8,0-9,5	2,0	-	+
M7	binucleado	18-24 x 7,5-10	5,5-6,5	+	+

*FA = Fubá ágar

**BDA = Batata dextrose ágar

***P=polifenol-oxidase; C=celulase; (+): presença e (-): ausência de atividade.

Os isolados M2 (Figura 2D), M3 (Figura 2E), M4 (Figura 2F) e M7 (Figura 2G) foram classificados como pertencentes ao gênero *Ceratorhiza*, por possuírem características em comum, como a taxa de crescimento em diferentes meios de cultura, a margem da colônia, o micélio aéreo (Quadro 4), o diâmetro da hifa vegetativa e a produção de polifenol-oxidases (Quadro 5). No entanto, houve uma grande variação no tamanho (Quadro 5) e na forma das células monilióides (Figura 2) para um mesmo isolado, sendo essa variação maior quando eles eram cultivados em diferentes meios de cultivo, o que dificultou a associação de uma dessas características a um único táxon.

A taxonomia no nível de espécie para *Ceratorhiza* baseado em caracteres morfológicos é extremamente difícil, pois o fungo raramente apresenta uma característica peculiar da espécie que não apresente variação com o tipo de meio de cultivo utilizado (Andersen, 1990). Atualmente há o reconhecimento de apenas uma espécie válida para *Ceratorhiza*: *C. pernacatena* Zelmer & Currah, isolada de *Platanthera praeclara*, uma espécie terrestre de orquídea nativa do Canadá (Zelmer & Currah, 1995). *Ceratorhiza pernacatena* possui células monilióides globosas, em cadeias e unidas por uma conexão tubular no septo, característica essa que permaneceu estável em diversos meios de cultivo por 2 anos e assegurou a proposição feita de espécie nova (Zelmer & Currah, 1995).

Não foram observadas características morfológicas peculiares e estáveis em nenhum dos isolados de *Ceratorhiza*, no entanto a partir dos dados morfológicos pode-se admitir que os isolados M3 e M4, que são da mesma região geográfica mas de hospedeiros diferentes pertencem à mesma espécie, bem como a diferenciação desses dois isolados em relação aos isolados M2 e M7. A presença de escleródios (Figura 2H), somente foi constatada no isolado M7. Estes mediam 1-2mm de diâmetro. Os isolados M2 e M7 de *Ceratorhiza* foram isolados de espécies hospedeiras de mesmo gênero e da mesma região geográfica, no entanto, são morfológicamente distintos (Quadros 4 e 5).

Os isolados M1 (Figura 2A), M5 (Figura 2C) e M6 (Figura 2B) foram classificados como pertencentes ao gênero *Epulorhiza* e apresentaram características culturais mais estáveis, inclusive da forma (Figura 2) e tamanho

das células monilióides (Quadro 5). Os isolados de *Epulorhiza* possuem em comum características como micélio aéreo escasso, crescimento lento em cultura, margem submersa, negativos para polifenol-oxidases e menor diâmetro das hifas vegetativas (Quadros 4 e 5).

Todos os isolados testados mostraram-se “self-“, ou seja, ocorreu a anastomose de hifas quando o isolado foi confrontado consigo mesmo, o que possibilita uma futura caracterização desses isolados dentro do agrupamento por AG. Nos pares de isolados M1/M6 de *Epulorhiza* e M3/M4 de *Ceratorhiza*, ocorreu anastomose de hifas, demonstrando que fazem parte do mesmo grupo de anastomose.

Nas cinco tentativas de indução da fase sexuada, com os dois métodos utilizados, nenhum himênio foi produzido por nenhum dos 7 isolados. Várias tentativas de indução de fase sexuada em rizoctonióides micorrízicas também não resultaram em sucesso (Stalpers & Andersen, 1996; Sen, 1999; Currah & Zelmer, 1992). A dificuldade de se estabelecer uma conexão anamorfo-teleomorfo em rizoctonias micorrízicas em orquídeas, tem representado o grande entrave para o estudo de especificidade fungo-hospedeiro para essa família de plantas (Andersen & Rasmussen, 1996; Masuhara & Katsuya, 1994; Peterson *et al.*, 1998).

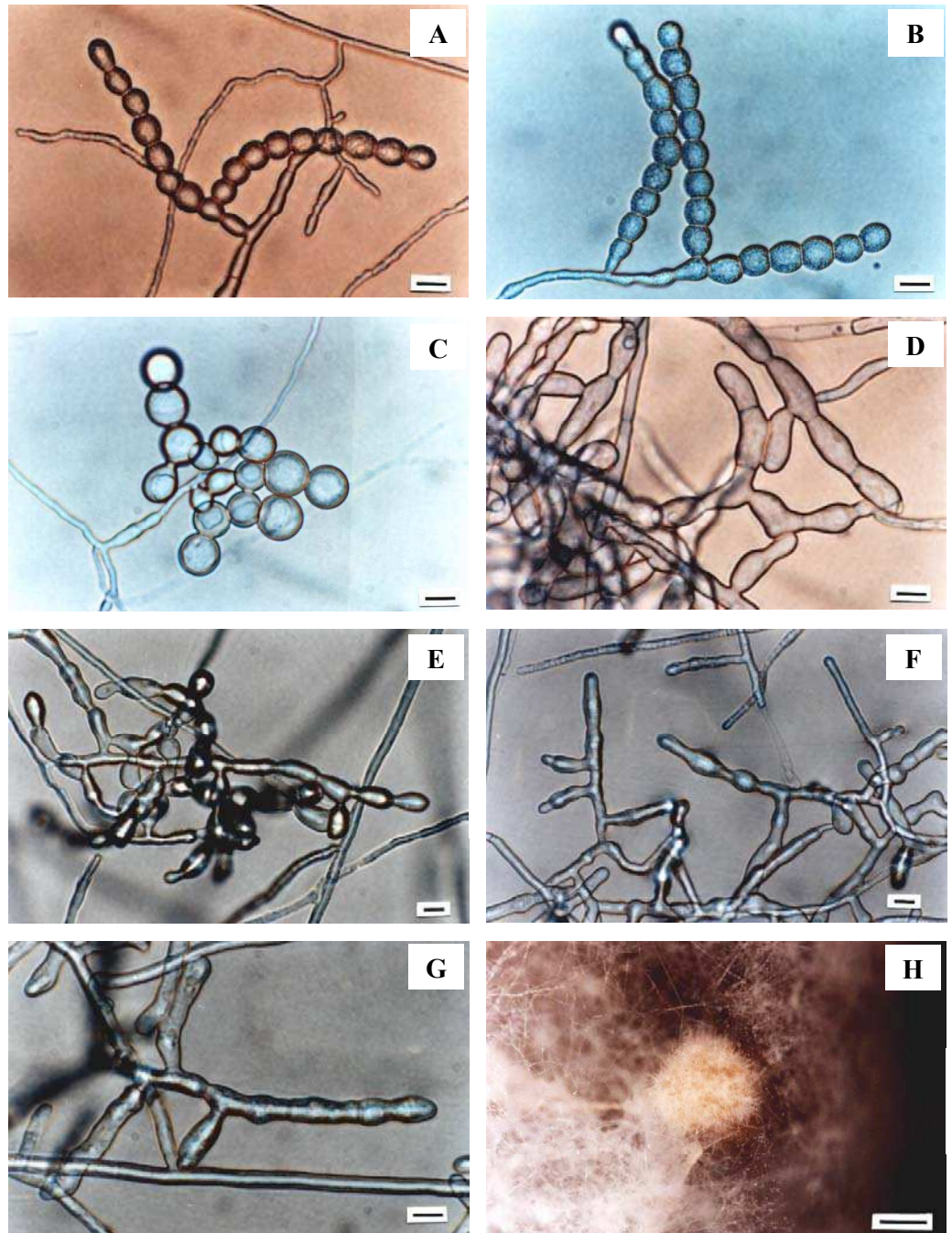


Figura 2. Morfologia do micélio dos isolados de fungos micorrízicos em orquídeas. Células monilióides (A-G). *Epulorhiza* sp., isolados M1 (A) e M6 (B). *Epulorhiza repens* (C). *Ceratorhiza* sp., isolados M2 (D), M3 (E), M4 (F), M7 (G). Esclerócio de M7 em FA (H). Escalas: 10 μ m (A-G), 1mm (H).

A ultraestrutura do septo do isolado M6 revelou a presença de doliporo de basidiomicetos, com a estrutura de parenteossoma imperfurado típico de *Tulasnella* (Figura 3). O parenteossoma imperfurado ou pauciperfurado distingue o gênero *Epulorhiza* dos demais gêneros anamorfos de rizoctonias (Moore, 1987). Observa-se a presença do lúmem do parenteossoma composto por três camadas, uma camada central menos eletrondensa, envolta por uma camada mais eletrondensa de cada lado (Figura 3), típico em espécies de *Tulasnella* (Moore, 1996, 1987; Andersen, 1996). No entanto, o isolado de *Epulorhiza* M6 não possui a margem do parenteossoma recurvada, característica raramente observada (Moore, 1996).

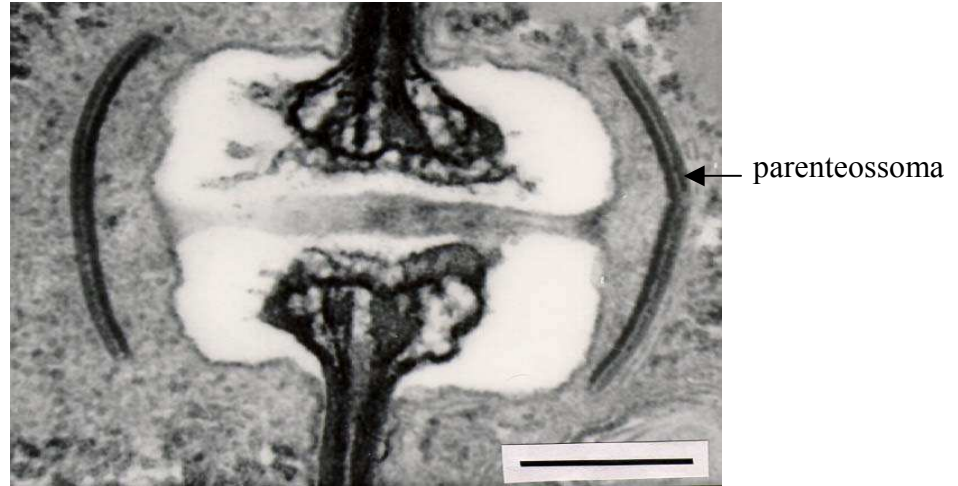


Figura 3 – Ultraestrutura do septo de hifa de *Epulorhiza* sp., isolado M6. A seta indica o parenteossoma. Escala: 0,25 μ m.

A análise de agrupamento (UPGMA) para os dados morfológicos permitiu uma separação em nível de gênero extremamente satisfatória, sendo 3 grupos formados, o primeiro pelos isolados M1, M5 e M6 (*Epulorhiza*), o segundo pelos isolados M2 e M7 (*Ceratorhiza*) e o último grupo pelos isolados de *Ceratorhiza* M3 e M4 (Figura 4).

Se considerarmos a distância fenotípica de 0,25, haverá somente 2 grupos formados, correspondentes aos dois gêneros em estudo. A análise de otimização pelo método de Tocher confirma os grupos formados pela análise de agrupamento UPGMA (Quadro 6).

Quadro 6 – Grupos formados com base nas características qualitativas da caracterização morfológica dos 7 isolados de fungos micorrízicos de orquídeas, pelo agrupamento de Tocher. Os códigos dos isolados correspondem à identificação do Quadro 3.

Grupo	Isolados	Classificação
I	M1 M5 M6	<i>Epulorhiza</i>
II	M2 M7	<i>Ceratorhiza</i>
III	M3 M4	<i>Ceratorhiza</i>

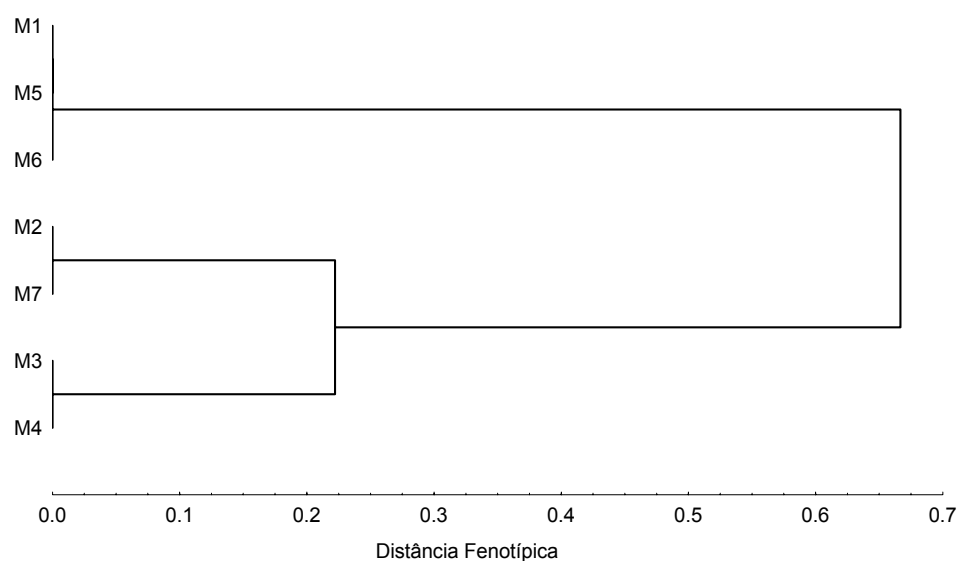


Figura 4 – Dendrograma de agrupamento com base nas características qualitativas da caracterização morfológica dos 7 isolados de fungos micorrízicos de orquídeas, pelo método UPGMA. Os códigos dos isolados correspondem à identificação do Quadro 3.

Os isolados M1 e M6, de mesma região geográfica, mas de hospedeiros diferentes, parecem ser idênticos morfológicamente porém diferem do isolado M5. As características morfológicas deste isolado (Quadro 5) conformam as da classificação da espécie *E. repens* (Bernard) Moore. *Epulorhiza repens* é considerado o táxon anamorfo de *Tulasnella deliquescens*, de ampla distribuição geográfica, já relatado como micorrízico em diversas espécies de orquídeas (Quadro 1). Não foram encontrados relatos na literatura da ocorrência de *E. repens* no Brasil e, dessa forma, este é o primeiro relato desta espécie no Brasil.

Os isolados M1 e M6 de *Epulorhiza* também apresentaram características morfológicas estáveis e diferenciaram-se das demais espécies de *Epulorhiza* já relatadas na literatura não só pelo tamanho das células monilióides (Quadro 5), mas também pelo aspecto grumoso da colônia, baixíssima taxa de crescimento em BDA, crescimento irregular e superfície verrugosa das células monilióides (Figura 2A e B). Das cinco espécies taxonomicamente aceitas de *Epulorhiza* (Currah *et al.*, 1997), a que possui menores células monilióides é a *E. calendulina* Zelmer & Currah, com 12-21 x 8-9 μm , além da coloração alaranjada da colônia. Para as células monilióides globosas dos isolados M1 e M6, cuja junção entre as células não se apresenta como do tipo tubular (como para *E. anaticula*), a classificação poderia ser como *E. repens*, excetuando-se o tamanho das células monilióides de 13-18 x 8-17 μm , bem maiores do que as observadas para M1 e M6 (Quadro 5). Tendo em consideração o descrito e a confirmação da presença de parenteossoma imperfurado conclui-se pela necessidade de futuramente, acomodá-lo em um novo táxon, segundo as normas do Código Internacional de Nomenclatura Botânica.

Fungos do gênero *Ceratorhiza* e *Epulorhiza* são os mais comumente isolados em trabalhos com orquídeas nativas coletadas na natureza (Currah *et al.*, 1987; 1989; 1997; Richardson *et al.*, 1993; Richardson & Currah, 1995; Zelmer *et al.*, 1996). Além desses, em orquídeas coletadas na natureza, *Moniliopsis* spp. ou *Rhizoctonia solani* são também relatados (Currah, 1986), mas em menor número. O predomínio de rizoctonióides multinucleados entre os isolados obtidos por Bayman *et al.* (1997) talvez possa ser atribuído a existência de

alguma especificidade fungo-hospedeiro, uma vez que esse trabalho concentrou-se somente em orquídeas do gênero *Lephanthes*.

Estudos sobre especificidade fungo-hospedeiro em orquídeas não são muito conclusivos (Andersen & Rasmussen, 1996). Além da dificuldade da taxonomia do micobionte no nível de espécie, a avaliação da especificidade é ainda dificultada pela inexistência de métodos de isolamento padronizados, pelos estádios do hospedeiro (protocórmio/planta adulta) não serem os mesmos em todos os trabalhos, bem como pela dificuldade de indução da fase sexuada. Os experimentos de germinação em laboratório, com o emprego de isolados de coleções, não refletem necessariamente a especificidade no nível de campo (Andersen & Rasmussen, 1996; Peterson *et al.*, 1998).

Os trabalhos com orquídeas australianas, de mesma região geográfica, demonstram associação de *Pterostylis* com *Ceratobasidium*, de *Calademia* com *Sebacina* e de *Thelymitra* com *Tulasnella* (Warcup, 1981). Estudos similares, em orquídeas do hemisfério norte, mostram resultados diferentes, desde plantas consideradas como de baixíssima especificidade (Hadley, 1970) até as plantas consideradas altamente específicas (Currah *et al.*, 1997). No entanto, os trabalhos existentes empregam metodologias diferentes, estádios diferentes do hospedeiro, fungos raramente classificados no nível de espécie e por isso são fonte de controvérsia.

4.2. Caracterização molecular

O padrão de polimorfismo de tamanho da região ITS do rDNA dos 7 isolados e o padrão de restrição da região ITS com as enzimas de restrição *Alu I* e *Eco RI*, podem ser observados na Figura 5. O tamanho dos fragmentos de DNA de restrição, estão apresentados no Quadro 7.

Com base na matriz de distâncias genéticas foi feita a análise de agrupamento pelo método hierárquico (UPGMA) para cada espécie, sendo possível identificar os grupos mais homogêneos (Figura 6). A análise pelo método de Tocher, o qual prioriza a dissimilaridade entre os isolados, mostrou a detecção de 3 grupos (Quadro 8). Os valores das distâncias genéticas entre os isolados analisados, estão apresentados na matriz quadrada (Quadro 9).

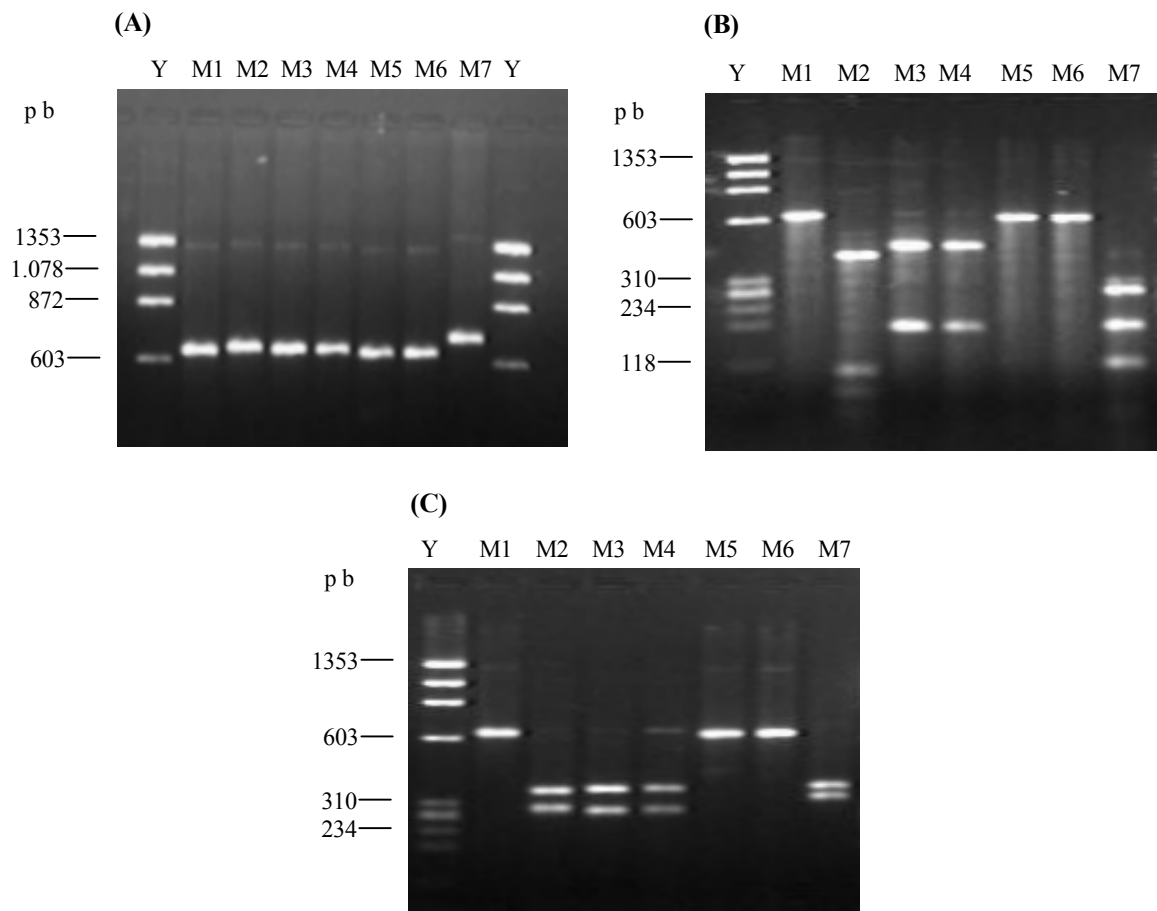


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 2,0% da região ITS do rDNA amplificada pelos oligonucleotídeos ITS 1 e ITS 4 (A). Eletroforese em gel de agarose 2,0% dos fragmentos de restrição da região ITS do rDNA dos 7 isolados de fungos micorrízicos em orquídeas, utilizando a endonuclease *Alu* I (B), *Eco* RI (C). O código dos isolados está de acordo com o Quadro 3. Y, DNA do fago ØX 174 digerido com *Hae* III

Quadro 7 – Tamanho do fragmento de DNA de restrição (pb) da região ITS do rDNA amplificada do DNA total dos isolados de fungos micorrízicos de orquídeas. Os códigos dos isolados correspondem à identificação do Quadro 3.

Isolado	Tamanho da região ITS (pb)	Tamanho dos fragmentos de DNA de restrição da região ITS				
		<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Eco</i> RI	<i>Hinf</i> I	<i>Cla</i> I
M1	640	600	600	640	180	610
					150	
					130	
					90*	
M2	660	420	370	360	350	380
		110	110*	300	300	240
		80*	80*			
M3	660	450	350	370	350	410
		190	110*	290	300	230
			100*			
M4	660	450	350	370	350	410
		190	110*	290	300	230
			100*			
M5	640	600	490	640	180	610
			100*		150	
					130	
					90*	
M6	640	600	600	640	180	610
					150	
					130	
					90*	
M7	730	280	540	380	360	400
		190	120	330	350	280
		120	110			

* valor sujeito a erro

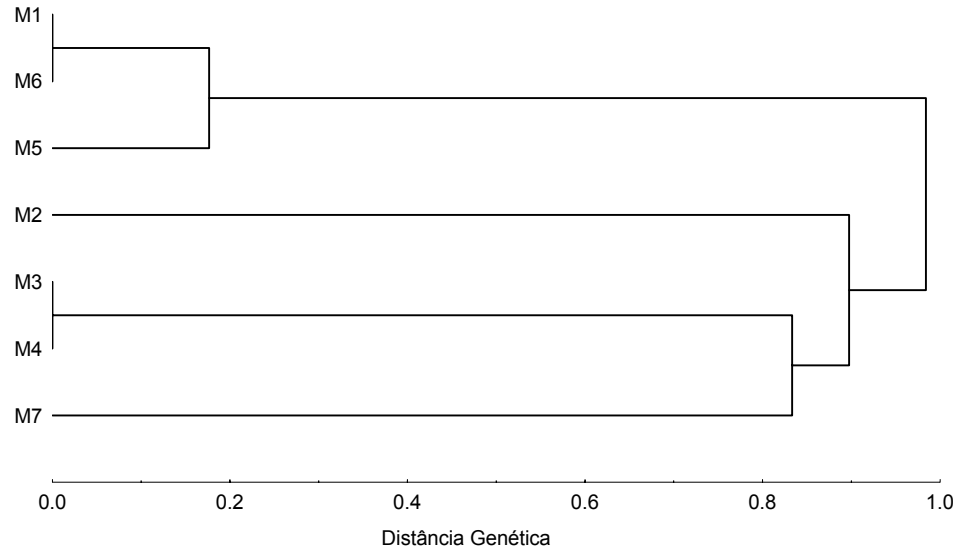


Figura 6 – Dendrograma de agrupamento com base nas distâncias genéticas, obtidas a partir da análise dos fragmentos de restrição da região ITS do rDNA para os 7 isolados de fungos micorrízicos de orquídeas, pelo método UPGMA. Os códigos dos isolados correspondem à identificação do Quadro 3.

Quadro 8 – Grupos formados com base nas distâncias genéticas dos 7 isolados de fungos micorrízicos de orquídeas, pelo agrupamento de Tocher, considerando os dados de PCR-RFLP da região ITS do rDNA. Os códigos dos isolados correspondem à identificação do Quadro 3.

Grupo	Isolados	Classificação
I	M1 M5 M6	<i>Epulorhiza</i>
II	M3 M4 M7	<i>Ceratorhiza</i>
III	M2	<i>Ceratorhiza</i>

Quadro 9 – Matriz quadrada das distâncias genéticas, obtidas a partir da análise por PCR-RFLP da região ITS do rDNA para os 7 isolados de fungos micorrízicos de orquídeas. Os códigos dos isolados correspondem à identificação do Quadro 3.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
M1	0						
M2	1	0					
M3	1	0,85	0				
M4	1	0,85	0	0			
M5	0,18	1	0,9	0,9	0		
M6	0	1	1	1	0,18	0	
M7	1	1	0,83	0,83	1	1	0

Os produtos de amplificação gerados pelos oligonucleotídeos ITS 1 e ITS 4 variaram no tamanho, entre fragmentos de DNA de 640 a 730 pb. Os oligonucleotídeos utilizados amplificaram fragmentos de DNA de 640 pb para os isolados M1, M5 e M6, correspondentes ao gênero *Epulorhiza*, e os fragmentos de DNA entre 660 a 730 pb, para os isolados M2, M3, M4 e M7 correspondentes ao gênero *Ceratorhiza* (Figura 5A). Os fragmentos de DNA amplificados da região ITS do rDNA utilizando-se os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 em *Ceratorhiza* spp. isoladas de orquídeas do Canadá e da Finlândia, possuem aproximadamente 670 pb (Sen, 1999). As enzimas de restrição *Alu* I, *Eco* RI e *Cla* I não clivaram os produtos de amplificação da região ITS dos isolados correspondentes ao gênero *Epulorhiza*, mas clivaram os produtos de amplificação da região ITS dos isolados correspondentes ao gênero *Ceratorhiza*. A Figura 5B e 5C mostra o padrão de restrição com as enzimas *Alu* I e *Eco* RI respectivamente.

As enzimas de restrição *Alu* I, *Eco* RI, *Hinf* I e *Cla* I geraram o mesmo padrão de restrição para os isolados classificados como *Epulorhiza*, sendo que *Hae* III clivou a região ITS de *E. repens* (M5), separando M5 dos demais isolados M1 e M6 em *Epulorhiza* (Quadro 7). Na caracterização de isolados de *R. solani*, fitopatogênicas em arroz, por PCR não foram observadas diferenças genéticas entre os isolados AG1-IA (Pascual *et al.*, 2000) quando da utilização da técnica de PCR-RFLP da região ITS do rDNA. Somente três subgrupos em AG1 foram observados e os autores justificaram os resultados como devidos ao uso de somente três enzimas de restrição na análise por PCR-RFLP, uma vez que se esperava um maior polimorfismo. Embora se tenha usado 5 enzimas de restrição somente a *Hae* III permitiu separar o isolado M5 de *E. repens* dos demais isolados de *Epulorhiza* sp. A região ITS possui relativamente poucos sítios de clivagem e por isso há uma necessidade de uso de maior número possível de endonucleases, afim de se detectar variação entre os isolados.

Os isolados de *Epulorhiza*, M1 e M6 e os isolados de *Ceratorhiza*, M3 e M4, que não se diferenciaram morfológicamente mostraram o mesmo padrão de restrição para todas as cinco enzimas utilizadas, confirmando a possibilidade de representarem a mesma espécie (Quadro 7). Os isolados M1 e M6 de *Epulorhiza*

foram isolados de orquídeas epífitas diferentes, no entanto, da mesma localização geográfica, o mesmo para os isolados M3 e M4 de *Ceratorhiza* (Quadro 2 e 3). Os isolados M2 e M7 foram classificados no mesmo gênero (*Ceratorhiza*) mas provavelmente são espécies diferentes, tendo sido isolados de mesmo gênero de orquídea e de mesma localização geográfica (Quadro 2 e 3).

Pelos resultados obtidos pela técnica de PCR-RFLP da região ITS, os isolados de *Ceratorhiza* mostraram diferentes padrões de restrição separando os quatro isolados em dois grupos: M2 e M7 do M3 e M4. *Ceratobasidium cornigerum*, um representante teleomórfico comum de *Ceratorhiza* spp. faz parte de vários AGs (como AG-A, AG-F, AG-C), mostrando que essa espécie possui uma considerável diversidade genética (Masuhara *et al.*, 1994), o que explicaria também os diferentes padrões nas análises por PCR-RFLP (Sen, 1999).

Na análise dos 7 isolados de fungos micorrízicos de orquídeas, por meio de RAPD, 17 oligonucleotídeos foram utilizados gerando 432 fragmentos de DNA polimórficos que foram utilizados para o cálculo das distâncias genéticas entre os isolados. O Quadro 10 mostra o número de fragmentos de DNA polimórficos analisados pela amplificação com cada um dos oligonucleotídeos de todos os isolados. O número de fragmentos amplificados variou de 18 a 35, com uma média de 25 fragmentos de DNA por oligonucleotídeo utilizado. A Figura 7 mostra o padrão de amplificação de DNA total com os oligonucleotídeos OPH03, OPH06 e OPP01.

Com base na matriz de distâncias genéticas entre os isolados, foi feita a análise de agrupamento pelo método hierárquico (UPGMA) sendo possível identificar os grupos mais homogêneos (Figura 8). A análise pelo método de Tocher, o qual prioriza a dissimilaridade entre os isolados, demonstrou a existência de 3 grupos (Quadro 11). Os dados gerados contendo as distâncias genéticas entre os isolados são apresentados em matriz quadrada (Quadro 12).

Quadro 10 – Código e sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação e número de fragmentos de DNA polimórficos utilizados para análise por RAPD.

Oligonucleotídeos – Código da Operon®	Sequência de bases 5' → 3'	Número de fragmentos analisados
OPH 06	ACGCATCGCA	19
OPD 04	TCTGGTGAGG	23
OPG 11	TGCCCCGTCGT	18
OPF 14	TGCTGCAGGT	30
OPH 03	AGACGTCCAC	27
OPP 01	GTAGCACTCC	29
OPG 05	CTGAGACGGA	35
OPE 02	GGTGCGGGAA	29
OPC 02	GTGAGGCGTC	29
OPC 05	GATGACCGCC	18
OPC 08	TGGACCGGTG	21
OPC 13	AAGCCTCGTC	22
OPJ 02	CCCGTTGGGA	26
OPW 07	CTGGACGTCA	22
OPH 14	ACCAGGTTGG	20
OPW 02	ACCCCGCCAA	31
OPE 19	ACGGCGTATG	33
Total		432
Média		25

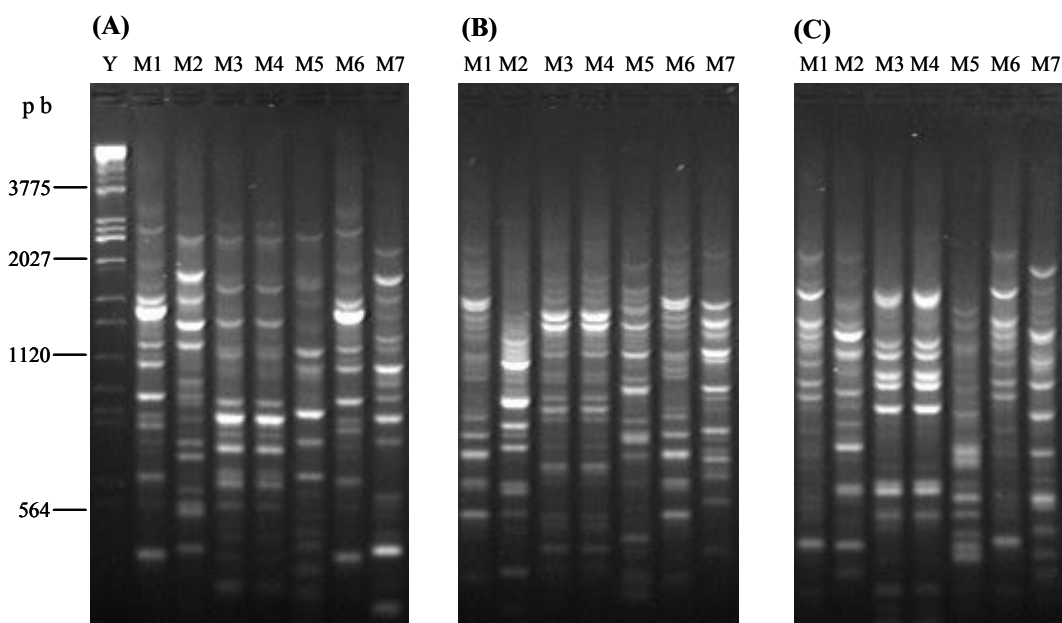


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% do DNA amplificado dos 7 isolados de fungos micorrízicos em orquídeas, utilizando o oligonucleotídeo OPH03 (A), OPH06 (B) e OPP01 (C). O código dos isolados está de acordo com o Quadro 3. Y, DNA do fago λ , clivado com as enzimas de restrição *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III.

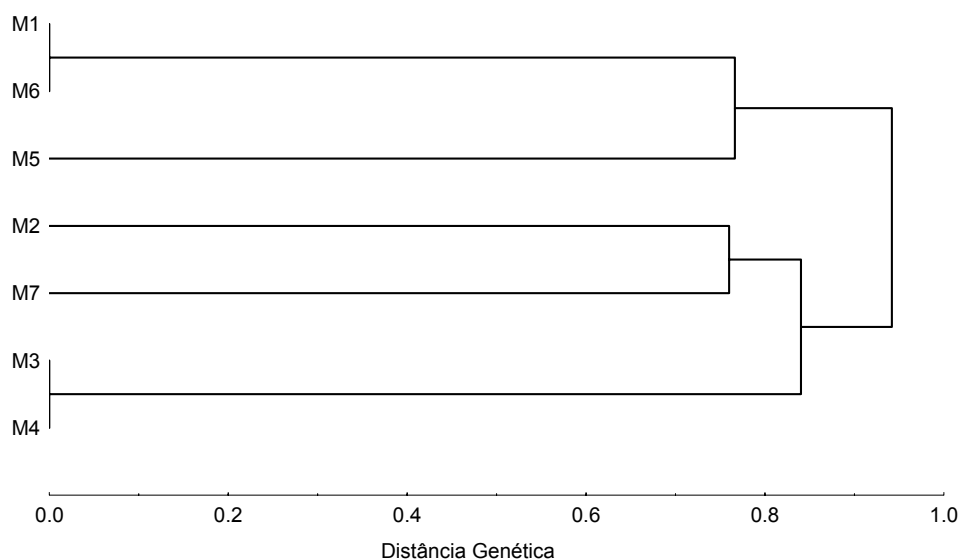


Figura 8 – Dendrograma de agrupamento com base na matriz quadrada das distâncias genéticas por RAPD para os 7 isolados de fungos micorrízicos de orquídeas, pelo método UPGMA. Os códigos dos isolados correspondem à identificação do Quadro 3.

Quadro 11 – Grupos formados a partir das distâncias genéticas por RAPD dos 7 isolados de fungos micorrízicos de orquídeas, pelo agrupamento de Tocher. Os códigos dos isolados correspondem à identificação do Quadro 3.

Grupo	Isolados	Classificação
I	M1 M5 M6	<i>Epulorhiza</i>
II	M3 M4	<i>Ceratorhiza</i>
III	M2 M7	<i>Ceratorhiza</i>

Quadro 12 – Matriz quadrada parcial das Distâncias Genéticas, obtidas a partir da análise por marcadores RAPD, para os 7 isolados de fungos micorrízicos em orquídeas. Os códigos dos isolados correspondem à identificação do Quadro 3.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
M1	0						
M2	0,95	0					
M3	0,96	0,81	0				
M4	0,96	0,81	0	0			
M5	0,77	0,92	0,93	0,93	0		
M6	0	0,95	0,96	0,96	0,77	0	
M7	0,93	0,76	0,88	0,88	0,9	0,93	0

Para todos os oligonucleotídeos utilizados, o padrão de bandas foi o mesmo para os pares: M1/M6 de *Epulorhiza* e M3/M4 de *Ceratorhiza*, enquanto um considerável polimorfismo foi detectado entre o isolado M5 (*E. repens*) e os pares M1/M6 (*Epulorhiza* sp.).

Foi detectado um maior polimorfismo entre o isolado M5 e o par M1/M6 pela técnica de RAPD do que pela técnica de PCR-RFLP da região ITS do rDNA, sendo a distância genética entre ambos os grupos de 77% por RAPD e 18% pela análise de polimorfismo da região ITS do rDNA. Diferentemente da análise de RFLP da região ITS do rDNA, o RAPD permite uma análise ampla do genoma com cada oligonucleotídeo, logo o polimorfismo entre genótipos é mais facilmente detectado.

4.3. Análise de correlação e de coincidência entre a caracterização morfológica e a caracterização molecular

Com base nas análises morfológicas e moleculares, observa-se uma alta semelhança entre os grupos formados pelas diferentes análises (morfológica, PCR-RFLP da região ITS do rDNA e RAPD). Assim, a partir dos valores de distância genética obtidos entre os pares de isolados, foi feita uma análise de coincidência simples, que revelou elevados valores percentuais de coincidência superiores e inferiores (Quadro 13).

Quadro 13 – Análise de coincidência com base nos dados qualitativos e quantitativos da caracterização morfológica e análises por PCR-RFLP da região ITS do rDNA e RAPD, para os 7 isolados de fungos micorrízicos de orquídeas.

Variáveis	Número de dados	Coincidência superior (%)	Coincidência inferior (%)	r_{Pearson}
Morfologia x PCR-RFLP	19	80	80	0,7700**
Morfologia x RAPD	19	90	90	0,6693**
PCR-RFLP x RAPD	19	90	70	0,8303**

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

A alta correspondência dos resultados das análises com marcadores moleculares RAPD e PCR-RFLP da região ITS do rDNA, com os resultados das análises morfológicas, indica uma alta correlação entre os fragmentos de DNA analisados com as características utilizadas na caracterização morfológica. Foram encontrados valores de correlação positivos para todas as 3 variáveis analisadas (Quadro 13).

Quadro 14 – Comparação entre as variáveis utilizadas para caracterização morfológica e molecular dos 7 isolados de fungos micorrízicos em orquídeas pelo agrupamento de Tocher.

Isolado	Caracterização morfológica*	Caracterização molecular*		Classificação
		PCR-RFLP	RAPD	
M1	a	a	a	<i>Epulorhiza</i> sp.
M2	b	b	b	<i>Ceratorhiza</i> sp.
M3	c	c	c	<i>Ceratorhiza</i> sp.
M4	c	c	c	<i>Ceratorhiza</i> sp.
M5	a	a	a	<i>E. repens</i>
M6	a	a	a	<i>Epulorhiza</i> sp.
M7	b	c	b	<i>Ceratorhiza</i> sp.

* Isolados com mesma letra, na mesma coluna, não diferem pelo agrupamento de Tocher

O agrupamento obtido por PCR-RFLP da região ITS do rDNA e de marcadores RAPD mostraram-se condizentes com a taxonomia morfológica dos isolados (Quadro 14), assim, as técnicas moleculares poderão ser utilizadas como importante ferramenta em um estudo mais amplo de especificidade e ecologia molecular em fungos micorrízicos de orquídeas corroborando as informações obtidas a partir de critérios morfológicos, assim como já vem sendo conduzido para fungos micorrízicos ericóides (Monreal *et al.*, 1999) e ectomicorrízicos (Junghans *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 1999; 2000).

Os grupos rizoctonióides são taxonomicamente problemáticos por constituírem-se de um complexo de espécies representativas da fase anamórfica de diferentes gêneros de basidiomicetos que não apresentam conidiogênese nessa fase do seu ciclo de vida. É de grande importância integrar diferentes técnicas no estudo destes fungos afim de se estimar tanto a relação inter e intra-grupo dentro de uma população ou nicho ecológico (Mordue *et al.*, 1989). O objetivo mais importante é integrar diferentes métodos e técnicas em estudos dentro do complexo *Rhizoctonia* e identificar marcadores que possam facilitar a associação e comparação de diferentes experimentos mesmo que separados no espaço, tempo ou técnica utilizada (Mordue *et al.*, 1996).

Trabalhos de caracterização, constituem-se no primeiro passo para a aplicação prática de isolados em programas de micorrização controlada, além de auxiliarem na definição de parâmetros para estudos ecológicos em populações de fungos micorrízicos de orquídeas em nível de campo.

5 – RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo, caracterizar morfológicamente e molecularmente 7 fungos micorrízicos isolados de 7 espécies de orquídeas nativas da zona da mata de Minas Gerais, utilizando dados morfológicos dos fungos cultivados em cultura e marcadores moleculares RAPD e PCR-RFLP da região ITS do rDNA.

“Pelotons” foram observados no sistema radicular das sete espécies de orquídeas: *E. rigidum*, *I. lineares*, *M. marginata*, *O. flexuosum*, *O. varicosum*, *O. maculata* e *P. concreta*, dentre os quais somente *O. maculata* é de habitat terrestre e as demais epífitas.

O isolamento com monitoramento contínuo sob microscópio ótico invertido possibilitou um maior sucesso no isolamento do fungo reconhecidamente micorrízico, formador de “pelotons”. Os isolados foram caracterizados quanto a morfologia e identificados como rizoctonióides dos gêneros *Epulorhiza* ou *Ceratorhiza* (Fungos mitospóricos: Mycelia sterilia) anamorfos de basidiomicetos.

O resultado das análises de PCR-RFLP da região ITS do rDNA e RAPD, utilizadas para caracterização molecular, foram condizentes com a classificação morfológica, o que pode ser atestado pelas análises de coincidência e correlação. A técnica de RAPD permitiu uma melhor distinção entre *E. repens* e os demais isolados de *Epulorhiza* do que pela análise por PCR-RFLP da região ITS do rDNA, por permitir a análise de múltiplos loci para cada oligonucleotídeo utilizado. Resultados da aplicação de ambas as técnicas moleculares coincidiram com a taxonomia morfológica demonstrando que os isolados M1 e M6 de *Epulorhiza* pertencem a mesma espécie, assim como os isolados M3 e M4 de *Ceratorhiza*.

Os isolados M2 e M7 foram classificados como do gênero *Ceratorhiza* mas, provavelmente, pertencentes à espécies diferentes. Ambos foram isolados

de orquídeas do gênero *Oncidium*, porém de espécies distintas, coletadas em uma mesma região geográfica. Os isolados M3 e M4 também foram classificados como uma outra provável espécie de *Ceratorhiza*. Entretanto, apesar destes terem sido isolados de hospedeiros pertencentes a espécies diferentes, de mesma localização geográfica, apresentaram alta similaridade. O mesmo foi observado para M1 e M6 de *Epulorhiza*, isolados de espécies distintas de orquídeas, mas também de uma mesma localização geográfica. Esses dados indicam uma baixa especificidade em relação à planta hospedeira e uma grande influência geográfica.

O isolado M5, isolado de *O. maculata* foi classificado como sendo *E. repens*. Os isolados M1 e M6 de *Epulorhiza* diferenciam-se suficientemente das demais *Epulorhiza* spp. já relatadas na literatura, o que aponta a necessidade de uma futura proposição de espécie nova, segundo o Código Internacional de Nomenclatura Botânica.

O trabalho se constituiu no primeiro relato taxonômico e de caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos em espécies de orquídeas brasileiras. O conhecimento sobre os fungos micorrízicos em orquídeas e seu papel na natureza é de grande importância na seleção de estirpes para aplicação prática em programas de micorrização controlada, tanto para fins de reintrodução, manejo e conservação de orquídeas na natureza, quanto para horticultura.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.379-390.
- Andersen, T. F. & Stalpers, J. A. A check-list of *Rhizoctonia* epithets. ***Mycotaxon***. v.51, p.437-457, 1994.
- Andersen, T. F. A study of hyphal morphology in the form genus *Rhizoctonia*. ***Mycotaxon***. v. 37, p.25-46, 1990.
- Andersen, T. F. A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia* sensu lato employing morphological, ultrastructural and molecular methods. ***Mycological Research***. v.100, p.1117-1128, 1996.
- Arditti, J.. Aspects of the physiology of orchids. In: Woolhouse H. W. (Ed) ***Advances in Botanical Research***. New York: Academic Press, 1979. p. 421-655.
- Bayman, P.; Lebrón, L.; Tremblay, R.L.; Lodge, D.J. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). ***New Phytologist***. v.135, p.143-149, 1997.
- Carling, D. E. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S.; Dijst, G. (Eds), ***Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control***. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.37-47.
- Carling, D. E.; Kuninaga, S. & Leiner, R. H. Relatedness within and among intraspecific groups of *Rhizoctonia solani*: A comparison of grouping by anastomosis and by DNA hybridization. ***Phytoparasitica***. v.16, p.209-210, 1988.

- Carling, D. E.; Rothrock, C. S.; MacNish, G. C.; Sweetingham, M. W.; Brainard, K. A. Characterization of anastomosis group 11 (AG 11) of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**. v.84, p.1387-1393, 1994.
- Cha, J.Y. and Igarashi, T. *Armilaria jezoensis*, a new symbiont of *Galeola septentrionalis* (Orchidaceae) in Hokkaido. **Mycoscience**. v.37, p.21-24, 1996.
- Cruz, C. D.; Regazzi, A. J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, MG: UFV, 1994. 394p.
- Cubeta, M. A. & Vilgalys, R. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. **Phytopatology**. v.87 (4), p.480-484, 1997.
- Cubeta, M. A.; Echandi, E.; Abernethy, T.; Vilgalys, R. Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* spp. Using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. **Phytopathology**. v.81, p.1395-1400, 1991.
- Currah, R. S. *Thanatephorus pennatus* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of *Calypso bulbosa* (Orchidaceae) from Alberta. **Canadian Journal of Botany**. v.65, p.1957-1960, 1986.
- Currah, R. S., Sigler, L., Hambleton, S. New records and new taxa of fungi from the mycorrhiza of terrestrial orchids of Alberta. **Canadian Journal of Botany**. v.65, p.2473-2482, 1987.
- Currah, R. S., Smreciu, E. A., Hambleton, S. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Plantanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae). **Canadian Journal of Botany**. v.68, p.1171-1181, 1989.
- 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., and McInnis, T.M. *Epulorhiza inquilina* sp. nov. from *Platanthera* (Orchidaceae) and a key to *Epulorhiza* species. **Mycotaxon**, v.61, p.338-342, 1997.
- Davidson, R.W.; Campbell, W.A.; Blaisedell, D.J. Differentiation of wood-decay fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. **Journal of Agricultural Research**. v.57, p.683-695, 1938.

- Duncan, S.; Barton, J. E.; O'Brien, P. A. Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA assay. **Mycological Research**. v.97, p.1075-1082, 1993.
- Flentje, N. T. Studies on *Pellicularia filamentosa* (Pat.) D. P. Rogers – I. Formation of the perfect stage. **Translations of British Mycological Society**. v.39, p.343-356, 1956.
- Gomes, E. A.; Abreu, L. M.; Borges, A. C.; Araújo, E. F. ITS sequences and mitochondrial DNA polymorphism in *Pisolithus* isolates. **Mycological Research**. v.104, p.911-918, 2000.
- Gomes, E. A.; Barros, E. G.; Kasuya, M. C. M.; Araújo, E. F. Molecular characterization of *Pisolithus* spp. isolates by rDNA PCR-RFLP. **Mycorrhiza**. v.8, p.197-202, 1999.
- Hadley, G. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. **New Phytologist**. v.69, p.1015-1023, 1970.
- Hadley, G. Orchid mycorrhiza. In: Arditti J. (Ed), **Orchid Biology – Reviews and Perspectives II**. Ithaca: Cornell University Press, 1982. p.84-118.
- Harvais, G. & Hadley, G. The relation between host and endophyte in orchid mycorrhiza. **New Phytologist**. v.66, p.205-215, 1967.
- Harvais, G. Notes on the biology of some native orchids of Thunder Bay, their endophytes and symbionts. **Canadian Journal of Botany**. v.52, p.451-460, 1974.
- Hietala, A. & Sen, R. *Rhizoctonia* associated with trees. In: Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S.; Dijst, G. (Eds), **Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.351-358.
- Jumpponen, A. & Trappe, J. M. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. **New Phytologist**. v.140, p.295-310, 1998.
- Junghans, D. T.; Gomes, E. A.; Guimarães, W. V.; Barros, E. G.; Araújo, E. F. Genetic diversity of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* based on RAPD-PCR analysis. **Mycorrhiza**. v.7, p.243-248, 1998.
- Liu, Z. L. & Sinclair, J. B. Differentiation of intraspecific groups within anastomosis group 1 of *Rhizoctonia solani* using ribosomal DNA internal

- transcribed spacer and isozyme comparisons. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v.15, p.272-280, 1993.
- Liu, Z. L.; Domier, L. L.; Sinclair, J. B. ISG-specific ribosomal DNA polymorphism of the *Rhizoctonia solani* species complex. **Mycologia**. v.85, p.795-800, 1993.
- Liu, Z. L.; Domier, L. L.; Sinclair, J. B. Polymorphism of genetic coding for nuclear 18S rDNA indicates genetic distinctiveness of anastomosis group 10 from others groups in the *Rhizoctonia solani* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, p.2659-2666, 1995.
- Liu, Z. L.; Sinclair, J. B.; Cheng, W. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. **Phytopathology**. v.82, p.778-787, 1992.
- Manning, J. C.; van Staden, J. The development and mobilization of seed reserves in some African orchids. **Australian Journal of Botany**. v.35, p.343-353, 1987.
- Marchisio, V. F.; Berta, G.; Fontana, A.; Mannina, F. M. Endophytes of wild orchids native to Italy: their morphology, caryology, ultrastructure and cytochemical characterization. **New Phytologist**. v.100, p.623-641, 1985.
- Marx, D. H. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**. v.59, p.153-163, 1969.
- Masuhara, G. & Katsuya, K. In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). **New Phytologist**. v.127, p.711-718, 1994.
- Masuhara, G.; Neate, S. M.; Schisler, D. A. Characteristics of some *Rhizoctonia* spp. from South Australian plant nurseries. **Mycological Research**. v.98, p.83-87, 1994.
- Melin, E. On the mycorrhizas of *Pinus silvestris* L. and *Picea abies* Karst. **Journal of Ecology**. v.9, p.254-257, 1922.
- Monreal, M.; Berch, S. M.; Berbee, M. Molecular diversity of ericoid mycorrhizal fungi. **Canadian Journal of Botany**. v.77, p. 1580-1594, 1999.
- 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, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.13-35.
- 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.
- Mordue, J. E. M.; Banniza, S.; Bridge, P. D.; Rutherford, M. A.; Holderness, M. 1996. Integrated biochemical, cultural and numerical methods. In: Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S.; Dijst, G. (Eds), ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control.** Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.87-98.
- Mordue, J. E. M.; Currah, R. S.; Bridge, P. D. Na integrated approach to *Rhizoctonia* taxonomy: cultural, biochemical, and numerical techniques. **Mycological Research**. v.92, p.78-90, 1989.
- Ogoshi, A. Introduction – 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, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.1-9.
- Pascual, C. B.; Toda, T.; Raymondo, A. D.; Hyakumachi, M. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. **Plant Pathology**. v.49, p.108-118, 2000.
- Peterson, R. L.; Uetake, Y; Zelmer, C. Fungal Symbiosis with Orchid protocorns. **Symbiosis**. v.25, p.29-55, 1998.
- Rasmussen, H. N. **Terrestrial Orchids From Seed to Mycotrophic Plant.** Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 444 p.
- Richardson, K.A. and Currah, R.S. The fungal community associated with the roots of some rainforest epiphytes of Costa Rica. **Selbyana**. v.16, p.49-73, 1995.
- Richardson, K.A., Currah, R.S., and Hambleton, S. Basidiomycetous endophytes from the roots of neotropical epiphytic orchidaceae. **Lindleyana**. v.8, p.127-137, 1993.

- Saksena, H. K. Nuclear phenomena in the basidium of *Ceratobasidium praticolum* (Kotila) Olive. **Canadian Journal of Botany**. v.39, p.717-725, 1961.
- Sen, R.; Hietala, A. M.; Zelmer, C. D. Common anastomosis and internal transcribed spacer RFLP groupings in binucleate *Rhizoctonia* isolates representing root endophytes of *Pinus sylvestris*, *Ceratohiza* spp. from orchid mycorrhizas and a phytopathogenic anastomosis group. **New Phytologist**. v.144, p.331-341, 1999.
- Speacht, C.A.; Dirusso, C.C.; Novotny, C.P.; Ulrich, R.C. A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytic Biochemistry**. v.119, p.158-163, 1982.
- 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**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.49-63.
- Teather, R.M. & Wood, P.J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**. v.43, p.777-780, 1982.
- Terashita, T. & Chuman, S. Fungi inhabiting wild orchids in Japan (IV). *Armillariella tabescens*, a new symbiont of *Galeola septentrionalis*. **Transactions of the Mycological Society of Japan**. v.28, p.145-154, 1987.
- 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.
- Terashita, T. Fungi inhabiting wild orchids in Japan (III). A symbiotic experiment with *Armillariella mellea* and *Galeola septentrionalis*. **Transactions of the Mycological Society of Japan**. v.26, p.47-53, 1985.
- Tham, F. Y.; Zhang, X. S.; Lim-Ho, C. L. Morphological and molecular characterization of tropical orchid mycorrhiza. In: ICOM 3, 2001, Adelaide, Australia.

- Tu, C. C.; Roberts, D. A.; Kimbrough, J. W. Hyphal fusion, nuclear condition, and perfect stages of three species of *Rhizoctonia*. **Mycologia**. v.61, p.775-783, 1969.
- Umata, H. A new biological function of Shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in a myco-heterotrophic orchid, *Erythrorchis ochobiensis*. **Mycoscience**. v.39, p.85-88, 1998.
- Umata, H. Seed germination of *Galeola altissima*, an achlorophyllous orchid, with aphyllophorales fungi. **Mycoscience**. v.36, p.369-372, 1995.
- Vigalys, R. & Cubeta, M. A. Molecular systematics population biology of *Rhizoctonia*. **Annual Review of Phytopathology**. v.32, p.132-155, 1994.
- Vilgalys, R. & Gonzales, D. Ribosomal DNA restriction fragments length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**. v.80, p.151-158, 1990.
- Warcup, J. H. The mycorrhizal relationships of Australian orchids. **New Phytologist**. v.87, p.371-381, 1981.
- Warcup, J.H. and Talbot, P.H.B. Perfect states of rhizoctonias associated with orchids II. **New Phytologist**. v.70, p.35-40, 1971.
- Warcup, J.H. and Talbot, P.H.B. Perfect states of rhizoctonias associated with orchids III. **New Phytologist**. v.86, p.267-272, 1980.
- Warcup, J.H. and Talbot, P.H.B. Perfect states of rhizoctonias associated with orchids. **New Phytologist**. v.66, p.631-641, 1967.
- White, T. J.; Bruns, T. D.; Lee, S.; Taylor, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Gelfand M.; Sninsky, J. J.; White, T. J. (Eds.), **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, 1990. p.315-322.
- 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, 1995.
- Zelmer, C. D.; Cuthbertson, L.; Currah, R. S. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. **Mycoscience**. v.37, p.439-448, 1996.