

LETÍCIA MIRANDA

**COMUNIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS AO SISTEMA RADICULAR DE  
ORQUÍDEAS EPÍFITAS CRESCENDO SOBRE *Vellozia auriculata***

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

T

M672c  
2017

Miranda, Leticia, 1990-

Comunidade de fungos associados ao sistema radicular de orquídeas epífitas crescendo sobre *Vellozia auriculata* / Leticia Miranda. – Viçosa, MG, 2017.

vii, 22 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Catarina Megumi Kasuya.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.18-22.

1. Micorriza. 2. Fungos do solo. 3. Orquídea - Raízes.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22 ed. 579.5

LETÍCIA MIRANDA

COMUNIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS AO SISTEMA RADICULAR DE  
ORQUÍDEAS EPÍFITAS CRESCENDO SOBRE *Vellozia auriculata*

Dissertação 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*.

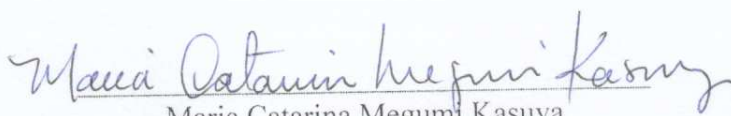
APROVADA: 24 de Fevereiro de 2017.

  
Érica Mangaravite

  
Marliane Cássia Silva

  
Sabrina Feliciano Oliveira

  
Mateus Ferreira Santana

  
Maria Catarina Megumi Kasuya  
(Orientadora)

*À minha família e ao meu noivo, dedico!*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À CAPES, ao CNPq, à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A Deus por permitir mais uma experiência fantástica na minha vida.

À minha família por todo apoio, torcida e ajuda durante essa caminhada.

Ao meu noivo, Caique, por todo amor, paciência, compreensão e suporte.

Aos amigos do Departamento de Microbiologia por compartilhar conhecimento e fazer com que tudo se tornasse um pouco mais fácil.

Aos amigos do Laboratório de Associações Micorrízicas, por toda a colaboração e principalmente pelos momentos felizes que compartilhamos.

Ao meu grupo de pesquisa, Catarina, Melissa, Meiriele, Érica, Conrado, Tomás, Emiliane, Everaldo, pela amizade, pela troca de conhecimento e por sempre estarem dispostos a ajudar.

À Marliane, que foi essencial para execução e finalização deste trabalho, agradeço por toda paciência e amizade adquirida nos últimos tempos.

À minha orientadora Maria Catarina, que admiro muito e me deu a oportunidade de crescer e aprender.

À professora Denise, minha co-orientadora, por estar sempre disposta a ajudar.

À Melissa, minha co-orientadora por todo suporte na execução dos trabalhos.

Ao meu co-orientador Marc-André Selosse, por todo o conhecimento passado e disposição em colaborar com os trabalhos do nosso grupo.

Aos demais professores do departamento eu agradeço por todo o ensinamento. Através de vocês tive mais certeza do que queria para a minha vida.

À Camila por toda ajuda dentro e fora do laboratório.

Aos funcionários do departamento por todo o suporte.

À Sabrina e ao Mateus pela disposição em participar da banca avaliadora.

A todos que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento profissional.

Muito Obrigada!!

## **BIOGRAFIA**

Letícia Miranda, filha de Carlos Roberto Miranda e Ivete Borges Garcia Miranda, nasceu em Rio Paranaíba, Minas Gerais, no dia 04 de maio de 1990. Em março de 2011 iniciou os estudos em Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Viçosa – Campus de Rio Paranaíba em Rio Paranaíba/MG, graduando-se em fevereiro de 2015. Em março de 2015 iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa em Viçosa/MG.

## SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract	vii
1. Introdução	1
2. Material e métodos	3
2.1 Local de coleta	3
2.2 Delineamento experimental	4
2.3 Análise molecular	5
2.3.1 Extração de DNA	5
2.3.2 Amplificação da região 5.8S-ITS2	6
2.4 DGGE	7
2.5 Análise de dados	7
2.5.1 Análise numérica	8
3. Resultados	8
3.1 Análise de comunidade fúngica de raiz e de forófito	8
3.2 Análise de agrupamento das raízes entre as espécies	11
3.3 Análise de raízes com seu forófito correspondente:	12
3.4 Análise numérica	15
4. Discussão	15
5. Conclusões	17
6. Referências	18

## RESUMO

MIRANDA, Leticia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Comunidade de fungos associados ao sistema radicular de orquídeas epífitas crescendo sobre *Vellozia auriculata***. Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Coorientadores: Denise Mara Soares Bazzolli, Marc André Selosse e Melissa Faust Bocayuva Cunha.

As orquídeas associam-se com fungos micorrízicos para germinação de suas sementes, por serem desprovidas de tecido nutricional, o endosperma. Sem a presença do fungo a orquídea não consegue germinar na natureza, pois são eles que fornecem os nutrientes essenciais para a germinação. Plantas epífitas são aquelas que estabelecem sobre outras plantas, que são denominadas de forófitos, utilizando-as apenas como suporte, sem parasitá-las. Acredita-se que o forófito pode exercer algum tipo de influência na comunidade micorrízica das orquídeas. Entender a associação micorrízica, bem como conhecer a diversidade de fungos associados às orquídeas adultas, na natureza, fornece informações importantes para trabalhos de conservação e manejo de populações, especialmente aquelas com risco de extinção. Neste trabalho foi avaliado o perfil da comunidade de fungos associado às raízes de três espécies de orquídeas: *Cattleya jongheana*, *Prosthechea allemanoides* e *Epidendrum chlorinum*, crescendo sobre os troncos de *Vellozia auriculata*, no Parque Estadual da Serra Negra – Itamarandiba/MG. Utilizando-se a técnica de DGGE avaliou-se o perfil da comunidade fúngica presente nas diferentes espécies de orquídeas e também se o perfil da comunidade fúngica da raiz da orquídea se assemelhava ao perfil da comunidade do forófito. Os índices de diversidade de Shannon e Simpson mostraram que, mesmo havendo semelhança no perfil da comunidade fúngica, ela difere entre as espécies de orquídeas e que o perfil da comunidade da raiz é diferente do perfil da comunidade do forófito. Conclui-se que conhecer, isolar e caracterizar os fungos que se associam à cada espécie de orquídea é importante para trabalhos de reintrodução e manejo das orquídeas.

## ABSTRACT

MIRANDA, Leticia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Fungal community associated with root system of epiphytic orchids growing on *Vellozia auriculata***. Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-advisers: Denise Mara Soares Bazzolli, Marc André Selosse and Melissa Faust Bocayuva Cunha.

Orchids are associated with mycorrhizal fungi for germination, since their seeds are devoid of nutritional tissue, the endosperm. Without the presence of the fungus, the orchid are not able to germinate in nature, because it provide the essential nutrients for germination. Epiphytic plants are those that establish on other plants, which are denominated of phorophyte, using them only as support, without any parasitism. It is believed that the phorophyte may exert some kind of influence on the mycorrhizal community. Thus, understanding the association between fungi and orchids is very important, as well the diversity of fungi associated with adult orchids in nature, provides important information for conservation and management of populations, especially those with a risk of extinction. The profile of the fungal community associated with the roots of three orchid species: *Cattleya jongheana*, *Prosthechea allemanoides* and *Epidendrum chlorinum* growing on the trunks of *Vellozia auriculata* in Parque Estadual da Serra Negra - Itamarandiba / MG was determined. Using the DGGE technique, the profile of the fungal community present in the different orchid species was evaluated, and also was evaluated if the profile of the fungal community of the orchid resembled the profile of the phorophyte community. The diversity indexes of Shannon and Simpson showed that, even though there is similarity in the profile of the fungal community, it differs among orchid species and that the profile of the root community is different from the profile of the phorophyte community. It was concluded that knowing, isolating and characterizing fungi associated with each orchid species is important for orchid re-introduction and management.

## 1. Introdução

A família Orchidaceae é uma das maiores e mais diversas dentro das angiospermas (Dressler, 2004; Jones, 2006) em que mais de 27.000 espécies são estimadas em todo o globo (The Plant List, 2017). Essa família é considerada cosmopolita por ocorrer em diversos habitats, estando presente desde os trópicos até os desertos (Smith & Read, 2002). No Brasil, aproximadamente 236 gêneros e 2.437 espécies de orquídeas foram catalogadas, em que 65 gêneros e 1.627 espécies são endêmicas nos diferentes biomas (Barros *et al.*, 2012). Os biomas Cerrado e Mata Atlântica exibem uma alta diversidade de espécies de orquídeas (Barros *et al.*, 2012). Adicionalmente, esses dois biomas são considerados *hotspots* de biodiversidade na América do Sul por apresentarem um alto número de espécies endêmicas e por estarem entre os ambientes mais ameaçados do mundo (Myers *et al.*, 2000). Muitas espécies de orquídeas se encontram em risco de extinção devido a coleta ilegal, pelo seu potencial ornamental, e destruição de seu habitat natural. A espécie *Cattleya jongheana* é um exemplo de orquídea com grande beleza e que se encontra em perigo no livro vermelho das espécies em extinção (Martinelli & Moraes, 2013).

É sabido que na natureza as plantas se associam com fungos e, entre os principais tipos de associações entre fungos e plantas, destacam-se os endofíticos e os micorrízicos (Azevedo, 1998). Os fungos endofíticos estão presentes dentro do tecido da planta e eles podem persistir em associação até a fase adulta da planta (Azevedo, 1998; Smith & Read, 1997). Eles também podem fornecer proteção contra patógenos, bem como promover crescimento pela produção de fitohormônios ou aumentar a absorção de nutrientes (Smith & Read, 1997; Yagame & Masahide, 2008; Khan *et al.*, 2012). Os fungos micorrízicos são também endofíticos, porém encontram-se apenas na raiz da planta adulta, ficando evidenciado pelo nome da associação que significa “fungo de raiz” (do grego *mykes* – fungo e *rhiza* – raiz) (Antoniolli, 1991).

Nas orquídeas, essa associação com fungos é muito importante, principalmente a associação micorrízica, devido aos nutrientes fornecidos pelo fungo que são essenciais à germinação e sobrevivência das orquídeas na natureza. Uma característica comum das orquídeas é a alta produção de sementes semelhantes a pó, chamadas de “dust seeds” (Peterson *et al.*, 1998; Rasmussen, 2002). Essas sementes não possuem endosperma - tecido de reserva nutricional essencial para o desenvolvimento inicial do embrião. Assim, as sementes de orquídea necessitam da associação com fungos micorrízicos os quais irão fornecer nutrientes essenciais como carbono, fósforo e

nitrogênio para a germinação da semente (Otero *et al.*, 2007; Heijden *et al.*, 2015; McCormick *et al.*, 2016).

A competição, a sobrevivência e a distribuição das orquídeas em seu ambiente natural são influenciadas pela variedade de fungos micorrízicos compatíveis (McCormick *et al.*, 2016). A diversidade desses fungos pode variar de acordo com o habitat ou estágio de vida da planta, ou ainda onde elas ocorrem, no solo, em cascas de plantas, ou em rochas. Assim, grupos de fungos micorrízicos colonizadores podem ser diferentes entre plantas jovens e adultas (Rasmussen 1995; Currah *et al.*, 1997; Brundrett, 2006).

A especificidade dos fungos micorrízicos pode limitar a distribuição das espécies de orquídea (McCormick *et al.*, 2016). Algumas orquídeas se distribuem por vários habitats, o que pode ser explicado pela baixa especificidade na associação com fungos micorrízicos. Por outro lado, muitas das orquídeas são restritas a determinados habitats, devido a sua alta especificidade na associação entre a planta e os fungos micorrízicos (Bonardeaux *et al.*, 2007; Araujo *et al.*, 2013). Assim, plantas que se associam com um alto número de espécies de fungos, colonizam novos e diferentes habitats mais facilmente, do contrário as plantas podem ser raras ou restritas a determinados locais (Swarts & Dixon, 2009; Pereira & Valadares, 2009).

Plantas epífitas são aquelas que estabelecem uma relação com outras plantas, chamadas forófitos, utilizando-as como substrato para fixação sem parasitá-las (Benzing, 1990). As orquídeas epífitas são ainda pouco estudadas e acredita-se que a disponibilidade de forófitos compatíveis pode ter alguma influência na distribuição das orquídeas (Withner, 1974; Huda *et al.*, 2011). As associações entre fungos e orquídeas epífitas são mais conservadas e coevoluíram mais restritamente que a associação entre os fungos e orquídeas terrestres (Martos *et al.*, 2012). Essa evolução mais restrita pode ter sido causada por condições mais estressantes do habitat epifítico comparado ao terrestre, como seca, alta exposição à luz e baixa disponibilidade de nutrientes (Martos *et al.*, 2012). Assim, de acordo com o habitat, a diversidade de fungos que interage com a orquídea também pode ser diferente, devido ao ambiente que a orquídea está inserida, como, composição do substrato, temperatura e altitude (Rasmussen, 1995;

Araujo *et al.*, 2013). Além disso, a especificidade de fungos micorrízicos durante a fase de germinação parece ser geralmente mais restrita do que em plantas adultas (Jacquemyn *et al.*, 2011; 2015).

Entender a associação que fungos estabelecem com orquídeas na natureza é muito importante. Determinar a comunidade fúngica associada com as raízes de orquídeas epífitas adultas em seu ambiente natural fornece informações importantes para trabalhos de conservação e manejo da população, o que viabiliza a produção de mudas para reintrodução em seu habitat natural, especialmente aquelas com risco de extinção (Rasmussen, 2002; Dearnaley, 2007; Martos *et al.*, 2012; Cowden & Shefferson, 2013).

Diferentes espécies de orquídeas podem coexistir, no entanto, pouco se sabe sobre os simbiontes associados a orquídeas em um mesmo lugar (Jacquemyn, 2014). Alguns trabalhos, com espécies terrestres, sugerem que as orquídeas coexistentes apresentam diferentes perfis de fungos associados (Waud *et al.*, 2014; 2016), no entanto, não existem muitos estudos que relatem este padrão fúngico em espécies de orquídeas epífitas.

Nesse estudo, tivemos o objetivo de avaliar o perfil da comunidade fúngica de três espécies de orquídeas epífitas ocorrendo sobre *Vellozia auriculata* Mello-Silva & N.L.Menezes, utilizando a técnica de DGGE. Nós endereçamos as seguintes questões: 1) As espécies de orquídeas que co-ocorrem exibem perfis semelhantes na comunidade de fungos? 2) O perfil da comunidade na raiz de orquídea é o mesmo encontrado no forófito

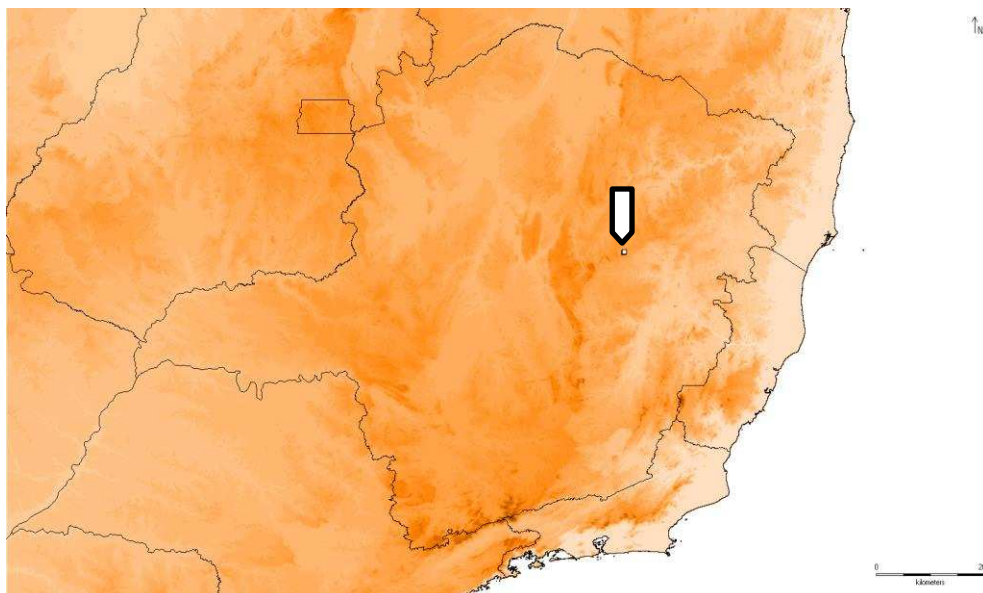
## **2. Material e métodos**

### **2.1 Local de coleta**

O Parque Estadual da Serra Negra (PESN) está incluído na Cadeia do Espinhaço, no município de Itamarandiba, MG (Figura 1). O relevo montanhoso e aparência escura dominam a paisagem local, característica que levou ao nome do parque (IEF 2016). Sua vegetação é representada pelos biomas Cerrado, Mata Atlântica e Campo Rupestre (Pacheco, 2012; Ferreira & Fagundes, 2014; IEF 2014; 2016).

O campo rupestre, com solo arenoso, apresenta uma vegetação com alta densidade da espécie arbustiva *Vellozia auriculata*, pertencente à família Velloziaceae (IEF, 2016) incluída no grupo das monocotiledôneas, onde é observado muitas espécies de orquídeas epífitas associadas (Kubitzki, 1998). *Vellozia auriculata* parece ser endêmica na região e pode ser encontrada entre as bacias do Rio Jequitinhonha e

Rio Doce, nos distritos de Rio Vermelho e Itamarandiba, MG (Mello-Silva & Menezes, 1999).



**Figura 1 – Local de coleta das amostras.** Parque Estadual da Serra Negra no município de Itamarandiba/MG.

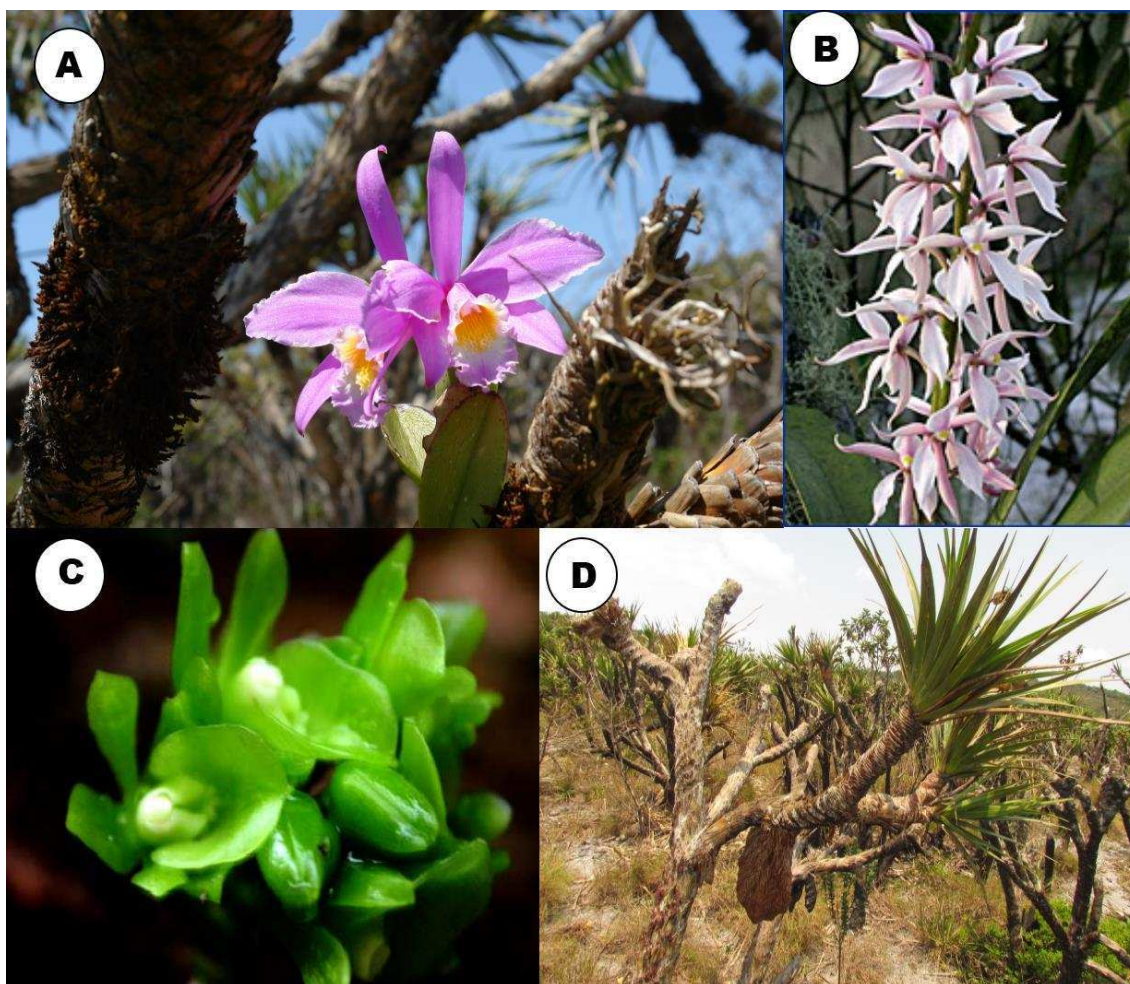
## 2.2 Delineamento experimental

Foram investigadas três espécies de orquídeas *Cattleya jongheana* (Rchb.f.) Chiron & V.P.Castro, *Prosthechea allemanoides* (Hoehne) W.E.Higgins e *Epidendrum chlorinum* Barb. Rodr, crescendo nos troncos da espécie arbustiva *V. auriculata*, localizadas no Parque Estadual da Serra Negra – Itamarandiba/MG.

Amostras do sistema radicular das três espécies de orquídea *C. jongheana* (Figura 2A), *P. allemanoides* (Figura 2B), *E. chlorinum* (Figura 2C) e casca de forófito (*V. auriculata*) (Figura 2D) adjacentes às raízes foram coletadas aleatoriamente. A coleta ocorreu no início da estação chuvosa em novembro de 2015.

Foram coletadas 30 amostras de raízes de orquídeas, sendo 10 de cada espécie e 30 amostras de casca do forófito (*V. auriculata*) sob a orquídea, totalizando 60 amostras para avaliação da diversidade fúngica. Para fim de comparação foram coletadas também 10 amostras de *V. auriculata*, onde não havia nenhuma orquídea epífita.

Os fragmentos do sistema radicular foram seccionados transversalmente a mão livre e colocados em microtubos contendo 200  $\mu$ L de tampão de lise, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), e armazenados a -20 °C até a realização da extração de DNA.



**Figura 2 – Exemplo de flores de orquídeas coletadas sob o forófito *Vellozia auriculata*, no Parque Estadual da Serra Negra, em Itamarandiba, MG. A) *Cattleya jongheana* (foto: Melissa Bocayuva); B) *Prosthechea allemanoides* (foto: N. L. Abreu); C) *Epidendrum chlorinum* (foto: Americo Docha Neto); D) *Vellozia auriculata* (foto: Leticia Miranda).**

## 2.3 Análise molecular

### 2.3.1 Extração de DNA

O DNA total das amostras foi extraído utilizando o kit NucleoSpin® Soil - MACHEREY-NAGEL, de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi verificado por eletroforese em gel de agarose 0.8 % e depois visualizado

com Brometo de Etídio sob luz UV no fotodocumentador (Loccus Biotecnologic L-Pix Chemi). As amostras de DNA total foram então armazenadas a -20 °C para análises posteriores.

### 2.3.2 Amplificação da região 5.8S-ITS2

Inicialmente o par de oligonucleotídeos ITS1F-ITS4OF (Gardes & Bruns, 1993) (Tabela 1) foi utilizado para amplificar a região ITS1, 5.8s e ITS2 do rDNA dos fungos presentes nas amostras de sistema radicular e casca do forófito, utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A partir do produto da primeira amplificação, a reação de Nested PCR foi realizada utilizando o par de oligonucleotídeos ITS86F-ITS4GC (Tabela 1) que amplifica a região 5.8s e ITS2.

**Tabela 1:** Sequências dos primers usados.

<b>Primer</b>	<b>Sequencia (5'-3')</b>	<b>Referência</b>
<b>ITS 1F –F</b>	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes and Bruns (1993)
<b>ITS4 OF – R</b>	GTTACTAGGGGAATCCTTGTT	Taylor&McCormick(2008)
<b>ITS 86F –F</b>	GTGAATCATCGAATCTTTGAA	Turenne et al. (1999)
<b>ITS 4 GC –R</b>	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGG GCGGGGGCACGGGGGGTTCCTCCGCTTA TTGATATGC	White et al. (1990)

A primeira reação de PCR e o Nested PCR foram realizados para obtenção de um volume final de reação de 50 µL contendo: 60ng de DNA, 5µM de cada primer, GoTaq DNA Polimerase (5u/µL) (Promega, USA), Tampão (5X), MgCl<sub>2</sub> (25 mM), dNTPs (10 mM). Os ciclos da primeira PCR consistiram de uma temperatura inicial de desnaturação de 95°C por 2 min, seguida de 39 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min e 72°C por 1 min, e uma extensão final de 72°C por 7 min. As condições de reação do Nested PCR foram: temperatura inicial de desnaturação de 94°C por 2 min seguido de 40 ciclos de 94°C por 45 s, 55°C por 45 s, e 72°C por 45 s, e uma extensão final de 72°C por 10 min. A reação de PCR foi realizada em um termociclador (Mastercycler Eppendorf) e para confirmar os produtos amplificados, alíquotas de 5 µL foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,2 % e visualizadas com Brometo de Etídio sob luz UV no fotodocumentador (Loccus Biotecnologic L-Pix Chemi).

## 2.4 DGGE

Para determinar o perfil da comunidade fúngica, os produtos da reação de Nested PCR, realizado com o par de primers ITS86F - ITS4GC (com 350 pares de base) foram submetidos à técnica de DGGE, que é baseado na mobilidade eletroforética de moléculas de DNA parcialmente desnaturadas em géis de poliacrilamida em um gradiente desnaturante formado pela mistura de uréia e formamida. O DGGE foi realizado no equipamento DCode™ System model (BIO-Rad, California, USA).

Seis amostras de fungos endofíticos de raízes de orquídea pertencentes a coleção do Laboratório de Associações Micorrízicas foram utilizadas como marcadores externos. Um volume de 20 µL da mistura de DNA desse marcador foi usado para análise de DGGE. Também foi aplicado no gel de poliacrilamida 8% (w/v) em tampão 1 X Tris-acetate-EDTA (TAE), 20 µL do produto de PCR Nested. O gel foi preparado em um gradiente desnaturante variando de 30% a 55% (onde 100% de desnaturação corresponde a concentração de 7 mol/L de ureia 40% de formamida). O gel foi submetido à uma eletroforese vertical a 120 V por 10 min, seguido de 100 V por 12 h a 60 °C. Em seguida, o gel foi corado por 40 minutos submerso em tampão TAE com 20 µL SYBR GOLD® (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) e visualizado sob luz UV utilizando o fotodocumentador (Loccus Biotechnologic L-Pix Chemi).

## 2.5 Análise de dados

O perfil da comunidade microbiana entre as diferentes espécies de orquídea foi determinado pela presença ou ausência de bandas detectadas no gel de DGGE. Para esse propósito, os géis foram analisados e comparados utilizando o software BioNumerics® (Versão 6.0 Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Com esse software foram realizadas normalizações, conversões e comparações das imagens dos géis em matrizes de presença/ausência e intensidade de bandas. A normalização e seleção de bandas foram avaliadas e correções manuais foram feitas quando necessárias. O programa gerou matrizes binárias considerando presença (1) ou ausência (0) de bandas individuais, as quais foram utilizadas para gerar uma matriz de distância utilizando o coeficiente de Dice, que separa as amostras em grupos que compartilham características a partir de uma matriz de similaridade considerando o número total de

bandas presentes e as bandas em comum nas amostras comparadas (Alves *et al.*, 2007; Brucha, 2007). Dendrogramas foram obtidos por análise de agrupamento pelo método UPGMA.

### **2.5.1 Análise numérica**

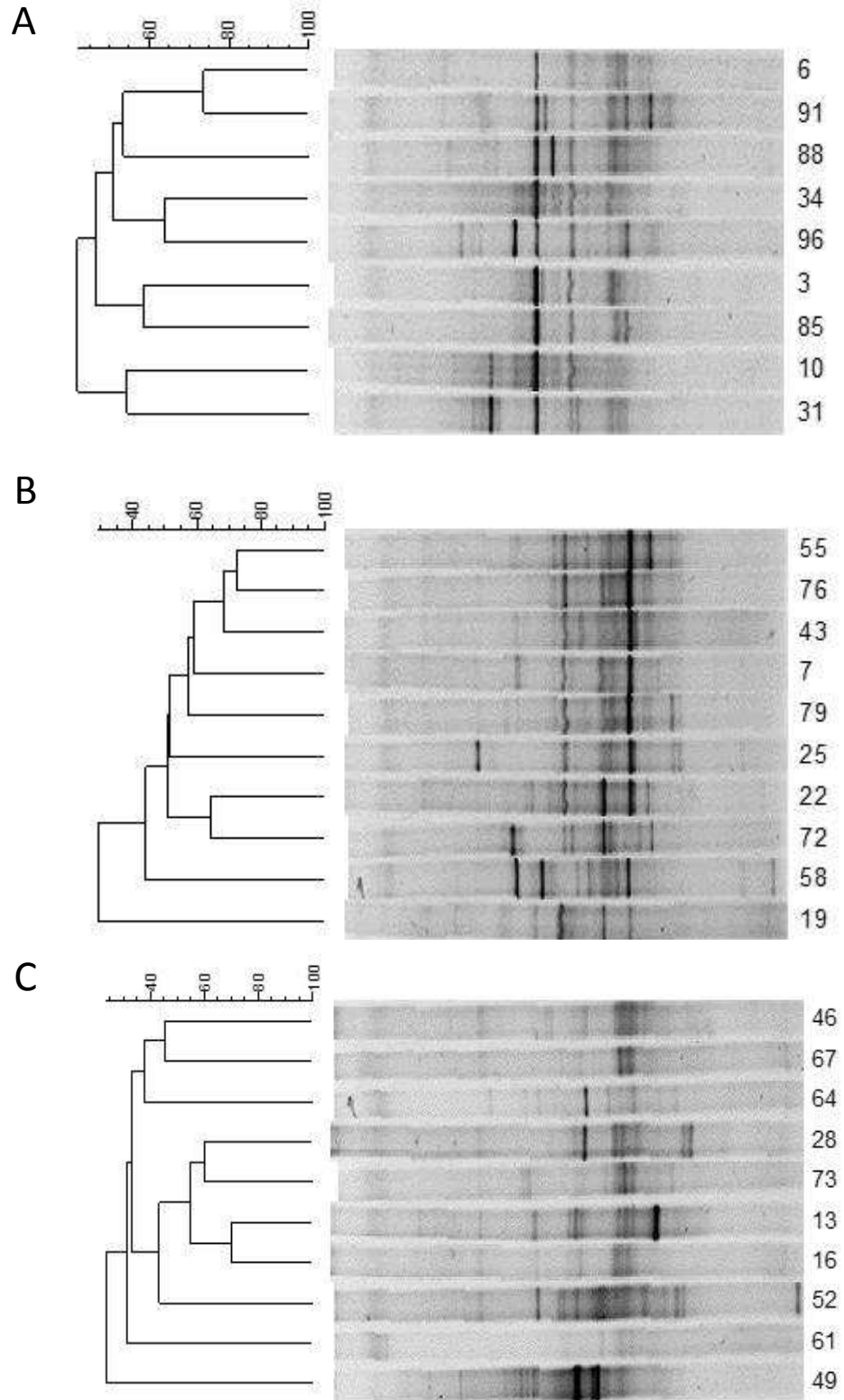
As matrizes binárias, obtidas a partir dos géis do DGGE foram analisadas utilizando dois índices de diversidade para obter múltiplos aspectos da diversidade microbiana. O índice de diversidade de Shannon-Wiener (H) (Shannon & Weaver, 1963) e o índice de Simpson (S) (Simpson, 1949) que foram calculados utilizando o software Past, versão 3.14.

## **3. Resultados**

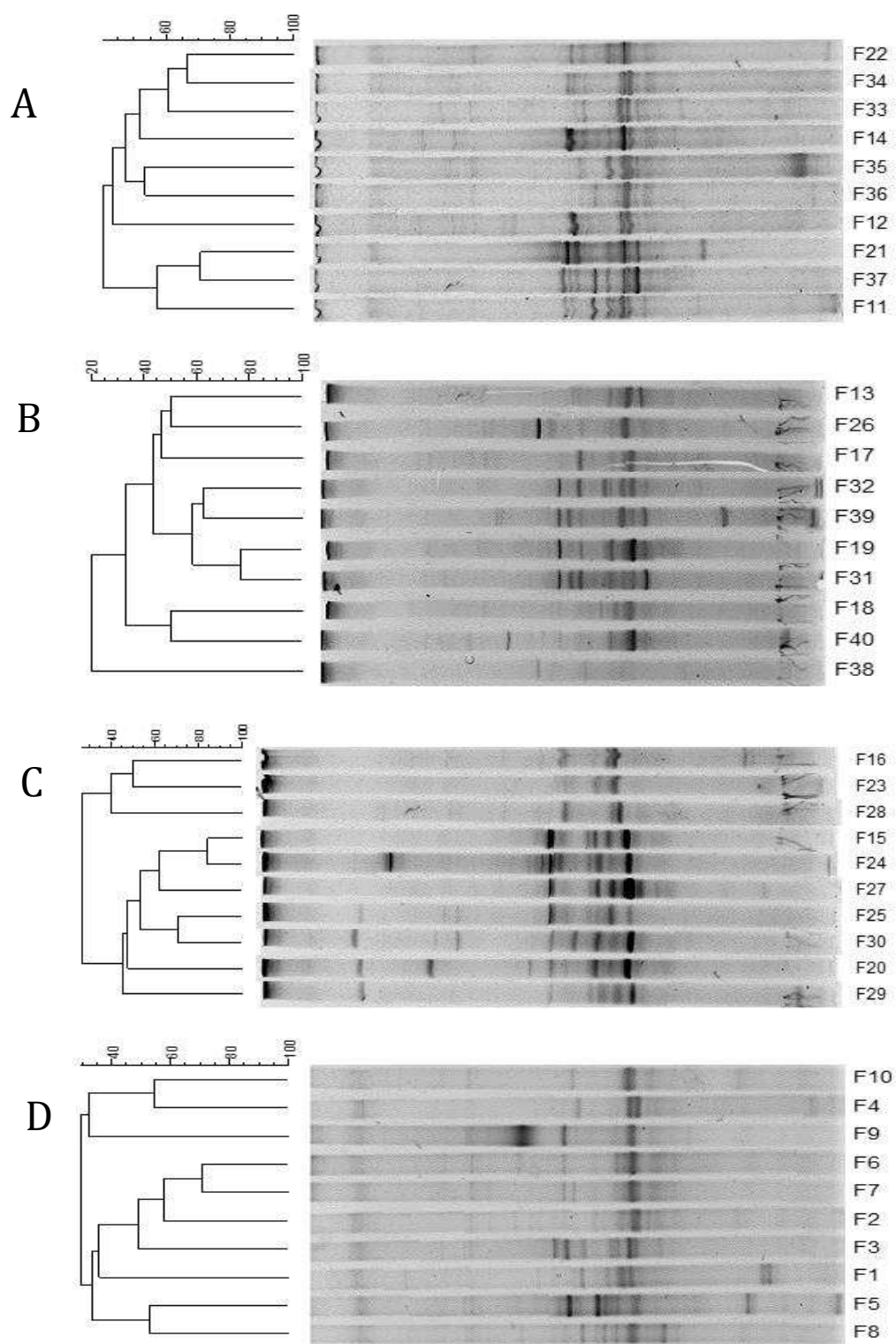
### **3.1 Análise de comunidade fúngica de raiz e de forófito**

Análises da região ITS do rDNA a partir da técnica de DGGE foi utilizada para investigar a diversidade nas comunidades das raízes de *C. jongheana*, *P. allemanoides* e *E. chlorinum* e seus forófitos correspondentes. A partir das matrizes binárias foram obtidos sete géis, um para cada espécie de orquídea (Figuras 3A-C), um para cada forófito correspondente à cada orquídea (Figuras 4A-C), além de um gel para amostras de forófitos onde não haviam orquídeas epífitas (Figura 4D).

Observamos uma grande diversidade na comunidade fúngica mesmo dentro de uma mesma espécie de orquídea, não sendo formado nenhum agrupamento com mais que 60% de similaridade (Figuras 3C), que é um valor limite a partir do qual as amostras apresentam similaridade. Poucas amostras ficaram próximas entre si, com uma similaridade maior que 60%.



**Figura 3 – Agrupamentos e géis de DGGE.** Agrupamentos obtidos com base no Coeficiente de Dice e no algoritmo UPGMA definidos a partir dos padrões de bandas obtidos por DGGE para análise da comunidade de fungos de três espécies de orquídeas: A) *Prosthechea allemanoides*; B) *Epidendrum chlorinum* e C) *Cattleya Jongheana*. A barra de similaridade indica a porcentagem em que uma amostra é similar a outra. Os números à direita indicam o código de cada raiz coletada.



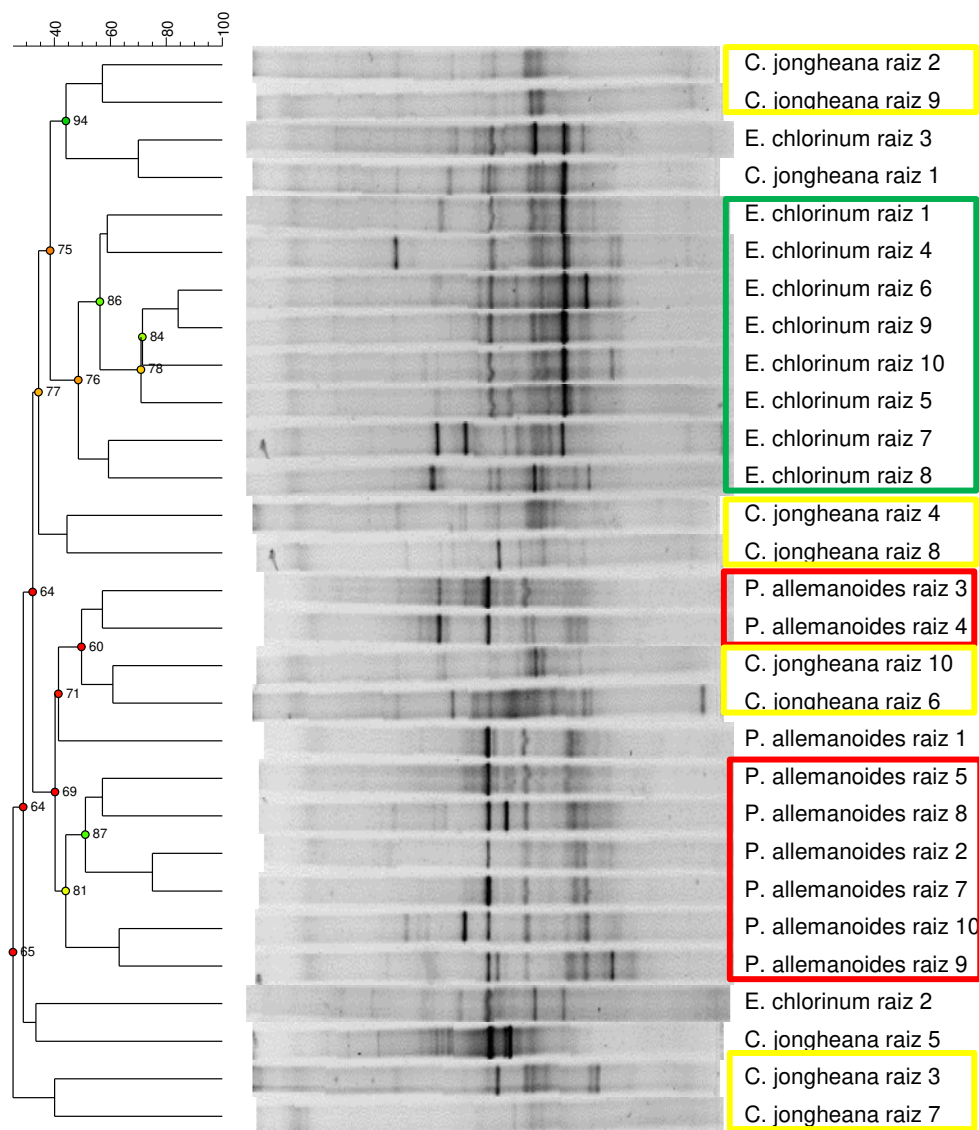
**Figura 4 – Dendrogramas e géis de DGGE.** Agrupamentos com base no Coeficiente de Dice e algoritmo UPGMA definidos a partir dos padrões de bandas obtidos por DGGE para análise da comunidade de fungos em forófitos que possuíam as três espécies orquídeas: A) Forófito + *Prosthechea allemanoides*; B) Forófitos + *Epidendrum chlorinum*; C) Forófitos + *Cattleya jongheana* e D) Forófito sem

orquídea. A barra de similaridade indica a porcentagem em que uma amostra é similar a outra. Os números à direita indicam o código de cada forófito coletado.

A comunidade fúngica presente nos forófitos também apresentou uma baixa similaridade dentro da comunidade, assim como observado nas raízes. Apenas os perfis de comunidade das amostras de forófito onde tinha a espécie de orquídea *C. jongheana* (Figura 4C) e das amostras de forófito onde não tinha nenhuma espécie de orquídea (Figura 4D) formaram dois agrupamentos (com menos que 40% de similaridade), demonstrando que cada comunidade compartilha indivíduos entre si, ainda que com uma baixa similaridade.

### **3.2 Análise de agrupamento das raízes entre as espécies**

Além de analisar cada gel separadamente, foi possível fazer análise de agrupamento entre as amostras de raízes das três diferentes espécies de orquídea (Figura 5). Com o dendograma obtido a partir de amostras das três espécies de orquídeas observou-se uma estruturação nas comunidades de *P. allemanoides* e *E. chlorinum* em que é formado um agrupamento cada, com aproximadamente 50% de similaridade, quadro vermelho maior e quadro verde, respectivamente (Figura 5). Com isso, nota-se um compartilhamento dentro de uma mesma comunidade dessas duas espécies e um baixo compartilhamento entre espécies diferentes de orquídeas. Entretanto, a comunidade de raiz da espécie *C. jongheana* apresentou pequenos grupos separados (quadros amarelos), indicando baixa similaridade entre os diferentes indivíduos, sugerindo que essa espécie seja mais generalista em sua associação, quando comparada às outras espécies do estudo.

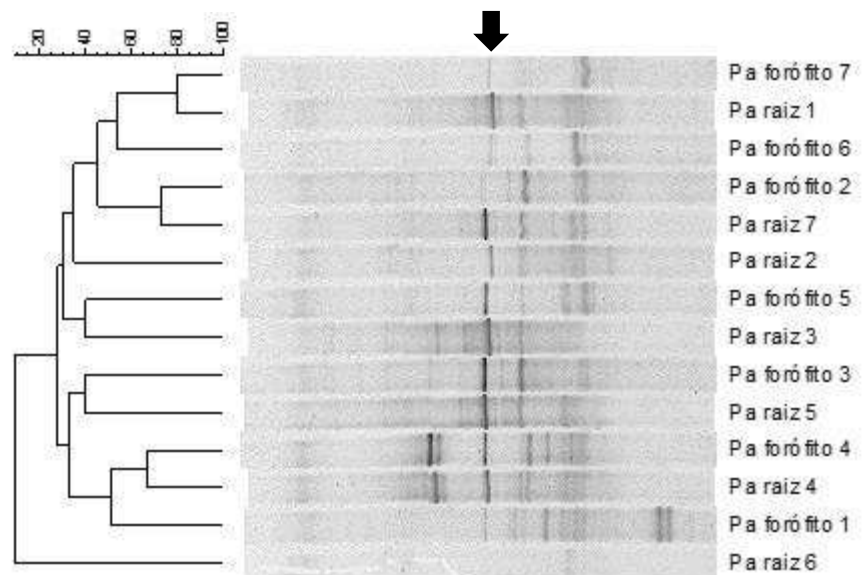


**Figura 5** – Agrupamento de raízes das três espécies de orquídeas estudadas *P. allemanoides*, *E. chlorinum* e *C. jongheana*. Análise de agrupamento (Coeficiente de DICE) obtido pelo perfil de bandeamento de DGGE de raízes de orquídea feito a partir da análise comparativa entre três géis de três espécies diferentes de orquídea *E. chlorinum* (quadro verde), *P. allemanoides* (quadros vermelhos) e *C. jongheana* (quadros amarelos).

### 3.3 Análise de raízes com seu forófito correspondente:

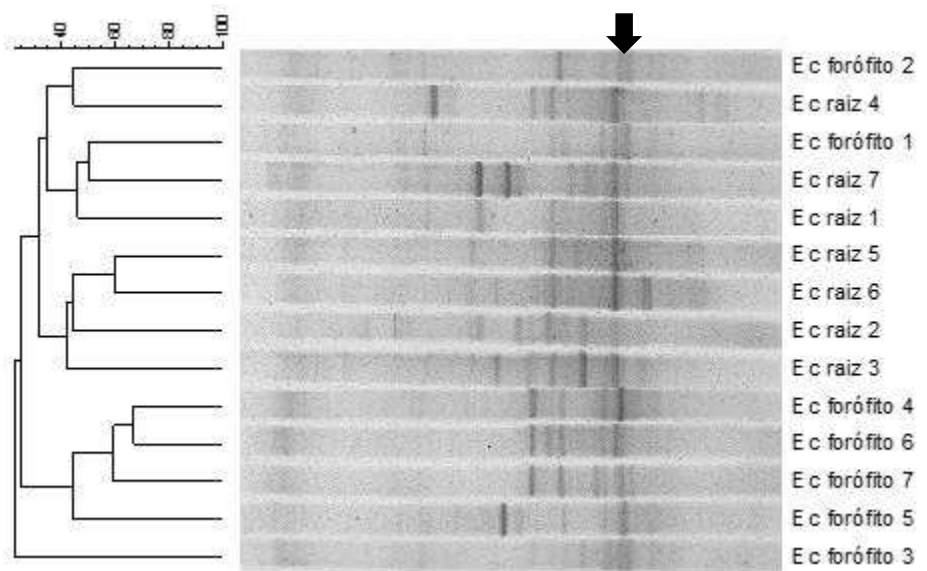
Outra análise entre as raízes de cada espécie de orquídea e seu forófito correspondente foi realizada (Figuras 6, 7 e 8). As comunidades de raízes e de forófitos não foram diferenciadas entre si, uma vez que não se mostraram agrupadas separadamente.

No dendrograma de raiz de *P. allemanoides* e seu forófito correspondente (Figura 6), a porcentagem de similaridade em todas as amostras é de 20%, o que nos mostra que mesmo que haja agrupamento da comunidade presente na raiz, com indivíduos presentes no forófito, a similaridade foi muito baixa. Também foi observado que o fragmento de raiz 4 agrupou com o forófito 4 (70% de similaridade), mostrando que a raiz e seu forófito correspondente apresentavam uma colonização semelhante.



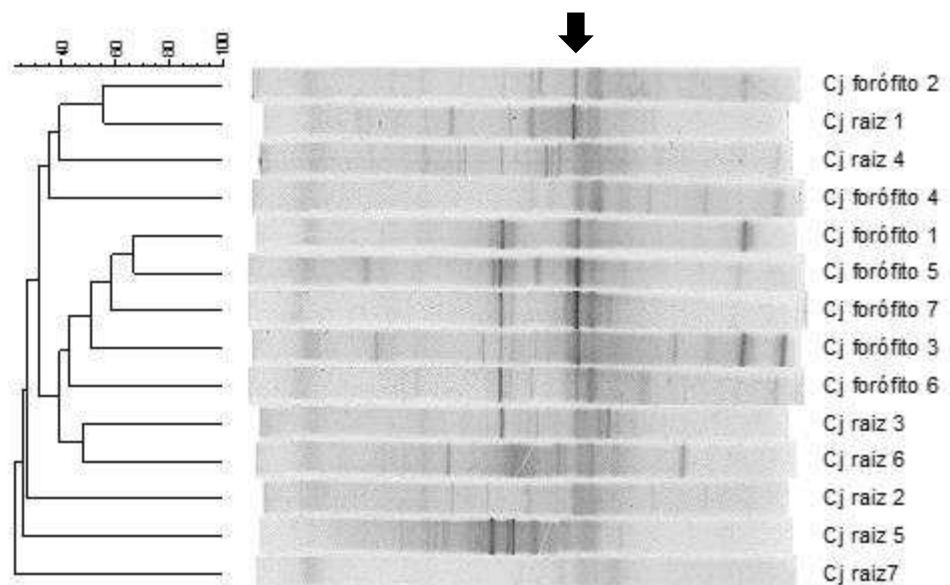
**Figura 6** - Dendrograma e Gel de raiz de *P. allemanoides* e forófito onde ela crescia. Dendrograma e gel obtidos a partir da análise de agrupamento (Coeficiente de DICE) obtido pelo perfil de bandeamento de DGGE de amostras de raiz e forófito onde havia a presença da espécie *P. allemanoides* (Pa). A seta preta indica as bandas que apareceram em todas as amostras.

Já na raiz de *E. chlorinum* e seu forófito correspondente (Figura 7) há a formação de um agrupamento de raízes e um outro de forófito, mas ambos os grupos apresentaram similaridade menor que 50%.



**Figura 7** - Dendrograma e Gel de raiz de *E. chlorinum* e do forófito onde ela cresce. Dendrograma e gel obtidos a partir da análise de agrupamento (Coeficiente de DICE) obtido pelo perfil de bandeamento de DGGE de amostras de raiz e forófito onde havia a presença da espécie *E. chlorinum* (Ec). A seta preta ressalta bandas que apareceram em todas as amostras.

No caso de raiz de *C. jongheana* e seu forófito correspondente (Figura 8) nota-se a formação de dois grupos com baixa similaridade (40%). Há um compartilhamento fúngico entre raiz e forófito, mas é muito baixo. O que podemos afirmar que a comunidade não é idêntica.



**Figura 8** - Dendrograma e gel obtidos a partir da análise de agrupamento (Coeficiente de DICE) obtido pelo perfil de bandeamento de DGGE de amostras de raiz e forófito onde havia a presença da espécie *C. jongheana* (Cj). A seta preta ressalta bandas que apareceram em todas as amostras.

### 3.4 Análise numérica

O índice de Shannon, utilizado para calcular a diversidade na comunidade de fungos presentes na raiz e no forófito, variou de 1,8 a 2,3 (Tabela 2). O índice de Simpson, que também foi utilizado para calcular a diversidade na comunidade de fungos presentes na raiz e no forófito, variou de 0,82 a 0,90 (Tabela 2).

**Tabela 2 – Tabela de valores de média e desvio padrão das amostras coletadas.**  
Índices de diversidade de Shannon e Simpson das amostras de raiz das diferentes espécies de orquídea e seus forófitos correspondentes com seus valores médios e desvio padrão.

Índice	Amostras	Média	Desvio Padrão
Shannon	Raiz <i>C. jongheana</i>	2,2	0,29
	Raiz <i>P. allemanooides</i>	2,3	0,13
	Raiz <i>E. chlorinum</i>	2,3	0,17
	Forófito sem orquídea	2	0,24
	Forófito <i>P. allemanooides</i>	2,1	0,16
	Forófito <i>E. chlorinum</i>	1,8	0,03
	Forófito <i>C. jongheana</i>	1,9	0,38
Simpson	Raiz <i>C. jongheana</i>	0,89	0,03
	Raiz <i>P. allemanooides</i>	0,89	0,01
	Raiz <i>E. chlorinum</i>	0,9	0,02
	Forófito sem orquídea	0,86	0,03
	Forófito <i>P. allemanooides</i>	0,88	0,02
	Forófito <i>E. chlorinum</i>	0,82	0,21
	Forófito <i>C. jongheana</i>	0,85	0,06

### 4. Discussão

Na ecologia microbiana ter acesso a estrutura da comunidade presente no ambiente em estudo é um grande desafio. A técnica de DGGE permite investigar diferenças no perfil da comunidade (Nakatsu, 2004). No presente trabalho fizemos um perfil comparativo entre três espécies de orquídea utilizando a técnica de DGGE, que nos mostrou uma alta diversidade de fungos em associação com as espécies de orquídeas. Entretanto, o compartilhamento de fungos entre as diferentes espécies de orquídeas foi restrito. Além disso, o perfil de fungos encontrado na raiz da orquídea diferiu do perfil encontrado no forófito.

A primeira questão que endereçamos foi se havia semelhança nos perfis fúngicos entre as espécies de orquídeas que ocorrem em mesmo ambiente. Análises de

agrupamento, como o UPGMA, nos permite agrupar amostras com padrões semelhantes (Gafan *et al.*, 2005). A partir de análise entre as raízes de *E. chlorinum*, *C. jongheana* e *P. allemanoides*, observamos baixa similaridade entre elas, assim não podemos afirmar que as comunidades de diferentes raízes foram semelhantes. Quando duas ou mais espécies de orquídeas coexistem, elas competem por recursos e a comunidade micorrízica pode ser determinante para coexistência dessas espécies (McCormick & Jacquemyn, 2014; Jacquemyn *et al.*, 2016). A distribuição das orquídeas epífitas pode ser afetada, então, pela distribuição dos fungos micorrízicos (Otero *et al.*, 2002). As diferenças na composição da comunidade colonizadora podem minimizar a competição por uma mesma fonte de nutrientes (Waterman *et al.*, 2011). Assim, é provável que a diferenciação nas comunidades estudadas tenha sido uma alternativa de sobrevivência dessas espécies de orquídeas que, por coexistirem, já competem por outros nutrientes (McCormick & Jacquemyn, 2014).

Além desse papel na coexistência, os fungos micorrízicos são essenciais para germinação e estabelecimento das orquídeas na natureza (Azevedo, 1998). A comunidade microbiana da raiz da orquídea *C. jongheana* formou quatro grupos menores e distantes enquanto as demais orquídeas apresentaram um grupo maior cada uma das espécies (Figura 5). 7 apresentou a comunidade fúngica mais diversificada e que essa orquídea pode ser bastante generalista quanto às espécies de fungos micorrízicos para sua germinação. Estudos de germinação são necessários para comprovar se essa espécie pode germinar em presença de várias espécies de fungos micorrízicos, entretanto, esse fato já pode ser um importante indício.

A associação com uma comunidade de fungos diversa influencia na persistência e vulnerabilidade das orquídeas (Oliveira *et al.*, 2014). Essa alta diversidade nas comunidades fúngicas associadas a essas plantas oferece flexibilidade na adaptação das plantas à ambientes adversos (Oliveira *et al.*, 2014) sobretudo em epífitas, que estão sempre sujeitas à alta luminosidade, exposição ao vento e seca. Para a espécie *C. jongheana*, isso é ainda mais vantajoso por se tratar de uma planta em risco de extinção (Martinelli & Moraes, 2013). Assim, ter baixa especificidade na associação ou apresentar grande variabilidade de fungos associados, pode ajudá-la a não ficar restrita a habitats particulares e então reduzir o risco de extinção.

Nós utilizamos também outra análise de diversidade para comparação entre as comunidades fúngicas das raízes, como os índices de diversidade, que são úteis para estimar a diversidade de comunidades microbianas (Kennedy & Smith, 1995). Esses

índices indicam se as comunidades são diferentes (Øvreås & Torsvik, 1998). Os valores de Shannon e Simpson ficaram próximos e elevados em todas as amostras (Tabela 2), o que revela alta diversidade nas comunidades fúngicas. Mesmo que os valores dos índices de diversidade sejam quase equivalentes, é possível que a estrutura da comunidade seja diferente uma da outra (Gafan *et al.*, 2005). Uma equivalência nos índices de diversidade revela equilíbrio das comunidades microbianas (Eichner *et al.*, 1999).

A segunda questão foi se havia semelhança entre a comunidade na raiz da orquídea e a comunidade no forófito. Inicialmente, nossa hipótese foi a de que raiz e forófito apresentariam comunidade fúngica semelhantes entre si, pois estariam mais próximas fisicamente – e as amostras do forófito foram de fato retiradas debaixo da orquídea. Entretanto, o estudo da relação da orquídea com o forófito nos mostrou um baixo compartilhamento de espécies de fungos entre ambos, o que sugere que não há influência do forófito na comunidade fúngica associada à raiz. Porém, algumas espécies de orquídea podem ter alguma preferência e o forófito pode influenciar na associação micorrízica embora seja um evento raro e ainda sem maiores esclarecimentos (Gowland *et al.*, 2011).

O presente trabalho é o primeiro a mostrar em espécies epífitas de orquídeas a relação de comunidades fúngicas de raiz e de forófitos. Porém, trabalhos de sequenciamento ainda devem ser realizados para fornecer dados quantitativos e qualitativos a respeito das espécies micorrízicas associadas a orquídeas coexistentes e a influência do forófito na comunidade. Entender a diversidade de simbiontes é importante para programas de conservação *in situ* e programas de reintrodução de espécies, principalmente aquelas ameaçadas de extinção, como é o caso de *C. jongheana*. É com o conhecimento das comunidades fúngicas que se pode realizar a seleção de isolados fúngicos, para então fazer germinar as espécies de orquídeas a serem conservadas.

## 5. Conclusões

- A diferenciação observada nas comunidades fúngicas pode ter sido uma alternativa de sobrevivência das espécies de orquídeas que, por coexistirem, já competem por outros nutrientes.

- A espécie *C. jongheana* apresenta comunidade fúngica mais diversificada, e o fato de ser generalista pode ajudá-la a não ser extinta, apesar de estar restrita a algumas regiões.
- Não há evidências de que o forófito influencie na comunidade fúngica associada à raiz.
- Conhecer, isolar e caracterizar os fungos que se associam à cada espécie de orquídea é importante para trabalhos de reintrodução e manejo das orquídeas.

## 6. Referências

- Alves LB, Belderrain MCN, Scarpel RA. 2007. Tratamento multivariado de dados por análise de correspondência e análise de agrupamentos. Anais. 13 Encontro de Iniciação Científica e Pós-Graduação do Instituto Tecnológico da Aeronáutica – XIII Encita 2007.
- Antoniolli ZI, Kaminski J. 1991. Micorrizas. Ciência Rural. V1, n3, P 441-455.
- Araújo LG, Pereira MC, da Silva RB, Sousa I, Luzini AP, Carvalho JCB. 2013. Fungos Micorrízicos: Conservação de orquídeas e biocontrole de fitopatógenos. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, 21: 153-206.
- Azevedo JL. 1998. Ecologia Microbiana. Eds. Embrapa – CNPMA: Jaguariuna.
- Barros F, Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN, Pessoa EM. 2012. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Benzing DH. 1990. Vascular epiphytes. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Bonnardeaux Y, Brundrett M, Batty A, Dixon K, Koch J, Sivasithamparam K. 2007. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. Mycological Research 111:51–61.
- Brucha G. 2007. Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do pentaclorofenol e na diversidade microbiana dos sedimentos enriquecidos no Estuário de Santos – São Vicente, Estado de São Paulo. 2007. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

- Brundrett MC. 2006. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: Schulz, Boyle, Sieber (eds), *Mycorrhizal Root Endophytes*. Springer Verlag, pp. 281–298.
- Cowden CC, Shefferson RP. 2013. Diversity of root-associated fungi of maure *Habenaria radiata* and *Epipactis thunbergii* colonizing manmade wetlands in Hiroshima Prefecture, Japan. *Mycoscience* 54: 327–334.
- Currah RS, Zelmer CD, Hambleton S, Richardson KA. 1997. Fungi from orchid mycorrhizas. In: *Orchid Biology: Reviews and Perspectives. VII.* (eds. J. Arditti and A.M. Pridgeon) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 117-170.
- Dearnaley JDW. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17: 475-486.
- Dressler RL. 2004. How many orchid species? *Selbyana* 26:155158.
- Eichner CA, Erb RW, Timmis KN, Dobler IW. 1999. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* 102-109.
- Gafan GP, Lucas VS, Roberts GJ, Petrie A, Wilson M, Spratt D. 2005. Statistical Analyses of Complex Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles. *Journal of clinical microbiology*, 3(8): 3971–3978.
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113–118.
- Gowland KM, Wood J, Clements MA, Nicotra AB. 2011. Significant phorophyte (substrate) bias is not explained by fitness benefits in three epiphytic orchid species. *American Journal of Botany* 98(2): 197–206
- Huda MK, Wilcock CC. 2011. Colonization and diversity of epiphytic orchids on trees in disturbed and undisturbed forests in the Asian tropics. *Gardens Bulletin Singapore*, 63: 341–356.
- Jacquemyn H, Honnay O, Cammue BPA, Brys R, Lievens B. 2011. Low specificity and nested subset structure characterise mycorrhizal associations in five-closely related species of the genus *Orchis*. *Mol Ecol* 19:4086–4095.
- Jacquemyn H, Brys R, Merckx VSFT, Waud M, Lievens B, Wiegand T. 2014. Coexisting orchid species have distinct mycorrhizal communities and display strong spatial segregation. *New Phytologist*, 202, 616-627.

- Jacquemyn H, Waud M, Merckx VSFT, Lievens B, Brys R. 2015. Mycorrhizal diversity, seed germination and long-term changes in population size across nine populations of the terrestrial orchid *Neottia ovata*. *Molecular Ecology* 24, 3269–3280.
- Jacquemyn H, Waud M, Lievens B, Brys R. 2016. Differences in mycorrhizal communities between *Epipactis palustris*, *E. helleborine* and its presumed sister species *E. neerlandica*. *Annals of Botany* 118: 105–114.
- Jones, DL. 2006. A complete guide to native orchids of Australia including the Island Territories. Reed New Holland, Sydney.
- Kennedy AC, Smith KL. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil*, v. 170, p. 75-86.
- Khan AL, Hamayun M, Kang SM, Kim YH, Jung HY, Lee JH, Lee IJ. 2012. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiology* 12, 3.
- Kubitzki JG. 1998. Velloziaceae. In: Kubitzki, J.G., Huber, H., Rudall, P.J., Stevens, P.S., Stutzel (eds.). *The Families and Genera of Vascular Plants. III. Flowering Plants – Monocotyledons. Liliaceae (except Orchidaceae)*, 459 – 467. Springer-Verlag, Berlin.
- Martinelli G, Moraes MA. 2013. Livro vermelho da flora do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1100p.
- Martos F, Munoz F, Pailler T, Kottke I, Gonneau C, Selosse MA. 2012. The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology*.
- McCormick MK & Jacquemyn H. 2014. What constrains the distribution of orchid populations? *New Phytologist*. 202: 392–400.
- McCormick MK., vanDL. Whigham, DF. Burnett RK. 2016. Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi. *J Ecol*.
- Mello-Silva R & Menezes NL. 1999. Two New Brazilian Velloziaceae, *Vellozia auriculata* and *Vellozia gigantea*, and a Key to the Related Dracenoideae Species of *Vellozia*. *Novon a journal for botanical nomenclature*, 9(4).
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.

- Nakatsu CH. Microbial community analysis. 2004. In D. Hillel et al. (ed.) Encyclopedia of soils in the environment. Elsevier, Oxford, Reino Unido, p. 455–463.
- Oliveira, SF., Bocayuva MF, Veloso TGR., Bazzolli DMS, Silva CC, Pereira OL, Kasuya MCM. 2014. Endophytic and mycorrhizal fungi associated with roots of endangered native orchids from the Atlantic Forest, Brazil. *Mycorrhiza*, vol. 24, p.55–64.
- Otero JT, Ackerman JD, Bayman P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia* -like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany* 89:1852 – 1858.
- Otero JT, Flanagan NS, Herre EA, Ackerman JD, Bayman P. 2007. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 94: 1944-1950.
- Øvreås L, Torsvik V. 1998. Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities. *Microbial Ecology*, v. 36, p. 303–315.
- Pereira MC, Valadares RBS. 2009. Diversidade e aplicação dos fungos micorrízicos de orquídeas brasileiras. *Biodiversidade em foco. Araucária Comunicação Integrada*. 78-87
- Peterson RL, Uetake Y, Zelmer C. 1998. Fungal symbioses with orchid protocorms. *Symbiosis* 25:2955.
- Rasmussen HN. 1995. *Terrestrial Orchids: From Seed to Mycotrophic Plant*. Cambridge, UK:Cambridge University Press.
- Rasmussen HN. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil* 244:149-163
- Shannon CE, Weaver W. 1963. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, IL.
- Simpson EH. 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163:688.
- Smith SE, Read DJ. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego, CA.
- Swarts ND, Dixon KW. 2009. Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science* 14: 590–598.

- Taylor LD, McCormick MK. 2008. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist* 177:1020–1033.
- The Plant List. 2017. The plant list, ver. 1. <http://www.theplantlist.org>. Accessed 2 Jan 2017.
- Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM. 1999. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1846–1851.
- Waterman RJ, Bidartondo MI, Stofberg J, Combs JK, Gebauer G, Savolainen V, Barraclough TG, Pauw A. 2011. The effects of above and belowground mutualisms on orchid speciation and coexistence. *American Naturalist* 177:54-68.
- Waud M, Busschaert P, Ruyters S, Jacquemyn H, Lievens B. 2014. Impact of primer choice on characterization of orchid mycorrhizal communities using 454 pyrosequencing. *Mol Ecol Resour.* 14(4):679-99.
- Waud M, Busschaert P, Lievens B, Jacquemyn H. 2016. Specificity and localised distribution of mycorrhizal fungi in the soil may contribute to co-existence of orchid species. *Fungal Ecology* (20) 155-165.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. Academic Press, New York.
- Withner CL, Nelson PK, Wejksnora PJ. 1974. The anatomy of orchids. In *The Orchids: scientific studies* (C.L. Withner, ed.). John Wiley, New York, p.267-334.
- Yagame T. & Yamato M. 2008. Isolation and identification of mycorrhizal fungi associated with *Stigmatodactylus sikokianus* (Maxim. ex Makino) Rauschert (Orchidaceae). *Mycoscience.* 49:388–391.