

RICARDO EUSTÁQUIO NOGUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
FUNGOS MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEAS**

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
2004

RICARDO EUSTÁQUIO NOGUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
FUNGOS MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEAS**

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: 26 de agosto de 2004.

Prof^ª Elza Fernandes de Araújo
(Conselheira)

Prof. Maurício Dutra Costa
(Conselheiro)

Prof^ª Marisa Vieira de Queiroz

Prof^ª Tânia Maria Fernandes Salomão

Prof^ª Maria Catarina Megumi Kasuya
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Capes, à Fapemig, aos professores e funcionários do DMB/UFV, ao professor Cássio van den Berg, Olinto Liparini Pereira, à professora Maria Célia da Silva Lanna e aos amigos de Ouro Preto, pelo auxílio imprescindível para a conclusão deste trabalho.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Amostragem.....	12
3.2. Isolamento	13
3.3. Caracterização morfológica	13
3.4. Atividade de polifenol-oxidases	13
3.5. Análise dos resultados dos estudos de morfologia	13
3.6. Extração do DNA, amplificação e sequenciamento da região ITS.....	14
3.7. Análise dos resultados dos estudos moleculares	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1. Filogenia molecular de isolados de <i>Ceratorhiza</i>	18
4.2. Filogenia molecular de isolados de <i>Epulorhiza</i>	21
5. CONCLUSÕES.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
APÊNDICE.....	33

RESUMO

NOGUEIRA, Ricardo Eustáquio, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2004. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de orquídeas.** Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Conselheiros: Maurício Dutra Costa e Elza Fernandes de Araújo.

As micorrizas são associações consideradas obrigatórias para as orquídeas que ocorrem em ecossistemas naturais, pois este grupo de plantas depende dos fungos tanto para a germinação quanto para o seu estabelecimento. O conhecimento da biodiversidade dos fungos que realizam a associação micorrízica com espécies de orquídeas brasileiras pode ser de grande importância para futuros programas de reintrodução, conservação e manejo dessa espécie vegetal. Assim, este trabalho teve por objetivo caracterizar morfológica e molecularmente alguns isolados fúngicos, do grupo rizoctonióides, de orquídeas neotropicais das regiões do Quadrilátero Ferrífero e Zona da Mata no Estado de Minas Gerais. As características morfológicas se mostraram suficientes para a classificação de isolados em nível de gênero, os quais foram classificados como pertencentes aos gêneros *Ceratorhiza* e *Epulorhiza*. A caracterização morfológica permitiu a construção de um fenograma mas não definir suas afinidades filogenéticas. Nove isolados tiveram o espaçador interno transcrito do rRNA seqüenciado, confirmando as suas identificações como pertencentes aos gêneros *Ceratorhiza* e *Epulorhiza*. Suas afinidades em relação a outros isolados com seqüências depositadas no GeneBank foram estimadas por meio de métodos filogenéticos. Os resultados demonstram grande diversidade genética destes fungos

no Brasil, uma vez que os diferentes isolados obtidos neste trabalho agruparam-se a diferentes clados descritos em estudos com fungos rizoctonióides de outras regiões do mundo. Não pode ser determinada nenhuma relação de especificidade entre os isolados fúngicos e as plantas hospedeiras.

ABSTRACT

NOGUEIRA, Ricardo Eustáquio, M.S., Universidade Federal de Viçosa, August 2004. **Morphological and molecular characterization of orchids mycorrhizal fungi.** Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Committee members: Maurício Dutra Costa and Elza Fernandes de Araújo.

Mycorrhizal association can be considered obligates to orchids in natural ecosystems, since this group of plant depends on the fungi to both germination and establishment in natural conditions. The biodiversity of orchids mycorrhizal fungi is the great importance to future programs of reintroduction, conservation and management of this plant species. So, the objective of this work was to characterize mycorrhizal fungi, belonging to rizoctonioids groups, morphological and molecularly, isolated from neotropical orchids from Quadrilátero Ferrífero and Zona da Mata of Minas Gerais State, Brazil. Morphological characteristics were sufficient to classify the isolates to Genus level, which were classified as belonging to *Ceratorhiza* and *Epulorhiza*. Using morphological characteristics it was possible to build a phenogram but not to define phylogenetic affinities. Nine isolates were sequenced using ITS of rRNA, confirming their identity as *Ceratorhiza* and *Epulorhiza*. The affinities to another isolates, which have the sequences deposited in GeneBank, were estimated by phylogenetic methods and showed high diversity of these group of the fungus in Brazil, since different isolates used in this work grouped to distinct clade compared to that described in another regions of the world. It was not possible to determine any specificity relationship between isolates of the fungi and host plants.

1. INTRODUÇÃO

Orchidaceae é uma das maiores famílias dentro das angiospermas e suas espécies estão distribuídas globalmente em vários habitats. Estima-se que no Brasil existam entre 2500 e 3000 espécies distribuídas por todos os biomas. Destas espécies, 147 estão incluídas em listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção, sendo que, 43 espécies foram incluídas na Lista Vermelha das espécies ameaçadas de extinção do Estado de Minas Gerais. Várias espécies de orquídeas atraem a atenção de colecionadores e da indústria de plantas ornamentais no mundo. O mercado mundial movimentava cerca de 210 milhões de dólares em orquídeas por ano, sendo a Tailândia o maior produtor, exportando mais de 26 milhões de dólares por ano. O mercado brasileiro movimentava cerca de 70 milhões. Apesar do crescimento de 25% ao ano na produção de orquídeas, a produção nacional atende a apenas 25% da demanda interna. No ano de 2003, o Brasil exportou cerca de 79 mil dólares, embarcando quase 9000 unidades para diversos países. A indústria brasileira ainda necessita de muitos subsídios científicos para que o país possa atingir cifras econômicas condizentes com a grande diversidade biológica e potencial ornamental apresentado pela família Orchidaceae no país.

Embora exista grande diversidade morfológica e reprodutiva neste grupo, uma característica compartilhada por todos os seus representantes é a produção de sementes muito pequenas que, sob condições naturais, como regra, têm que se associar simbioticamente a fungos micorrízicos para que ocorra a germinação. No Brasil os estudos são poucos e iniciaram-se nesta década. O conhecimento da

biodiversidade dos fungos que realizam a associação micorrízica com espécies de orquídeas brasileiras é de grande importância para programas de reintrodução, conservação e manejo dessas espécies. Assim, este trabalho teve por objetivo realizar a caracterização morfológica e molecular de alguns isolados fúngicos, do grupo rizoctonióides, de orquídeas das regiões do Quadrilátero Ferrífero e Zona da Mata no Estado de Minas Gerais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Orchidaceae é uma das maiores famílias dentro das angiospermas e suas espécies estão distribuídas globalmente em vários habitats. Embora exista grande diversidade morfológica e reprodutiva neste grupo, uma característica compartilhada por todos os seus representantes é a produção de sementes muito pequenas que, sob condições naturais, como regra, têm que se associar simbioticamente a fungos micorrízicos para que ocorra a germinação (Arditti, 1979; Benzing, 1981; Rasmussen, 1995). Outra característica única desta família é a presença de uma estrutura parenquimatosa, o protocórmio, que se origina a partir da semente e dá origem, posteriormente, à plântula. Esta estrutura se desenvolve a partir do embrião e, à medida que aumenta em tamanho, originará o meristema apical e as raízes adventícias. Embora muitas espécies de orquídeas sejam tipicamente autototróficas após o estabelecimento da plântula, o estágio de protocórmio é caracteristicamente heterotrófico. As orquídeas aclorofiladas são micoheterotróficas durante todo o ciclo de vida, sendo dependentes dos simbiossiontes fúngicos para aquisição de nutrientes durante a formação do protocórmio, estabelecimento da plântula e fase adulta. Os fungos envolvidos nestas associações são capazes de degradar carboidratos complexos que existem no solo e fornecer aos protocórmios heterotróficos açúcares simples para que sejam utilizados no crescimento e na diferenciação dos sistemas caulinar e radicular (Peterson *et al.*, 1998).

Vários aspectos da associação micorrízica em Orchidaceae vêm sendo abordados por pesquisadores em várias regiões do mundo. As informações

provenientes destes estudos têm permitido um melhor entendimento de processos fundamentais para o estabelecimento desta associação. Atualmente, há disponíveis informações sobre a formação e ontogenia da micorriza, exploração dos recursos nutricionais pelos organismos, ecologia e sistemática dos simbioses envolvidos nesta associação. Dessa forma, o objetivo desta revisão é abordar e discutir alguns destes aspectos, desde a estrutura da associação até os estudos que vem sendo realizados para a taxonomia de fungos rizoctonióides, o grupo mais comumente encontrado em associação com as orquídeas.

O controle da invasão das hifas nos tecidos das orquídeas é tradicionalmente atribuído à produção de fitoalexinas, encontradas no sistema radicular e rizomas. Apenas recentemente foi demonstrada a presença dessas substâncias em protocórmios (Beyrle *et al.*, 1995). A invasão fúngica e a colonização dos tecidos das orquídeas induzem a produção de fitoalexinas (Gehlert & Kindl, 1991; Reinecke & Kindl, 1994a,b).

Durante a germinação simbiótica, as células do parênquima presentes no embrião são penetradas por hifas que surgem a partir das células suspensoras, da base de tricomas epidérmicos ou de células adjacentes já colonizadas durante os estádios iniciais de desenvolvimento do protocórmio (Uetake *et al.*, 1992). Uma única hifa normalmente entra na célula e, a partir deste ponto, ocorrem mudanças na hifa e na célula vegetal invadida. Isto indica que existe estreita relação entre os simbioses durante o estabelecimento da associação micorrízica. Nem todas as células do embrião/protocórmio são colonizadas. Células na extremidade calazal, em que se desenvolverá o meristema apical, não são invadidas pela hifa. Sugere-se que o fungo possa desencadear a germinação pela produção de compostos estimulantes ou por possuir plasmídeos com genes necessários para os eventos de germinação (Arditti *et al.*, 1990).

Dois tipos de micorrizas de orquídeas têm sido reconhecidos, a tolipofágica, encontrada na grande maioria das espécies, e a ptiofágica, apenas observada em orquídeas tropicais altamente micotróficas (Rasmussen, 1995). A última mantém-se como um fenômeno ainda obscuro, uma vez que, após o primeiro relato (Burgeff, 1936), cinco décadas se passaram até que novos estudos pudessem esclarecer alguns aspectos desse tipo de associação (Rasmussen, 1995).

Em *Gastrodia elata*, orquídea que forma micorriza ptiofágica, as hifas de *Armillaria mellea* estendem-se como estrias ao longo das raízes em canais corticais

(Wang *et al.*, 1997). Estes canais desenvolvem-se a partir das células de passagem da exoderme radicular. As células do córtex externo funcionam como células hospedeiras, havendo a formação de novelos de hifas que persistem, e o córtex interno contém as células de digestão. Quando a hifa entra em uma célula de digestão, uma interface é formada entre o plasmalema da planta e a parede da hifa. Vesículas elétron-lúcidas com propriedades lisossômicas passam pelo plasmalema e são liberadas na interface de contato. Subseqüentemente, vesículas elétron-densas aparecem ao longo do plasmalema da planta e se alongam para formar um sistema radial tubular em torno da hifa. Infere-se que estas vesículas são endocíticas e contêm produtos da dissolução das hifas.

Segundo Burgeff (1936), a característica distintiva na ptiogagia é a lise da extremidade (ponta) da hifa intracelular e a liberação do seu conteúdo, enquanto na micorriza tolipofágica ocorre o colapso e a degradação total da hifa. Com o advento dos estudos de microscopia eletrônica esta descrição pode necessitar de modificações. No entanto, não existem dúvidas que a ptiofagia difere claramente do bem conhecido padrão tolipofágico, seja nas características histológicas (formação de canais de passagem na ptiofagia) ou na ultraestrutura do processo digestivo (tubos endocíticos e pinocitose dos fragmentos das hifas na ptiofagia).

Na micorriza tolipofágica, as hifas da espécie fúngica compatível crescem vigorosamente dentro das células parenquimáticas e formam estruturas chamadas pelotões que se assemelha a um novelo de hifas. As hifas podem apresentar ramificações e anastomose dentro das células (Hadley *et al.*, 1971) e, quando completamente desenvolvido, o pelotão pode ocupar quase todo o volume celular. O enovelamento e as ramificações fornecem uma grande área de contato entre os simbiontes (Hadley, 1982). A parede celular das hifas formadoras de pelotões é geralmente fina (Uetake *et al.*, 1992) e pode aparecer como uma estrutura de duas camadas (Hadley *et al.*, 1971). Também são observadas protuberâncias na superfície externa da hifa intracelular que está em contato com a membrana plasmática do hospedeiro (Hadley *et al.*, 1971). Estas estruturas ainda não foram observadas em outros trabalhos ultraestruturais (Peterson *et al.*, 1998). O citoplasma contém muitas mitocôndrias, outras organelas e ribossomos (Hadley *et al.*, 1971). Conseqüentemente, estas hifas aparecem elétron-densas quando vistas por microscopia eletrônica (Peterson & Currah, 1990; Uetake *et al.*, 1992) e densamente coradas com técnicas usuais para microscopia ótica (Hadley *et al.*, 1971; Peterson &

Currah, 1990; Uetake *et al.*, 1992). É comum se observar, em cortes de protocórmios, células com pelotões em vários estádios de formação e degeneração. Também, dentro de uma célula do protocórmio, algumas regiões do pelotão podem aparecer viáveis enquanto outras estão vacuoladas e sofrendo colapso (Rasmussen, 1990; Peterson & Currah, 1990). Não está claro se a degeneração dos pelotões é resultado de autólise ou da ação de enzimas hidrolíticas dentro das células dos protocórmios (Williamson, 1973).

Os pelotões e a massa de hifas degradadas estão separados do citoplasma das células hospedeiras por uma membrana (membrana perifúngica) e por uma matriz interfacial (Hadley, 1982; Peterson & Currah, 1990; Richardson *et al.*, 1992; Uetake *et al.*, 1992; Peterson *et al.*, 1996). Pouco se sabe a respeito das características fisiológicas desta membrana, mas recentemente mostrou-se em protocórmios de *Spiranthes sinensis* colonizados por *Ceratobasidium cornigerum* que a membrana circundante ao pelotão tinha muitas características de coloração em comum com a membrana plasmática das células hospedeiras (Uetake & Ishizaka, 1996). Todavia, uma característica distintiva apresentada pela membrana do hospedeiro era a alta atividade da enzima adenilato ciclase, sendo que, na membrana perifúngica esta atividade estava ausente (Peterson *et al.*, 1996). Técnicas utilizadas para demonstrar a presença de β -1,3 glucanos, celulose e pectinas mostraram que na matriz interfacial ao redor do pelotão intacto estes componentes não estavam presentes (Peterson *et al.*, 1996). Nas paredes das hifas formadoras de pelotões foi demonstrada a presença de β -1,3 glucanos. Curiosamente, na matriz interfacial que circundava os pelotões degradados estavam presentes β -1,3 glucanos, celulose e pectinas (Peterson *et al.*, 1996).

A quantidade de enzimas digestivas é muito maior em tecidos infectados que em não infectados, sendo que foram verificadas a presença de peroxidases, glutamato desidrogenases, esterases e malato desidrogenases na lise dos pelotões (Senthilkumar *et al.*, 2000).

Os cinco maiores grupos taxonômicos dos basidiomicetos estão representados como micorrízicos orquidóides. Muitos fungos anamórficos são relacionados ao gênero *Rhizoctonia* DC *sensu lato* (Roberts, 1999). Agaricanae está representada entre os simbiontes de orquídeas por *Armillaria* (Cha & Igarashi, 1996) e *Mycena* (Fan *et al.*, 1996; Lan *et al.*, 1996), Hericianae e Thelephoranae estão representadas

por Russulaceae e Thelephoraceae (McKendrick *et al.*, 2000a,b; Taylor & Bruns, 1997) e “Hymenochaetanae” por *Erythromyces* (Umata, 1995, 1998a,b).

O gênero *Rhizoctonia sensu lato* abrange fungos anamorfos, taxonomicamente diversos, pertencentes a diferentes ordens de basidiomicetos (Andersen, 1996). Muitas espécies são importantes fitopatógenos, particularmente aquelas com teleomorfos nos gêneros *Thanatephorus* e *Ceratobasidium*. Espécies que fazem associações micorrízicas com a família Orchidaceae também têm sido relacionadas a estes e outros gêneros teleomorfos de *Rhizoctonia s. l.* (Andersen & Rasmussen, 1996).

Embora os estados perfeitos para muitas espécies de *Rhizoctonia s. l.* sejam conhecidos, a indução do teleomorfo tem sido um dos principais problemas nestes fungos (Sneh *et al.*, 1991). A indução da esporulação e determinação dos teleomorfos de “rizoconias” associadas a orquídeas é de extrema importância para a taxonomia do grupo. No entanto, o sucesso na indução da fase sexuada é difícil, sendo que, alguns isolados obtidos de hospedeiros da Austrália e Grã-Bretanha tiveram seus teleomorfos determinados por meio do método de cultivo em ágar-extrato de solo (Warcup & Talbot, 1967; 1971; 1980). Outro método utilizado com sucesso para a obtenção do estágio basidial para *Thanatephorus* consistiu no crescimento em agar fubá (CMA, Difco) e incubação sob condições específicas (Currah, 1986).

Quando o estado teleomorfo surge em cultura, há a manifestação de várias características necessárias para a distinção entre os gêneros *Thanatephorus* e *Ceratobasidium*. As mais importantes são a forma e natureza da conexão da basidia à célula que a sustenta, forma e comprimento do esterigma e número de núcleos por célula vegetativa. *Thanatephorus* tem a basidia em forma de barril, as quais são aproximadamente do mesmo diâmetro das hifas que as suportam. Também possuem esterigma resoluto e curvado e células vegetativas multinucleadas. As basídias de *Ceratobasidium* são mais largas que as células que as suportam e apresentam-se de infladas a globosas, sendo muitas vezes papiladas. O esterigma é longo, curvado e delgado. As células vegetativas são binucleadas (Currah, 1986).

Uma estratégia adicional que vem sendo muito utilizada para a delimitação de grupos dentro de *Rhizoctonia s. l.* envolve a análise dos grupos de anastomose (AG) das hifas, ou seja, quando dois isolados são pertencentes ao mesmo grupo AG, suas hifas são capazes de se fundirem (Carling, 1999). Quando isolados de *Rhizoctonia* são pareados a uma distância de 2 a 3 cm em uma placa de Petri contendo meio de

cultura ou em uma lâmina para microscopia, seus micélios crescem e sobrepõem-se, o que pode ser observado com o auxílio de um microscópio. Caso a fusão de hifas ocorra, os isolados pertencem ao mesmo grupo de anastomose (AG) e, freqüentemente, a atração entre as hifas e morte das células que se fundiram são observadas. Usualmente, dois tipos de fusão ocorrem: (1) a fusão perfeita, em que ocorre a dissolução completa das paredes celulares e a conexão dos protoplasmas e (2) a fusão imperfeita, que é consequência da dissolução imperfeita das paredes celulares e da conexão imperfeita dos protoplasmas o que acarreta na morte das hifas que se fundiram (Bhuiyan & Arai, 1994). O processo de anastomose pode ser sumarizado como o crescimento das hifas, secreção de uma ou mais substâncias atraentes, atração das hifas devido à presença destas substâncias, contato das hifas, interrupção do crescimento das hifas, formação de projeções semelhantes a ramificações, dissolução das paredes das hifas e, finalmente, conexão dos protoplasmas (Bhuiyan & Arai, 1994).

Rhizoctonia solani possui 13 AG's. As espécies binucleadas de *Rhizoctonia sensu lato* incluem 24 AG's (Sneh *et al.*, 1991). O suporte para o conceito de grupos de anastomose e a identificação de subgrupos dentro de AG's específicos tem surgido a partir de análises por RFLP – Restriction Fragments Length Polymorphisms, sequenciamento de genes que codificam rRNA, pelo uso da técnica de RAPD – Random Amplified Polimorphic DNA e cariotipagem (Cubeta *et al.*, 1991; Vilgalys & Cubeta, 1994; Keijer *et al.*, 1996; Kuninaga *et al.*, 1997). No entanto, muitos isolados não fazem anastomose com nenhuma das cepas das coleções de referências dos grupos AG ou, até mesmo, com seu próprio micélio. Outros problemas são a falta de acesso às coleções de referência e o desconhecimento de informações sobre possíveis hospedeiros em organismos isolados do solo, o que poderia reduzir o número de testes a serem feitos. Em muitos casos, os extensivos testes de anastomose podem requerer considerável tempo e esforço (Cubeta *et al.*, 1991).

Várias características do micélio vegetativo são usadas para delimitar o grupo dos rizoctonióides. Dentre estas, a cor do micélio, a ultraestrutura do septo, o diâmetro e angulo de ramificação das hifas, a constrição nos pontos de inserção das ramificações, formação de células monilióides e a formação de esclerócios são citadas nos estudos taxonômicos em cinco gêneros que foram definidos de acordo com as características ultraestruturais do septo e condição nuclear. No entanto, quando se avaliou a estabilidade da morfologia com o uso de testes estatísticos, ficou

demonstrado que o diâmetro das hifas é questionável como um bom caráter na delimitação dos rizoctonióides, assim como, tamanho celular ou distância entre as ramificações. O ângulo das ramificações e as constrictões destas nos pontos de inserção também não demonstraram consistência na delimitação dos táxons (Andersen, 1990).

O considerável interesse na delimitação de táxons dentro do gênero *Rhizoctonia* D.C. *sensu lato* resultou na publicação de um grande número de epítetos. A escolha de nomes apropriados para espécies segue as regras do ICBN – Código Internacional de Nomenclatura Botânica e, ainda, depende de descrições baseadas em caracteres tradicionais como morfologia das hifas, células monilióides, esclerócios e hospedeiros, que são muitas vezes de valor questionável para *Rhizoctonia sensu lato*. Incluindo a espécie tipo, *Rhizoctonia crocorum*, até o ano de 1994, um total de 7 táxons eram considerados como publicações válidas, bem descritas, reconhecíveis e referentes a *Rhizoctonia* D.C. *sensu lato* (Andersen & Stalpers, 1994). Recomenda-se que novas descrições ou neotipificações devem ser acompanhadas pela descrição de todos os caracteres disponíveis, com a espécie tipo devidamente preservada (holo- e isotipo) e fotografias como documentação. Os caracteres incluem: ultraestrutura do aparato do septo, número de núcleos por célula, hifas, células monilióides e esclerócios (Andersen & Stalpers, 1994).

A divisão de *Rhizoctonia sensu lato* de acordo com a estrutura do septo foi um valioso passo em direção a uma segregação não artificial de um grupo muito heterogêneo. Corretamente, Moore (1987) removeu “rizoctonias” com a estrutura do poro complexa de *Rhizoctonia strictu sensu* e as reagrupou em três novos gêneros anamórficos. “Rizoctonias” com parenteossomas imperfurados ou pauciperfurados cobrindo apenas a abertura do poro, ex. *Sebacina vermifera* Oberw., ou estrutura completamente dolipórica, ex. *Tulasnella*, foram transferidas para *Epulorhiza* R. T. Moore. Atualmente, o gênero *Opadorhiza* R.T. Moore abriga as formas anamórficas de *Sebacina* Tulasne (Moore, 1996). “Rizoctonias” com teleomorfos pertencentes a Ceratobasidiaceae possuem parenteossoma com pequenas perfurações. Elas foram colocadas em dois gêneros anamórficos distintos, os anamorfos binucleados de *Ceratobasidium* em *Ceratorhiza* R.T. Moore e os anamorfos multinucleados de *Thanatephorus* e *Waitea* em *Moniliopsis* Ruhland (Moore, 1987). Atualmente, o gênero *Chrysorhiza* T.F. Andersen & Stalpers abriga as formas anamórficas de *Waitea* Warcup & Talbot (Stalpers & Andersen, 1996).

Até o momento, foram descritas seis espécies para o gênero *Epulorhiza*. *E. repens* é reconhecida por características de suas hifas e da colônia como descrito por Moore (1987), Masuhara & Katsuya (1994) e Zelmer & Currah (1997). *Tulasnella deliquescens* (syn. *T. calospora*), o teleomorfo de *E. repens*, tem uma ampla gama de hospedeiros, infectando 11 de 14 espécies testadas (Leake, 1994). Hadley (1982) demonstrou que *E. repens* pôde ser isolada a partir de plantas adultas de *Spiranthes sinensis* que ocorriam em campos na Austrália (Masuhara et al., 1993). *E. repens* também foi isolada em associação com *Spiranthes lacera* var. *lacera* (Zelmer & Currah, 1997).

Epulorhiza anaticula tem os aspectos da colônia similares a *E. repens*, possuindo coloração creme, micélio submerso e aglomerados de células monilióides arranjados em cadeias curtas. Devido a similaridades das características culturais, *E. anaticula* é considerada congênica a *E. repens*. Todavia, a conexão proeminente entre as células monilióides distingue este taxa de *E. repens* (Currah et al., 1987; Currah et al., 1990). *E. albertaensis* foi descrita por Currah & Zelmer (1992). Currah & Sherburne (1992) demonstraram que o septo deste táxon tem parenteossoma imperfurado e o táxon foi, dessa forma, classificado como uma nova espécie, a terceira a ser descrita. O teleomorfo ainda não foi observado. Esta nova espécie forma "pelotons" únicos nas células corticais do hospedeiro (Currah & Zelmer, 1992).

Zelmer & Currah (1995) descreveram *E. calendulina* a partir de micorrizas que ocorriam em orquídea terrestre, *Amerorchis rotundifolia*. *E. calendulina* se distingue das outras espécies de *Epulorhiza* devido a coloração laranja a ocre de sua colônia em meio batata dextrose ágar (BDA). Em meio ágar fubá (FA), células monilióides irregulares e clavadas são produzidas em cadeias curtas e ramificadas que surgem de ramificações laterais das hifas. As hifas, que possuem crescimento relativamente rápido, são binucleadas, 3-5 µm de largura, regularmente septadas, com parenteossomos imperfurados e planos. A atividade de polifenol-oxidases não foi verificada, mas a celulase foi produzida. *E. inquilina* é binucleada e possui parenteossoma imperfurado, mas difere das outras espécies pelo aspecto de lâ que possuem suas colônias, coloração marrom em meios artificiais e também pela morfologia de suas células monilióides, alongadas e arranjadas em cadeias relativamente curtas (Currah et al., 1997).

Pereira *et al.* (2003) descreveram *E. epiphytica* de micorrizas que ocorriam em uma espécie epífita em remanescente de mata atlântica. O isolados obtidos do sistema radicular de *Epidendrum rigidum* e *Polystachia concreta* diferem das demais espécies descritas devido a presença de parenteossoma recurvado, característica raramente observada (Moore, 1996), e tamanho e forma das células monilióides. Nesta espécie é observada a presença de células monilióides diminutas (7-10 x 8-9,5 µm), globóides, de crescimento irregular e superfície verrugosa.

Atualmente, os estudos taxonômicos em *Rhizoctonia sensu lato* têm se baseado principalmente na utilização de técnicas moleculares. Muitos trabalhos têm sido direcionados para a classificação de isolados fitopatogênicos e muitas técnicas empregadas se baseiam na amplificação e análise do gene codificador do rRNA. (Cubeta *et al.*, 1991; Matsumoto *et al.*, 1996; Kuninaga *et al.*, 1997). Estudos populacionais e visando a validação dos grupos de anastomose puderam ser feitos com o advento destas técnicas (O'Brien, 1994; Cubeta & Vilgalys, 1997; Hyakumachi *et al.*, 1998; Nicoletti *et al.*, 1999) e inferências sobre a estrutura genética dos grupos de anastomose e seus níveis de virulência foram feitas (Carling *et al.*, 2002). O sequenciamento da região do espaçador interno transcrito do gene codificador do rRNA e a utilização de métodos filogenéticos indicam que os gêneros *Thanatephorus* e *Ceratobasidium* possivelmente são parafiléticos (Gonzalez *et al.*, 2001).

Estudos moleculares com isolados micorrízicos são mais recentes e abordaram vários aspectos da interação. Estes trabalhos visaram a definição de padrões de especificidade entre os fungos e as orquídeas (Taylor & Bruns, 1999; Otero *et al.*, 2002; Otero *et al.*, 2004), a sistemática e taxonomia do grupo (Pereira *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003), o desenvolvimento de técnicas moleculares (Kristiansen *et al.*, 2001) e a verificação de interações múltiplas exercidas pelos fungos (Sen *et al.*, 1999; Mckendrick *et al.*, 2000a).

Os estudos com fungos isolados em regiões tropicais são menos numerosos. A comunidade de endofíticos foi definida em alguns trabalhos (Richardson *et al.*, 1993; Richardson & Currah, 1995; Bayman *et al.*, 1997), o estudos de espécies raras (Tremblay *et al.*, 1998), a definição de padrões de especificidade (Otero *et al.*, 2002; Otero *et al.*, 2004) e a sistemática em outros (Pereira *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO/UFV e no Laboratório de Microbiologia Geral do Departamento de Ciências Biológicas/NUPEB/UFOP.

3.1. Amostragem

Para os estudos morfológicos foram coletadas amostras em duas áreas localizadas em dois municípios da Região do Quadrilátero Ferrífero. Em Ouro Preto foi amostrada uma área no Bairro Morro São Sebastião. Em Nova Lima foi amostrada uma área (Capão Xavier). Para os estudos de sistemática molecular foram utilizados fungos que fazem parte da coleção de fungos micorrízicos de orquídeas do Departamento de Microbiologia – BIOAGRO/UFV (Tabela 1).

Tabela 1 – Código, localidade, hospedeiros, e vegetação onde ocorrem os isolados de fungos micorrízicos rizoctonióides objeto deste estudo

Código	Localidade	Hospedeiro	Vegetação
OM3	Carangola	<i>Isochillus linearis</i>	Mata Atlântica
OM6	São Miguel do Anta	<i>Polystachia concreta</i>	Mata Atlântica
OM9	Carangola	<i>Gomesa crispa</i>	Cultivada
OM10	Viçosa	<i>Campylocentrum</i> sp.	Mata Estacional semidecídua
OM12	Nova Lima	<i>Bifrenaria tyrianthina</i>	Campo Rupestre
OM14	Nova Lima	<i>Oncidium gracile</i>	Campo Rupestre
OM16	Nova Lima	<i>Epidendrum secundum</i>	Campo Rupestre
OM23	Ouro Preto	<i>Pleurothallis limae</i>	Campo Rupestre
OM24	Ouro Preto	<i>Pleurothallis limae</i>	Campo Rupestre

3.2. Isolamento

Amostras das raízes de orquídeas foram lavadas em água de torneira corrente por 10 min e o velame foi retirado com bisturi. As raízes foram cortadas em fragmentos de 2-3 cm e desinfetadas superficialmente, por imersão em etanol 70% durante 1 minuto, seguida de imersão por 5 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2%, seguindo-se de cinco lavagens sucessivas em água destilada estéril. 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. As placas foram incubadas a 28°C e observadas diariamente em microscópio óptico invertido para o isolamento direto do micélio, 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 28 °C foram descritas. Os isolados foram cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) e se observou a coloração (branca, creme ou marrom), abundância de micélio aéreo (abundante ou escasso) e fez-se a medição do diâmetro das hifas vegetativas (Currah, 1986; Currah et al., 1987; 1990; 1997; Currah & Zelmer, 1992; Zelmer & Currah, 1995). Para se estimar a taxa diária de crescimento das colônias em fubá ágar (CMA) e BDA. A condição nuclear (binucleado ou multinucleada) foi confirmada por meio da coloração dos núcleos (Meinhardt, 2001).

3.4. Atividade de polifenol-oxidases

A detecção foi feita 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).

3.5. Análise dos resultados dos estudos de morfologia

Utilizou-se o programa Nexus para elaboração de uma matriz, em que cada característica apresentava somente dois estados. Com base na matriz foi feita a

análise de agrupamento pelo método hierárquico (UPGMA - Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Averages) com o auxílio do programa PAUP 4.0 (Swofford, 1998). O diagrama foi comparado aos resultados obtidos através da utilização de uma chave de identificação de fungos endofíticos de orquídeas (Currah & Zelmer, 1992).

3.6. Extração do DNA, amplificação e sequenciamento da região ITS

A extração do 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 será 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 5 M serão 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 e nova centrifugação a 11.750 g por 5 minutos. A fase aquosa será 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, será feita a centrifugação por 5 minutos a 11.750 g, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuscitado com 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM [pH 8,0]; EDTA 1 mM). A essa suspensão foram adicionados 3 µL de RNase (4 µg/mL) e o tubo Eppendorf deixado no banho-maria por 2 horas à 30 °C. O DNA total extraído será analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

A região ITS (contendo ITS 1, o gene que codifica o rRNA 5,8S e ITS2) foi amplificada usando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores ITS (ITS 1 – 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' / ITS4 – 5'-TCCTCCGCTTATTGATGC-3') do rDNA (White *et al.*, 1990), que foram 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 minuto, um passo de

anelamento a 52 °C por 1 minuto e um passo de extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. Após 40 ciclos, foi feito um passo de extensão final a 72 °C por 7 minutos. 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.

O produto da amplificação foi purificado com o kit Exo-Sap e o sequenciamento foi feito com os mesmos primers da amplificação, utilizando o Kit BigDyeTerminator v3.1 (Applied Biosystems) e Sequenciador Spectrumedix SCE2410, seguindo os protocolos dos fabricantes.

3.7. Análise dos resultados dos estudos moleculares

O alinhamento entre as sequências foi feito com o auxílio do programa Clustal X, seguido de ajustes manuais. Todas as análises foram conduzidas com o auxílio do programa PAUP* 4.11 (beta test version, Swofford, 2002). A topologia do cladograma foi determinada através de busca heurística para as sequências da região ITS. A robustez dos clados foi estimada por meio de análise de bootstrap (Felsenstein, 1985). A busca heurística foi feita com 1000 replicacoes, algoritmo de swapping=TBR, adição aleatória stepwise, mantendo 10 arvores por replicacao. Foram encontradas mais de 10000 arvores de comprimento L=633, CI=0.5608 e RI=0.7938. Seguiu-se a análise com uma busca de TBR com 1000 replicacoes, algoritmo de swapping TBR, adição simples, mantendo 10 arvores por replicação. As árvores foram enraizadas utilizando a sequência ROTH25, uma *Rhizoctonia* multinucleada, como grupo externo.

O alinhamento entre as sequências foi feito com o auxílio do programa Clustal X, seguido de ajustes manuais. Todas as análises foram conduzidas com o auxílio do programa PAUP* 4.11 (beta test version, Swofford, 2002). A topologia do cladograma foi determinada através de busca heurística para as sequências da região ITS. A robustez dos clados foi estimada por meio de análise de bootstrap (Felsenstein, 1985).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para cada espécie de orquídea amostrada (Tabela 2), isolou-se um fungo característico do grupo rizoctonióide. As características morfológicas e culturais (Tabela 3) permitiram identificar esses fungos ao nível de gênero (Tabela 2), como já efetuado em outros trabalhos (Currah & Zelmer, 1992; Zelmer & Currah, 1995; Currah *et al.*, 1997; Nogueira *et al.*, 2004). A análise dos resultados pela construção de diagrama permitiu o agrupamento dos táxons de acordo com suas similaridades morfológicas (Figura 1).

A delimitação das espécies dentro do grupo dos rizoctonióides é bastante difícil (Hadley, 1982; Andersen & Rasmussen, 1996) e o uso das características culturais nesta delimitação é susceptível a erros devido a grande plasticidade fenotípica apresentada por estes fungos (Andersen, 1990). No entanto, algumas características apresentadas pelos fungos são suficientes para distinguí-los ao nível genérico (Nogueira *et al.*, 2004).

A presença de um isolado multinucleado asseguraria sua classificação como pertencente ao gênero *Rhizoctonia* DC (Moore, 1987; Stalpers *et al.*, 1998). Uma vez que todos os isolados apresentaram hifas binucleadas, limitou-se a classificação aos gêneros *Ceratorhiza* ou *Epulorhiza*. Representantes de *Ceratorhiza* possuem taxa de crescimento maior que a dos isolados de *Epulorhiza* e micélio aéreo mais abundante. No entanto, o isolado OM24, classificado como *Epulorhiza*, apresentou a maior taxa dentre todos os isolados e o isolado OM12, classificado como *Ceratorhiza*, apresentou a menor taxa de crescimento em BDA. Esta grande

Tabela 2 – Código e gênero dos isolados obtidos e seus respectivos hospedeiros

Código	Fungo Micorrízico	Hospedeiro
OM12	<i>Ceratorhiza</i> sp.	<i>Bifrenaria tyrianthina</i>
OM16	<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Epidendrum secundum</i>
OM17	<i>Ceratorhiza</i> sp.	<i>Oncidium blanchetii</i>
OM23	<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Pleurothallis limae</i>
OM24	<i>Epulorhiza</i> sp.	<i>Pleurothallis limae</i> .

Tabela 3 – Caracterização morfológica e enzimática dos isolados

Cód.**	Taxa de Cresc.		Cor	Micélio aéreo	Polifenol oxidase	Condição nuclear	Diâmetro das hifas
	BDA	FA					
OM12	1,19*	2,44	marrom	abundante	+	binucleado	> 4µm
OM 16	0,44	1,33	branco	escasso	-	binucleado	<4µm
OM 17	2,17	2,44	branco	abundante	+	binucleado	> 4µm
OM 23	1,6	1,78	branco	escasso	-	binucleado	< 4µm
OM 24	3,00	3,00	branco	escasso	-	binucleado	< 4µm

*cm/dia 1, ** Código de identificação.

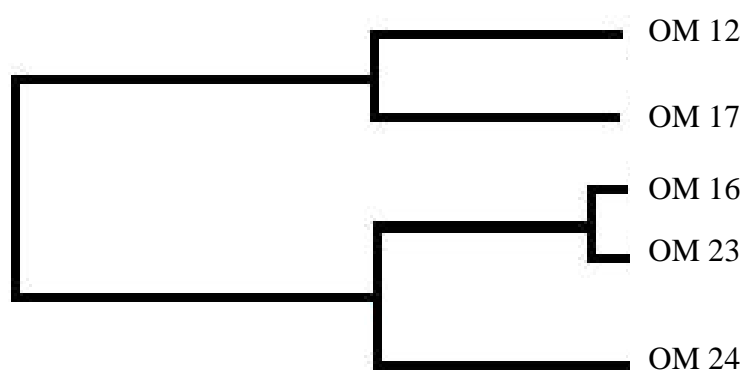


Figura 1 – Análise por UPGMA da matriz de características morfológicas do isolados fúngicos.

variação dos caracteres culturais e morfológicos já foi observada anteriormente (Andersen, 1990) e pode ser consequência de alterações provocadas devido ao cultivo por um período longo em laboratório.

Todos os isolados de *Ceratorhiza* foram positivos para polifenol-oxidases, enquanto os de *Epulorhiza* foram negativos para a referida enzima (Tabela 2). Esse teste enzimático é considerado de importante valor taxonômico, em auxílio às características morfológicas, para se separar esses dois gêneros (Zelmer *et al.*, 1996).

Os isolados de *Epulorhiza* apresentaram em comum características como micélio aéreo escasso, margem submersa e menor diâmetro das hifas vegetativas.

Estas características são fundamentais para o uso da chave de identificação (Currah & Zelmer, 1992).

Muitos estudos têm sido direcionados para a determinação de padrões de especificidade micorrízica dentro da família Orchidaceae, em que tais padrões são verificados principalmente pela análise de filogenias dos isolados obtidos de uma espécie de orquídea (Taylor *et al.*, 2003, 2004; McCormick *et al.*, 2004; Otero *et al.*, 2004). Neste trabalho, indivíduos distintos de *Pleurothallis limae* se apresentaram associadas a fungos do gênero *Epulorhiza* em duas áreas de campos rupestres geograficamente isoladas. Tais resultados demonstram que o gênero *Pleurothallis* pode se associar a fungos de diferentes clados, uma vez que a espécie *Pleurothallis teres* se apresentou associada a fungos do gênero *Ceratorhiza* em outros estudos (Nogueira *et al.*, 2004). No entanto, estes dados não são suficientes para se afirmar que *Pleurothallis* é um gênero generalista em relação às suas associações micorrízicas, mas indicam que a ampla distribuição destas plantas em áreas de campos rupestres pode ser consequência de sua afinidade por clados distintos dentro do grupo dos rizoctonióides.

Trabalhos com simbioses em espécies epífitas de orquídeas do gênero *Epidendrum* demonstraram, até o momento, a ocorrência de fungos do gênero *Epulorhiza* (Zettler *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2003). Em *Epidendrum secundum* relata-se mais uma vez a ocorrência de um fungo do gênero *Epulorhiza*, no entanto, ocorrendo em campo rupestre crescendo sobre rochas. Estes resultados demonstram a necessidade de estudos que visem a determinação de padrões na associação para este grupo de orquídeas, o que é fundamental para a adoção de estratégias mais eficientes para a conservação dessas orquídeas.

4.1. Filogenia molecular de isolados de *Ceratorhiza*

Os fungos caracterizados morfológicamente como pertencentes ao gênero *Ceratorhiza* (Nogueira *et al.*, 2004) foram confirmados quando se utilizou o sequenciamento, representativas da região 5.8S, ITS1 e ITS2, obtidas no presente trabalho para se fazer uma busca no genbank por meio da ferramenta BLAST. As seqüências que apresentavam maior homologia, em sua maioria, eram provenientes de fungos isolados de vários habitats e regiões (Otero *et al.*, 2002).

A árvore filogenética (Figura 2), onde foi utilizada a sequência ROTH25, uma *Rhizoctonia* multinucleada, como grupo externo, permite inferir que os isolados obtidos neste trabalho são anamorfos do gênero *Ceratobasidium*. *Ceratobasidium* spp. são conhecidas como patógenos de gramíneas e cereais (Currah *et al.*, 1997) e também como endofíticos de orquídeas na Austrália, América do Norte e Ásia tropical (Currah *et al.*, 1997). *Ceratorhiza*, o gênero anamorfo de *Ceratobasidium* (Currah, 1991), é um dos endofíticos mais comumente isolados a partir de orquídeas tropicais (Zelmer & Currah, 1995; Currah *et al.*, 1997), mas também encontrado em orquídeas neotropicais (Richardson *et al.*, 1993).

Poucas são os relatos de isolamento e identificação de fungos rizoctonióides de orquídeas neotropicais. *Ceratorhiza goodyerae-repentis* foi registrada em *Campylocentrum maculatum* e *Rodriguezia compacta* na Costa Rica (Richardson *et al.*, 1993; Richardson & Currah, 1995). Em Porto Rico, rizoctonióides multinucleados foram isolados de espécies de *Lepanthes* (Bayman *et al.*, 1997) e das cascas de árvores hospedeiras de orquídeas epífitas (Tremblay *et al.*, 1998). No Brasil, trabalhos vêm sendo desenvolvidos com orquídeas terrestres, epífitas e rupícolas, havendo sido verificada a presença dos gêneros anamorfos *Rhizoctonia*, *Ceratorhiza* e *Epulorhiza* associados a essas plantas (Pereira *et al.*, 2003; Nogueira *et al.*, 2004).

O isolado OM3, obtido de *Isochillus linearis* Jacq., formou um clado com um nível de suporte intermediário com um isolado FK02-1 pertencente ao grupo de anastomose AG-L de *Ceratobasidium* (Figura 2), isolado do solo no Japão. Seu nicho trófico não foi definido (Gonzalez *et al.*, 2001), no entanto, isolados do grupo AG-L são considerados não patogênicos, havendo a indicação da utilização destes no controle de rizoctonióides fitopatogênicos (Sneh, 1996).

O isolado OM10, obtido do sistema radicular de uma espécie de *Campylocentrum* em Viçosa - MG, agrupou com os isolados JTO163 e JTO162 (Otero *et al.*, 2002). Estes fungos foram obtidos a partir de *Oncidium altissimum* e *Tolomia variegata*, respectivamente. Em análises anteriores os isolados destas duas espécies formaram um clado (clado D) distinto e bem suportado em análises filogenéticas (Otero *et al.*, 2002).

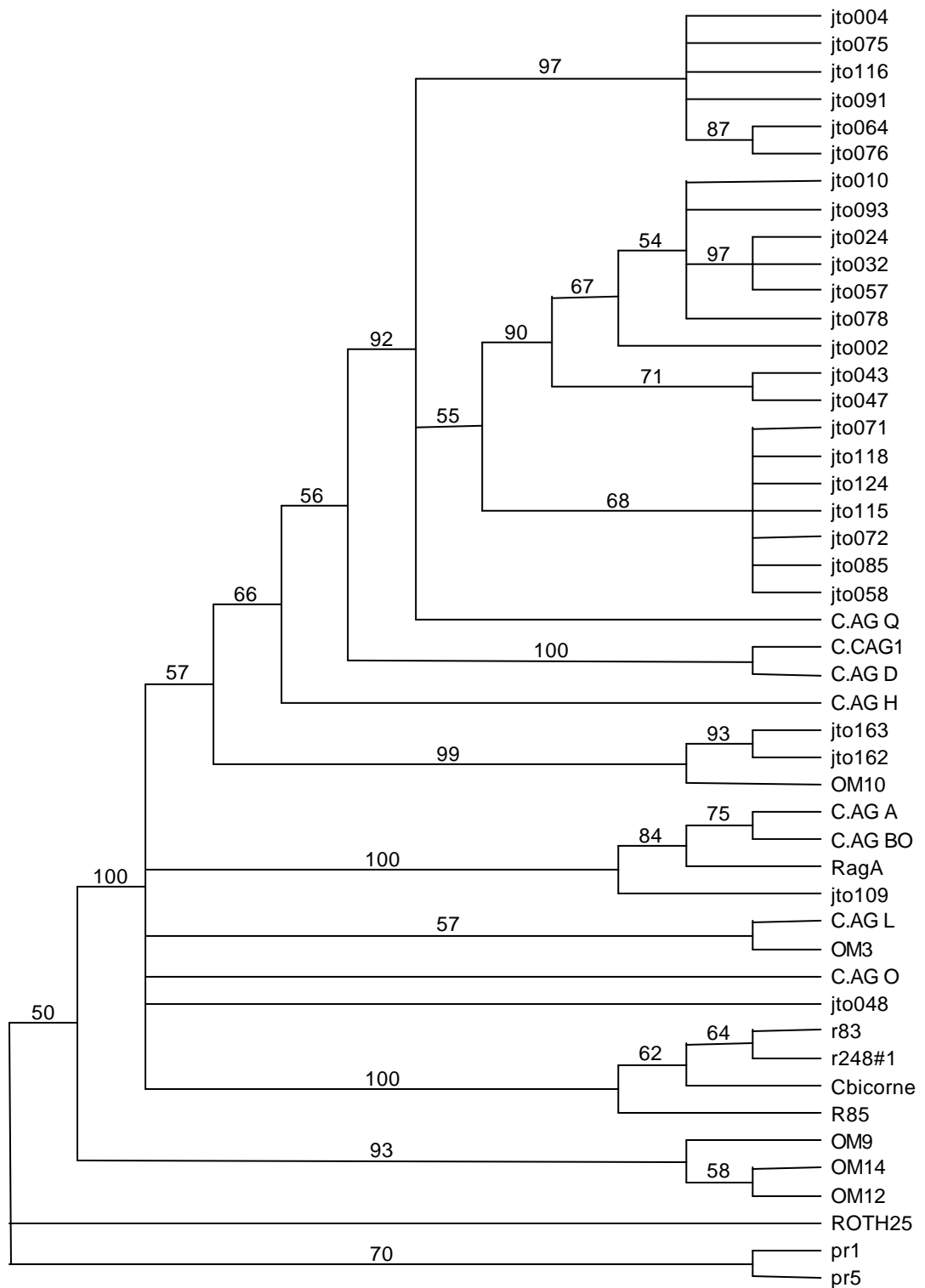


Figura 2 – Árvore obtida através de 1000 replicações de bootstrap sobre análise de parcimônia a partir de dados de sequências do espaçador interno transcrito do rRNA de fungos micorrízicos isolados de orquídeas neotropicais.

Neste trabalho, o clado formado por OM10, JTO163 e JTO162 foi muito bem suportado nas análises (Figura 2) e tem como representantes isolados obtidos do sistema radicular de espécies epífitas, o que pode ser um indicativo que estes táxons podem ter divergido dos demais devido a estratégias tróficas distintas.

Os isolados OM9, OM12 e OM14 obtidos neste trabalho formaram um clado distinto nas análises (Figura 1). OM9 foi obtido do sistema radicular de *Gomesa crispera*, uma espécie epífita cultivada em um Orquidário em Carangola - MG. OM12 e OM14 foram obtidos de *Bifrenaria tyrianthina* e *Oncidium gracile*, respectivamente. Estas espécies são rupícolas em uma área de canga hematítica em Nova Lima - MG. Apesar da diferença nos habitats e do isolamento geográfico, esses isolados formaram um clado muito bem suportado (Figura 2).

Esta é a primeira vez que relações filogenéticas de fungos rizoctonióides isolados de orquídeas no Brasil são estudadas utilizando-se de técnicas moleculares.

4.2. Filogenia molecular de isolados de *Epulorhiza*

Estudos anteriores demonstraram, pela utilização de características morfológicas e ultraestruturais, que os isolados utilizados neste estudo pertenciam ao gênero *Epulorhiza* (Nogueira *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2003), havendo a proposição de uma nova espécie (Pereira *et al.*, 2003). Os isolados OM 16, OM 23 e OM24 mantiveram-se sem identificação ao nível específico e o isolado OM6 se constitui no *holotipus* de *Epulorhiza epiphytica* O.L. Pereira, Rollemberg & Kasuya. No entanto, estes estudos não abordaram relações filogenéticas entre estes e outros isolados, já que a utilização de características morfológicas poderia não refletir em filogenia condizente com o verdadeiro relacionamento evolutivo entre esses organismos (Nogueira *et al.*, 2004).

Uma busca feita no GeneBank, por meio da ferramenta BLAST, teve como resultado 15 acessos com similaridade superior a 50% entre as sequências. Todos os acessos obtidos são provenientes do sequenciamento das regiões 5.8S, ITS 1 e ITS 2 de fungos isolados de orquídeas tropicais em Singapura (Ma *et al.*, 2003). Estes fungos representam o grupo 1 definido por estes autores e classificados como *Epulorhiza repens*.

Os fungos isolados de áreas de campos rupestres se mostraram relacionados ao grupo identificado como *Epulorhiza repens* (Ma *et al.*, 2003). Estes formaram um

clado muito bem suportado (bootstrap = 100). Os isolados OM23 e OM24 que tem como hospedeiros *Pleurothallis limae* e *Bifrenaria sp.*, respectivamente, foram obtidos de plantas que cresciam em substrato rochoso quartizítico em Ouro Preto - Minas Gerais. O isolado OM16 foi isolado do sistema radicular de *Epidendrum secundum* em uma área de canga hematítica em Nova Lima - Minas Gerais.

O fungo isolado em um remanescente de mata atlântica no município de São Miguel do Anta - MG, OM6 que tem como hospedeiro a espécie epífita *Polystachia concreta*, não se mostrou tão relacionado aos fungos classificados como *E. repens* (Ma *et al.*, 2003), ou aos outros obtidos em áreas de campos rupestres.

Estes resultados demonstram que, para os isolados obtidos neste trabalho, o isolamento geográfico não influenciou tanto na divergência dos táxons quanto a diferença de habitat (epífita x rupícola). No entanto, tal afirmação necessitaria de uma maior amostragem.

A inclusão de um grupo externo e das sequências obtidas neste trabalho nas análises alterou a topologia do cladograma obtido por Ma *et al.* (2003). Os subgrupos 1, 2 e 6 se mantiveram bem suportados, no entanto, os demais não foram suportados nas novas análises. Apesar da pequena amostragem pode se concluir que os isolados OM16, OM23 e OM24 representam uma mesma espécie, relacionada a isolados obtidos em Singapura (Ma *et al.*, 2003). No entanto, ao contrário do que inferiu Ma *et al.* (2003) não há evidências que sejam representantes de *E. repens*. Fica evidente a necessidade de descrição de características não utilizadas em trabalhos anteriores (Nogueira *et al.*, 2004) tais como, células monilióides e ultraestrutura do septo.

As análises feitas neste trabalho não demonstraram evidências que *E. epiphytica* seja sinônimo de *E. repens*. No entanto, mais uma vez, fica evidente a necessidade de uma maior número de amostras para que se possa, utilizando-se de técnicas moleculares, definir filogenias que expliquem as relações entre os táxons do gênero *Epulorhiza*.

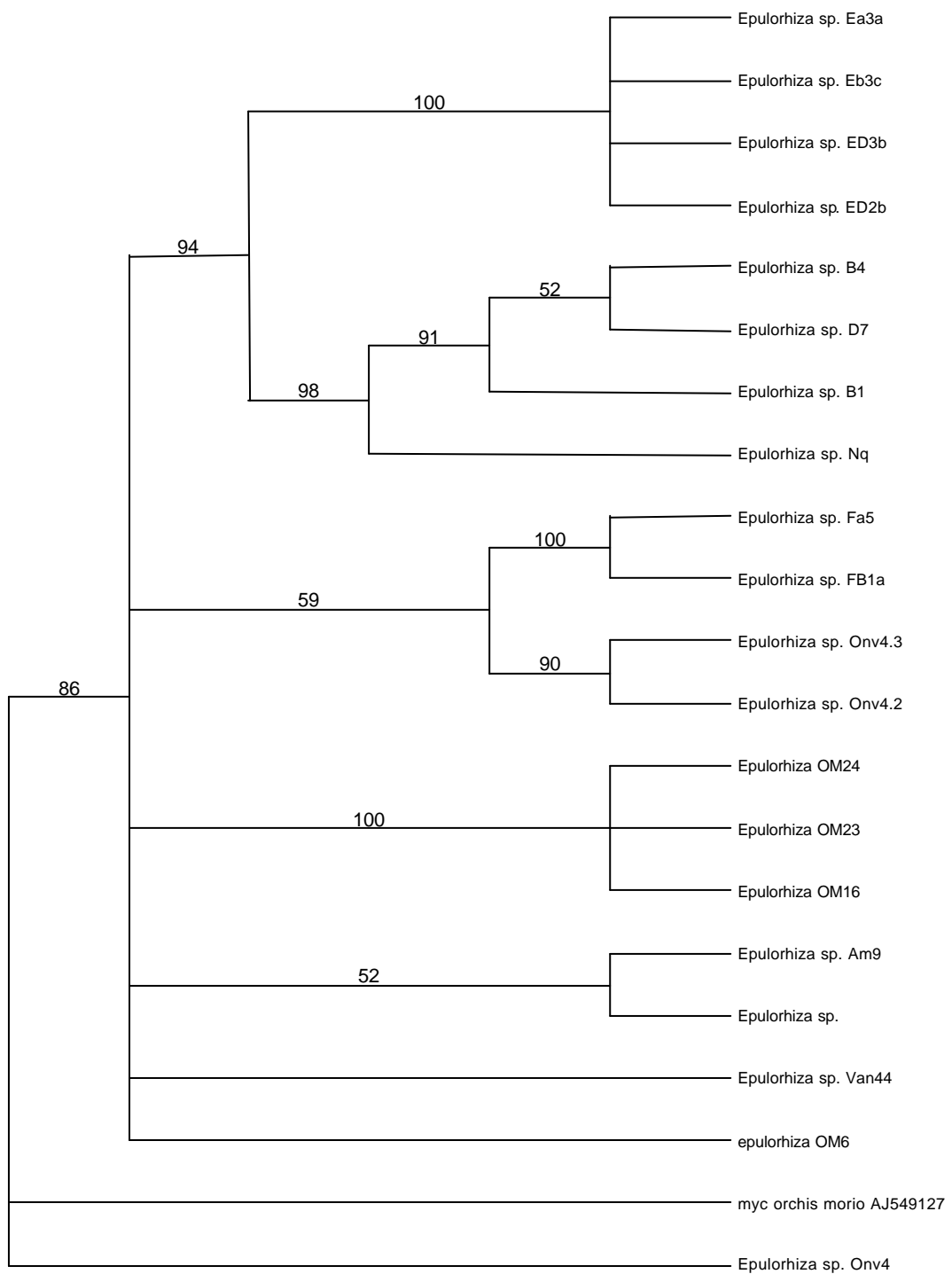


Figura 3 – Árvore obtida através de 1000 replicações de bootstrap sobre análise de parcimônia a partir de dados de sequências do espaçador interno transcrito do rRNA de fungos micorrízicos isolados de orquídeas neotropicais.

5. CONCLUSÕES

- A caracterização morfológica de fungos micorrízicos é útil para a determinação do gênero de fungos rizoctonióides;
- O sequenciamento do espaçador interno transcrito do rRNA é bastante útil na delimitação da afinidade entre fungos micorrízicos de orquídeas
- Os isolados obtidos neste trabalho agrupam-se a diferentes clados de fungos micorrízicos, o que demonstra que há uma grande diversidade fúngica associada a orquídeas neotropicais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, T. F.; RASMUSSEN, H. N. The mycorrhizal species of *Rhizoctonia*. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Ed.). **Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. p. 379-390.

ANDERSEN, T. F. A study of hyphal morphology in the form genus *Rhizoctonia*. **Mycotaxon**, v. 37, p. 25-46, 1990.

ANDERSEN, T. F.; STALPERS, J. A. A check-list of *Rhizoctonia* epithets. **Mycotaxon**, v. 51, p. 437-457, 1994.

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**, 7. New York: Academic Press, 1979. p. 421-655.

ARDITTI, J.; ERNST, R.; YAM, T. W.; GLABE, C. The contributions of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. **Lindleyana**, v. 5, p. 249-255, 1990.

BAYMAN, P.; LEBRÓN, L.; TREMBLAY, R. L.; LODGE, J. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). **New Phytologist**, v. 135, p. 143-149, 1997.

BENZING, D. H. Why is Orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedlings mycotrophic? **Selbyana**, v. 5, p. 241-242, 1981.

BEYRLE, H. F.; SMITH, S. E.; PETERSON, R. L.; FRANCO, C. M. M. Colonization of *Orchis morio* protocorms by a mycorrhizal fungus: effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1128-1140, 1995.

BHUIYAN, K. A.; ARAI, K. Light microscopic observation of the process of perfect hyphal anastomosis of *Rhizoctonia oryzae* (Ryker & Gooch). **Mycologist**, v. 8, p. 102-104, 1994.

BURGEFF, N. **Die samenkeimung der orchideen**. Jena: G. Fischer, 1936.

CAMPBELL, E. O. Morphology of the fungal association in three species of *Corallorhiza* in Michigan. **Michigan Botany**, v. 9, p.108-113, 1970.

CARLING, D. E.; KUNINAGA, S.; BRAINARD, K.A. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2 (AG-2) and AG-BI. **Phytopathology**, v. 92, p.43-50, 2002.

CARLING, D. E.; POPE, E. J.; BRAINARD, K. A.; CARTER, D. A. Characterization of Mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an Orchid, including AG-12, a new anastomosis group. **Phytopathology**, v. 89, n. 10, p. 942-946, 1999.

CHA, J. Y.; IGARISHI, T. *Armillaria jezoensis*, a new symbiont of *Galeola septentrionalis* (Orchidaceae) in Hokkaido. **Mycoscience**, v. 37, p. 21-24, 1996.

CUBETA, M. A.; ECHANDI, E.; ABERNETHY, T.; VILGALYS, R. Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal gene. **Molecular Plant Pathology**, v. 81, p.1395-1400, 1991.

CUBETA, M. A.; ECHANDI, E.; ABERNETHY, T.; VILGALYS, R. Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* Species using restriction analysis of an amplified ribosomal gene. **Molecular Plant Pathology**, v. 81, p.1395-1400, 1991.

CUBETA, M. A.; VILGALYS, R. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. **Phytopathology**, v. 87, p. 480-484, 1997.

CUBETA, M. A.; VILGALYS, R. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. **Phytopathology**, v. 87, p. 480-484, 1997.

CURRAH, R. S.; SMERECIU, E. A.; HAMBLETON, S. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Platanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae). **Canadian Journal of Botany**, v. 68, p. 1171-1181, 1989.

CURRAH, R. S.; SIGLER, L.; HAMBLETON, S. New Records And New Taxa Of Fungi From The Micorrhizae Of Terrestrial Orchids Of Alberta. **Canadian Journal Of Botany**, v. 65, p. 2473-2481, 1987.

CURRAH, R. S.; ZETTLER, L. W.; McINNIS, T. M. *Epulorhiza inquilina* sp. nov. from *Platanthera* (Orchidaceae) and a key to *Epulorhiza* species. **Mycotaxon**, v. 61, p. 338-342, 1997.

CURRAH, R. S.; SHERBURNE, R. Septal ultrastructure of some fungal endophytes from boreal orchid mycorrhizas. **Mycological Research**, v. 96, p. 583-587, 1992.

CURRAH, R. S.; ZELMER, C. A key and notes for the genera of fungi mycorrhizal 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. *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. Taxonomic and development aspects of the fungal endophytes of terrestrial orchid micorrhizae. **Lindleyana**, v. 6, p. 211-213, 1991.

CURRAH, R. S.; ZETTLER, L. W.; HAMBLETON, S.; RICHARDSON, K. A. Fungi from orchid micorrhizae. In: ARDITTI, J.; PRIDGEON, A. M. (Ed.). **Orchid biology: reviews and perspectives**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer, p. 117-170, 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.

DIJK, E.; WILLEMS, J. H.; ANDEL, J. Nutrient responses as a key factor to the ecology of orchid species. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 46, p. 339-363, 1997.

DOWNIE, D. G. Source of the symbiont of *Goodyera repens*. **Transactions of Botanical Society**, v. 35, p. 120-125, 1943.

FAN, L.; GUO, S. X.; CAO, W. Q.; XIAO, P. G.; XU, J. T. Isolation, culture, identification and biological activity of *Mycena orchidocola* sp. nov. in *Cymbidium sinense* (Orchidaceae). **Acta Mycologica Sinica**, v. 15, p. 251-255, 1996.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

GARRET, S. D. Decomposition of cellulose in soil by *Rhizoctonia solani* Kühn. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 45, p. 115-120, 1962.

GEHLERT, R.; KINDL, H. Induced formation of dihydrophenathrenes and bibenzyl synthase upon destruction of orchid mycorrhiza. **Phytochemistry**, v. 30, p. 457-460, 1991.

GOH, C. J.; SIM, A. A.; Lim, G. Mycorrhizal associations in some tropical orchids. **Lindleyana**, v. 7, p.13-17, 1992.

GONZALEZ, D.; CARLING, D. E.; KUNINAGA, S.; VILGALYS, R.; CUBETA, M. A. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. **Mycologia**, v. 93, p. 1138-1150, 2001.

HADLEY, G.; WILLIAMSON, B. Features of mycorrhizal infection in some Malayan orchids. **New Phytologist**, v. 71, p. 1111-1118, 1972.

HADLEY, G. Orchid Mycorrhiza. In: ARDITTI, J. (Ed.). **Orchid biology** – reviews and perspectives II. Ithaca: Cornell University Press, 1982. p. 84-118.

HADLEY, G.; JOHNSON, R. P. C.; JOHN, D. A. Fine structure in the host-fungus interface in orchid mycorrhiza. **Planta**, v. 100, p. 191-199, 1971.

HYAKUMACHI, M.; MUSHIKA, T.; OGISO, Y.; TODA, T.; KAGEYAMA, K.; TSUGE, T. Characterization of a new cultural type (LP) of *Rhizoctonia solani* AG2-2 isolated from warm-season turfgrasses, and its genetic differentiation from other cultural types. **Plant Pathology**, v. 47, p. 1-9, 1998.

- IRAWATI, S. Orchid mycorrhiza in *Taeniophyllum obtusum* L. **Journal of Biology**, v. 1, p. 6-16, 1993.
- KEIJER, J.; HOUTERMAN, P. M.; DULLEMANS, A. M.; KORSMAN, M. G. Heterogeneity in electrophoretic karyotype within and between anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*. **Mycological Research**, v. 100, p.789-797, 1996.
- KRISTIANSEN, K. A.; RASMUSSEN, F. N.; RASMUSSEN, H. N. Seedlings of *Neuwiedia* (Orchidaceae subfamily Apostasioideae) have typical orchidaceous mycotrophic protocorms. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 956-959, 2001.
- KRISTIANSEN, K. A.; RASMUSSEN, F. N.; RASMUSSEN, H. N. Seedlings of *Neuwiedia* (Orchidaceae subfamily Apostasioideae) have typical orchidaceous mycotrophic protocorms. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 956-959, 2001.
- KUNINAGA, S.; NATSUAKI, T.; TAKEUCHI, T.; YOKASAWA, R. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, v. 32, p. 237-247, 1997.
- LAN, J.; XU, J.; LI, J. Study on the infecting process of *Mycena osmundicola* on *Gastradia elata* by autoradiography. **Acta Mycologica Sinica**, v. 15, p. 197-200, 1996.
- LEAKE, J. R. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. **New Phytologist**, v. 127, p. 171-216, 1994.
- MA, M.; TAN, T.K.; WONG, S. M. Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids. **Mycological Research**, v. 107, p. 1041-1049, 2003.
- MARX, D. H. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic and soil bacteria. **Phytopathology**, v. 59, p. 153-163, 1969.
- MASUHARA, G.; KATSUYA, K. Mycorrhizal differences between genuine roots and tuberous roots of adult plants of *Spiranthes sinenses* var. *amoena* (Orchidaceae) *in vitro*. **Botanical Magazine**, v. 105, p. 453-460, 1992.
- MASUHARA, G.; KATSUYA, K. In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinenses* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). **New Phytologist**, v. 127, p. 711-718, 1994.
- MASUHARA, G.; KATSUYA, K.; YAMAGUCHI, K. Potential for symbiosis of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* with seeds of *Spiranthes sinenses* var. *amonea* *in vitro*. **Mycological Research**, v. 97, p. 746-752, 1993.
- MATSUMOTO, M.; FURUYA, N.; TAKANAMI, Y.; MATSUYAMA, N. RFLP analysis of the PCR-amplified 28S rDNA in *Rhizoctonia solani*. **Mycoscience**, v. 37, p. 351-356, 1996.
- McCORMICK, M. K.; WHIGHAM, D. F.; O'NEILL, J. P. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. **New Phytologist**, v. 163, p. 425-438, 2004.
- McKENDRICK, S. L.; LEAKE, J. R.; TAYLOR, D. L.; READ, D. J. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorrhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 145, p. 523-537, 2000a.

- McKENDRICK, S. L.; LEAKE, J. R.; READ, D. J. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: Transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. **New Phytologist**, v. 145, p. 539-548, 2000b.
- MEINHARDT, L. W. Sybr® green is used to evaluate nuclei number of fungal mycelia. **Biotechniques**, v. 31, p. 42-46, 2001.
- MOORE, R. T. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. **Mycotaxon**, v. 29, p. 91-99, 1987.
- MOORE, R. T. The dolipore/parenthesome septum in modern taxonomy. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Ed.). **Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. p. 13-35.
- NICOLETTI, R.; LAHOZ, E.; KANEMATSU, S.; NAITO, S.; CONTIL, R. Characterization of *Rhizoctonia solani* isolates from tobacco fields related to anastomosis groups 2-1 and BI (AG 2-1 and AG BI). **Journal of Phytopathology**, v. 147, p. 71-77, 1999.
- NOGUEIRA, R. E.; KASUYA, M. C. M.; LANNA, M. C. S.; MENDONÇA, M. P.; PEREIRA, O. L. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do quadrilátero ferrífero, Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, (submetido para publicação). 2004.
- O'BRIEN, P. A. Molecular markers in Australian isolates of *Rhizoctonia solani*. **Mycological Research**, v. 98, p. 665-671, 1994.
- OTERO, J. T.; ACKERMAN, J. D.; BAYMAN, P. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 1852-1858, 2002.
- OTERO, J. T.; ACKERMAN, J. D.; BAYMAN, P. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. **Molecular Ecology**, 2004.
- PEREIRA, O. L.; ROLLEMBERG, C. L.; BORGES, A. C.; MATSUOKA, K.; KASUYA, M. C. M. *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. **Mycoscience**, v. 44, p. 153-155, 2003.
- PERKINS, A. J.; MCGEE, P. A. Distribution of the orchid mycorrhizal fungus, *Rhizoctonia solani*, in relation to its host, *Pterostylis acuminata*, in the field. **Australian Journal of Botany**, v. 43, p. 565-575, 1995.
- PETERSON, R. L.; CURRAH, R. S. Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* (Orchidaceae) and *Ceratobasidium cereale*. **Canadian Journal of Botany**, v. 68, p. 1117-1125, 1990.
- PETERSON, R. L.; BONFANTE, P.; FACCIO, A.; UETAKE, Y. The interface between fungal hyphae and orchid protocorm cells. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, p. 1861-1870, 1996.

- PETERSON, R. L.; UETAKE, Y.; ZELMER, C. Fungal symbiosis with orchid protocorms. **Symbiosis**, v. 25, p. 29-55, 1998.
- RASMUSSEN, H. N. Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rehb. F.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae) during germination *in vitro*. **New Phytologist**, v. 116, p. 137-147, 1990.
- RASMUSSEN, H. N.; WHIGHAM, D. F. Seed ecology of dust seeds *in situ*: a new study technique and its application in terrestrial orchids. **American Journal of Botany**, v. 80, p. 1374-1378, 1993.
- RASMUSSEN, H. N. **Terrestrial orchids**: from seed to mycotrophic plant. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- RASMUSSEN, H. N.; WHIGHAM, D. F. Importance of woody debris in seed germination of *Tipularia discolor* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 85, p. 829-835, 1998.
- RASMUSSEN, H. N.; CALDWELL, B. A.; WHIGHAM, D. F.; O'NEILL, J. P. Evidence of pregermination, preinfection signaling in the orchid-fungal symbiont-substrate relationship In: AHONENJONNARTH, U.; DANELL, E.; FRANSSON, P.; FINLAY, R. (Ed.). Uppsala, Sweden. 1998. p. 142-142.
- REINECKE, T.; KINDL, H. Characterization of bibenzyl syntase catalysing the biosynthesis of phytoalexins of orchids. **Phytochemistry**, v. 35, p. 63-66, 1994a.
- REINECKE, T.; KINDL, H. Inducible enzymes of the 9,10-dihydro-phenanthrene pathway. Sterile orchid plants responding to fungal infection. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 7, p. 449-454, 1994b.
- RICHARDSON, K. A.; 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.; HAMBLETON, S. Basidiomycetes endophytes from the roots of neotropical epiphytic orchidaceae. **Lindleyana**, v. 8, p. 127-137, 1993.
- RICHARDSON, K. A.; PETERSON, R. L.; CURRAH, R. S. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae). **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 291-300, 1992.
- RIVAS, M.; WARNER, J.; BERMUDEZ, M. Presence of mycorrhizas in orchids of a neotropical botanical garden. **Revista de Biología Tropical**, v. 46, p. 211-216, 1998.
- ROBERTS, P. *Thanatephorus achraceus*: A saprotrophic and orchid endomycorrhizal species. **Sydowia**, v. 50, p. 252-256, 1998.
- ROBERTS, P. **Rhizoctonia-forming fungi**: a taxonomic guide. Kew: The Herbarium, Royal Botanic Garden, 1999.
- SALAZAR, O.; SCHNEIDER, J. H. M.; JULIÁN, M. C.; KEIJER, J.; RUBIO, V. Phylogenetic subgrouping of *Rhizoctonia solani* AG 2 isolates based on ribosomal ITS sequences. **Mycologia**, v. 91, p. 459-467, 1999.

- SCRUGLI, A.; COGONI, A. Considerazioni morfologiche sugli endofiti micorriziei delle orchidee saprofiti delle Sardegna. **Micologica Italiana**, v. 2, p.105-107, 1994.
- SEN, R.; HIETALA, A. M.; ZELMER, C. D. Common anastomosis and internal transcribed spacer RFLP groupings binucleate *Rhizoctonia* isolates representing root endophytes of *Pinus sylvestris*, *Ceratophyllum demersum* spp. from orchid mycorrhizas and a phytopathogenic anastomosis group. **New Phytologist**, v. 144, p. 331-341, 1999.
- SENTHILKUMAR, S.; KRISHNAMURTHY, K. V.; VENGADESHWARI, G. N. Studies on the mycorrhizal association of the ornamental orchid *Papilionanthe subulata*. **Philippine Journal of Science**, v. 127, p. 189-199, 1998.
- SENTHILKUMAR, S.; BRITTO, S. J.; KRISHNAMURTHY, K.V.; HARIHARAN, C. Biochemical analysis of mycorrhizal roots of *Aerides maculosum*. **Phytomorphology**, v. 50, p. 273-279, 2000.
- SHAGUFTA, S.; ARUN, R.; SIDDIQUE, S.; RAGHUVANSHI, A. Seasonal changes in *Vanda tessellata* mycorrhizae. **Journal of Orchid Society**, v. 7, p. 85-83, 1993.
- SNEH, B.; BURPEE, L. L.; OGOSHI, A. **Identification of *Rhizoctonia* species**. St. Paul, MN. The American Phytopathological Society, 1991.
- SNEH, B. Non pathogenic isolates of *Rhizoctonia* spp. and their role in biological control. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, D. (Ed.). **Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 473-483, 1996.
- SPEACHT, C. A.; DIRUSSO, C. C.; NOVONTY, 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.; GAMS, W. Two proposals to conserve the names *Rhizoctonia* and *R. solani* (Hyphomycetes). **Taxon**, v. 47, p. 725-726, 1998.
- STALPERS, J. A.; ANDERSEN, T. F. A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia*. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Ed.). **Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. p. 49-66.
- SWOFFORD, D. L. **Paup**: phylogenetic analysis using parsimony and other methods, Version 4.0.0 D54, D59. Laboratory of Molecular Systematics, Smithsonian Institution, Washington, D.C. USA. 1998.
- SWOFFORD, D.L. **Paup***. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates. 2002.
- TATARENKO, I. V. Mycorrhiza of orchids (Orchidaceae) of the primorye territory. **Botanical Zhurnal**, v. 80, p. 64-72, 1995.
- TAYLOR, D. L.; BRUNS, T. D. Independent specialized invasions of ectomycorrhizal mutualists by two nonphotosynthetic orchids. **Proceeding of National Academy of Science**, v. 94, p. 4510-4515, 1997.

TAYLOR, D. L.; BRUNS, T. D. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the “cheating” orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1719-1732, 1999.

TERASHITA, T. Biological species of *Armillaria* symbiotic with *Galeola septentrionalis*. **Nippon Kingakukai-Kaiho**, v. 37, p. 45-49, 1996.

TREMBLAY, R. L.; ZIMMERMAN, J. K.; LEBRÓN, L.; BAYMAN, P.; SASTRE, I.; AXELROD, F.; ALERS, G. J. Host specificity and low reproductive success in the rare endemic Puerto Rican orchid *Lepanthes caritensis*. **Biological Conservation**, v. 85, p. 297-304, 1998.

UETAKE, Y.; KOBAYASHI, K.; OGOSHI, A. Ultrastructural changes during the symbiotic development of *Spiranthes sinensis* (Orchidaceae) protocorms associated with binucleate *Rhizoctonia* anastomosis group C. **Mycological Research**, v. 96, p. 199-209, 1992.

UETAKE, Y.; ISHIZAKA, N. Cytochemical localization of adenylate cyclase activity in the symbiotic protocorms of *Spiranthes sinensis*. **Mycological Research**, v. 100, p. 105-112, 1996.

UMATA, H. Seed Germination of *Galeola altissima*, an achlorophyllous orchid, with aphyllophorales fungi. **Mycoscience**, v. 36, p. 369-339, 1995.

UMATA, H. Formation of endomycorrhizas by an achlorophyllous orchid, *Erythrorchis ochobiensis*, and *Auricularia polytrichia*. **Mycoscience**, v. 38, p. 335-339, 1997a.

UMATA, H. *In vitro* germination of *Erythrorchis ochobiensis* (Orchidaceae) in the presence of *Lyophyllum shimeji*, an ectomycorrhizal fungus. **Mycoscience**, v. 38, p. 355-357, 1997b.

UMATA, H. *In vitro* symbiotic association of an achlorophyllous orchid, *Erythrorchis ochobiensis*, with orchid and non-orchid fungi. *Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University*, v. 34, 1998a.

UMATA, H. A new biological function of shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in a myco-heterotrophic orchid *Erythrorchis ochobiensis*. **Mycoscience**, v. 39, p. 85-88, 1998b.

Van der KINDEREN, G. A method for the study of field-germinated seeds of terrestrial orchids. **Lindleyana**, v. 10, p. 68, 1995.

VILGALYS, R.; GONZÁLEZ, D. Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 80, p. 151-158, 1990.

VILGALYS, R.; CUBETA, M. A. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 135-155, 1994.

WANG, H.; WANG, Z.; ZHANG, F.; LIU, J.; HE, X. A cytological study on the nutrient-uptake mechanism of a saprophytic orchid *Gastrodia elata*. **Acta Botanica Sinica**, v. 39, p. 500-504, 1997.

WARCUP, J. H.; TALBOT, P. H. B. Perfect states of *Rhizoctonia*s associated with orchids. **New Phytologist**, v. 66, p. 631-641, 1967.

WARCUP, J. H.; TALBOT, P. H. B. Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids II. **New Phytologist**, v. 70, p. 35-40, 1971.

WARCUP, J. H.; TALBOT, P. H. B. Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids III. **New Phytologist**, v. 86, p. 267-272, 1980.

WARCUP, J. H. Mycorrhizal associations of isolates of *Sebacina vermifera*. **New Phytologist**, v. 110, p. 227-231, 1988.

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. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press. 1990. p.315-322,

WILLIAMSON, B. Acid phosphatase and esterase activity in orchid mycorrhiza. **Planta**, v. 112, p. 149-158, 1973.

XU, J. T.; MU, C. The relation between growth of *Gastrodia elata* protocorms and fungi. **Acta Botanica Sinica**, v. 32, p. 26-31, 1990.

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.

ZELMER, C. D.; CURRAH, R. S. Symbiotic germination of *Spiranthes lacera* (Orchidaceae) with a naturally occurring endophyte. **Lindleyana**, v. 12, p. 142-148, 1997.

ZETTLER, W. D.; DELANEY, T. W.; SUNLEY, J. A. Seed propagation of the epiphytic green-fly orchid, *Epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus. **Selbyana**, v. 19, p. 249-253, 1998.

ZETTLER, L. W.; BURKHEAD, J. C.; MARSHALL, J. A. Use of a mycorrhizal fungus from *Epidendrum conopseum* to germinate seed of *Encyclia tampensis* *in vitro*. **Lindleyana**, v. 14, p. 102-105, 1999.

APÊNDICE

Tabela 1A – Sequências referentes às regiões ITS1, 5.8S, ITS2 de fungos micorrízicos isolados de orquídeas. Foram utilizados os primers ITS 1 e ITS 4

Isolado	Sequência
OM6	TGACGTTTCGCTTTTCCGTCGTCCTCGGGACGTGAAGCCGCTCTGGTCGAGG ATAAACGACCCCTCTGACCGAGGCTAACCCGTCGCTCCCTCGGTGTTACCT CCCCGAGCACACGTTAAAGATCGTTCGCGTTGTGAGTCTGACACCAGTT GTAACACTTTTTACAACCGGTAGCGCTGGATCCCTTGGCACGTCATTTCGAT GAAGACCGTTGCAAATTGCGATAAAGTGATGTGATGCGCAAGTCCACCACT TATACGTGAATCATCGAGTTGTTGAACGCACTGCACCCGCGCCCTAAACCGG CTGCGGTATGCCCTTTGAGCGTCATTGTTTCCCTTCGGGAGTCTTTGCTTG CAAGGACCCGAGTTCGGAGTCCCTCGGTCCCCCGGGATCGTGTCTCTCA GATGCGTCGCGCCGATCGCCTGATGGGTACTCTAATGCCTGAGCGTGGAGT CCCTCGGGAGCCGAGA
OM16	GACTGCGGAAGGATCATAGTAATCGTCTTTGACGTTTCGCTTTTTCCGTTGTC CTCGGGACGTTAATGTGCTCTGGTCGAGGATAAATGACCCCTCTGACCGAG GTAAAACCTGTGCTCTGTGTTACCTTCCGAGGCACACGTTAAAGATCGTT CCGCGTTGTGAGTCGTAACACCAGTTGTATAAACTTTTTACAACCGGTAGC GATGGATCCCTTGGCACGTCATTTCGATGAAGACCGTTGCAAATTGCGATAA AGTGATGTGATGCGCAAGTCCACCACTTATACGTGAATCATCGAGTTGTTG AACGCATTGCACCCGCGCCCTAAACCGGCTGCGGTATGCCCTTTGAGCGTC ATTGTATTCCTTCGGGAGTCCCTTTACAAGGACCCGAGTTCGGAGTCCCTCG GTCTCTTCATGGATCGTGTCTCTTAGATGCGTCGCCCCGATCGCCTGATGG GTCTCTAATGCCTAAGCGTGGAGTTCCTTCAGAGTCCGAGACGTGCTTGA CCGGGTGTTGAGCTCGCGTCGCCAAGTCTGCCTTAACCAGCAGTACTACAA CGCATGACTCATATGGGGTAGGACAA
OM23	TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATAGTAATCGTCTTT GACGTTTCGCTTTTTCCGTTGTCCTCGGGACGTTAATGTGCTCTGGTCGAGGA TAAATGACCCCTCTGACCGAGGTAAAACCTGTGCTCTGTGTTACCTTCCG AGGCACACGTTAAAGATCGTTCGCGTTGTGAGTCTAACACCAGTTGTATA AACTTTTTACAACCGGTAGCGATGGATCCCTTGGCACGTCATTTCGATGAAG ACCGTTGCAAATTGCGATAAAGTGATGTGATGCGCAAGTCCACCACTTATA CGTGAATCATCGAGTTGTTGAACGCATTGCACCCGCGCCCTAAACCGGCTGC GGTATGCCCTTTGAGCGTCATTGTATTCCTTCGGGAGTCCTTTTACAAGGA CCCGAGTTCGGAGTCCCTCGGTCTCTTCTGGATCGTGTCTCTTAGATGCGT CGCACCGATCGCCTGATGGGTCTCTAATGCCTAAGCGTGGAGTTCCTTCA GATCCGAGACGTGCTTGACCGGGTGTGAGCTCGCGTCGCCAAGTCTGCC TTAACAGCAGTACTACAACGCATGACCTCATTGGGGTAGGACAACCCGCT AGACTTAAGCATATCAATA
OM24	TACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATAGTAATCGTCTTTG ACGTTTCGCTTTTTCCGTTGTCCTCGGGACGTTAATGTGCTCTGGTCGAGGAT AAATGACCCCTCTGACCGAGGTAAAACCTGTGCTCTGTGTTACCTTCCGA GGCACACGTTAAAGATCGTTCGCGTTGTGAGTCTAACACCAGTTGTATAA ACTTTTTACAACCGGTAGCGATGGATCCCTTGGCACGTCATTTCGATGAAGA CCGTTGCAAATTGCGATAAAGTGATGTGATGCGCAAGTCCACCACTTATAC GTGAATCATCGAGTTGTTGAACGCATTGCACCCGCGCCCTAAACCGGCTGC GTATGCCCTTTGAGCGTCATTGTATTCTTCGGGAGTCCTTTTACAAGGAC CCGAGTTCGGAGTCCCTCGGTCTCTTCTGGATCGTGTCTCTTAGATGCGTC GCACCGATCGCCTGATGGGTCTCTAATGCCTAAGCGTGGAGTTCCTTCA AGTCCGAGACGTGCTTGACCGGGTGTGAGCTCGCGTCGCCAAGTCTGCCT TAACCAGCAGTACTACAACGCATGACCTCATTGGGGTAGGACAACCCGCTA GACTTAAGCATATCATA

Tabela 1A, Cont.

Isolado	Seqüência
OM2	TAGTCCTACACATGATTTGAGATCAGATCATAAATTAATTGTCCGAGCTAA TGGACTATTAGAAGCGGTCATCCTCAATCCTGGCCACCTTTTTACGGTGTCC TCGGCGAGTGATACTTATCACGCCGAGTGAACCAATTCATGGAGATCCAG CTAATTGATTTAAGAGGAGCAGACGTGAATCCGCAGACCCCAAGTCCAA AGCAGAGCCGATTGAATTAACAAAAGACTTGCTTTGAGAATTCATGATAC TCAAACAGGCATGCTCCGAGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAA GATTCGATGATTCACTGAATTCTCGCAATTCACATTACTTATCTGATTTGCG TGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAACTTTGAT TTACTATCGTCGTTACATCAATTACATTCAATTTTAAATTAATTAGATTTTG TGTGATGGCACGACGGAGGCCATCCTATTTAAACGACAAAACCTCCGTCT CACAATGTTGCACAGGGTGTGTGGATCGAAAGAGAACGGTGTGCACATC GCCTCGAGATGGCCAGCTACAACCGACTCTACATTCATTCATTAATGATCC TTCC
OM3	CAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATGAATGTAGA GTTGGTTGTCGCTGGCCCTCTTGGGGGCATGTGCACGCCTTCTCTTTCATCC ACACACACCTGTGCACTTGTGAGACGGAGGGCTTTAATTAGCCTTCCGTCT ACTTAATCACACAACTCATTTAATTTAATTTGAATGTAATTGATGTAACGC ATCATTGAACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGA AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT CATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCC TGTTGAGTATCATGAAATTCTCAAAGTAAATCTTTTGTTAATCAACTGGT TTGCTTTGGACTTGGAGGCCTTTCAGATTTACATCTGCTCCTCTTAAATG CATTAGCTGGATCTCAGTATATGCTTGGTTCCACTCGGCGTGATAAGTATC ACTCGCTGAGGACACTGTAAAAAGTGGCCAGGAAATACAGATGAACCGCT TCTAATAGTCTATTAAGTTAGACAATTAATTTAAGATACTGATCTC
OM9	CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAATTTAATGTGGAGTTGGTT GTAGCTGGTCCATTGGATTTTTTTTTAAATAAATTCCTGGGCATGTGCAC GCCTTCTCTTTCATCCACACACACCTGTGCACTGTGAGGCAGATGTGGGG GACTTGATTGTAACCCCTCTGTCTACTTAATTCACACAACTCAATTTATCT TAAAATGAATGTAATTGATGTAACGCATCTAATACTAAGTTTCAACAACGG ATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCGT CCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTTGAGTATCATGAAATCTTCAAAGT CAATCTTTTGTTAACTCAACTGGTTGCACTTTGGTATTGGAGGTCTTTGCAG TTTCACACCTGCTCCTCTTTGTTTATTAGCTGGATCTCAGTGTATGCTTGGT TCCACTCGGCGTGATAAGTTATCTATCGCTGAGGACACTGTAAAAAGGTGG CCAAGGTAAATGCAGATCGAACCGCTTCCAATAGTCCATTTACTTGGACAA ATACATTTATGATTTGATCTCAA
OM10	CGGAAGGATCATTACTGAATGAATGTAGAGACCTGGTTGTAGCTGGCCTTC ATTGGCATGTGCACGCCCTCATTTTCATCCACACACCCCATGTGCACTTG TGAGACGGAGACTTGGCTTCGGGTCTCTGTCTGTCAATTACACAACTCATA TTAGTTAATCAGAATGTCTTTGATGTAACGCCATCCTATATACTAAGTTT CAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCT GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC ACCTTGCCTCCTTGGTATTCTTGGAGCATGCCTGTTGAGTATCATGAAA TTCTCAGAGTAGATCATTTTGTTCATTCAATTGACTCTGCTTCTGGACTTGG AGGCCTGCAGATGCAAGTCTGCTCCTCTTAAATGCATTAGCATGGATCTCA GTCAGCCTGGTTCCACTCGGCGTGATAAGTATCATTGCTGAGGACACCCT CCAAAGGGTGGCCAGGAGTACAGATGAACGCTTCTAATAGTCTATTTGGTT AGACAAGCAAACATTATGATCTGATCTCAAATACAGGTAGGACT

Tabela 1A, Cont.

Isolado	Seqüência
OM11	GGAAGGATCATTATTGAATGAATGTAGAGTCGGTTGTAGCTGGCCTCCTTT GGGGGGCATGTGCACACCTTCTCTTTCATCCACACACCCCTGTGCACCTGT GAGACAGAGACTTTTTTGCTCCTTTAATTAGGACAGTAGTTTCCTGTCTGCT TCACATAAAACCATATTATTAATTTTGAATGTAATTTGATGTAACGCATCT AATACAAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA ATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCTCGGAGCACGCCTGTTG AGTATCATGAAATTCTCAAAACAAGTCTTTTGTAAATTCAAATAGGCCTTTGT TTTGGACTTGGAGGTCTGCAGATTACATCTGCTCCTCTTAAATAAATTAGC GTGGATCTCCATGAACTTGGTCCACTCGGCGTGATAAGTATCACTCGCTG AGGACACCGTAAAAAGGTGGCCAGGCTTGAGGATGAGCCGCTTCTAACAG TCCATTTAATTGGACAAATTAATTTATGATCTGATCTC
OM12	GGTCCAATGGATTTTTTTTTAAGTTGAAAGTTAAAAATTAATAAATTGGGCAT GTGCACGCCTTTCTCTTTCATCCATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGAT TCAGAGGAACTTTCTTCTTTTTTTCTTTGA GGGGGGACCCCTGCCTGTCTAT TTAATTTATATAAACTCAATTTAATTTAAAATGAATGTAATGGATGTAACA CATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC ATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTAGGCATTCTTTGGAGCATGCAT GTTTGAGTATCGTGAATATTCAAAGTAAATCTTTTGTACTCGAATTGAT TCTACTTTGGTTTTGGAGGTTTATTGCAGCTTACACCTGCTCCTCTTTGTGC ATTAGCTGGATTCTCAGTGTTATGCTTGGTTCACTCGCGTGATAAATTAATT TAATGCTGAGGCACTCCATGACAAATGGGGGTGGCCAAGGTAAATACAG ATGAACCTGCTTCTAATAGTCCATTGAATTGGACAATATATATTTATTATGA TCTGATCTCAAATACATGGTAGGACTA
OM14	ACAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTTAATGTA GAGTTGGTTGTAGCTGGCCTGATTAATCTTTGGGCATGTGCACACCTTCTCT TTCATCCACACACACCTGTGCACCTGTGAGGCAGAAGGGGACTTTTAATTC AATTTAATTGGACCCTCTGTCTACCTAATTCACACAACTCTATTTATTTA AAATGAATGTAATTGATGTAACGCATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGAT CTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCC TTGGTATTCCTTGGAGCATGCCTGTTTGTAGTATCATGAAATCTTCAAAGTAA ATCTTTTGTAAATTC AATTGGTTCTACTTTGGTATTGGAGGCTTTGCAGTTTC ACACCTGCTCCTCTTTGTGCATTAGCTGGATCTCAGTGTTATGCTTGGTCC ACTCAGCGTGATAAGTATCTATCGCTGAGGACACTGTAACAGGTGGCCAAG GTAAATGCAGATGAACGCTTCTAATAGTCCATTGACTTGGACAATATTTTT ATGATCCTGATCTCAAAT