

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade micorrízica em *Coppensia doniana* (Orchidaceae) e  
filogenia de fungos micorrízicos associados à subtribo Oncidiinae**

**Rafael Borges da Silva Valadares**

Dissertação apresentada para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências. Área de  
concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Rafael Borges da Silva Valadares  
Engenheiro Agrônomo

**Diversidade micorrízica em *Coppensia doniana* (Orchidaceae) e filogenia de  
fungos micorrízicos associados à subtribo Oncidiinae**

Orientadora:

Prof.<sup>a</sup> Dra. **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO**

Dissertação apresentada para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências. Área de  
concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba**

**2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Valadares, Rafael Borges da Silva

Diversidade micorrízica em *Coppensia doniana* (Orchidaceae) e filogenia de fungos micorrízicos associados à subtribo Oncidiinae / Rafael Borges da Silva Valadares. - - Piracicaba, 2009.

94 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.  
Bibliografia.

1. Biodiversidade 2. Ecologia microbiana 3. Fungos micorrízicos 4. Germinação  
Micorriza 6. Orchidaceae 7. Orquídea I. Título

CDD 635.93415  
V136d

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

Aos meus pais Moacir e Jane Mar, meus avós Manoel e Benedita, minha avó Jany e, em especial, ao meu avô Jarbas pelos ensinamentos, amizade e companheirismo

DEDICO



## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor meu Deus, criador dos céus, da terra e de toda biodiversidade neles existente. Aos meus pais Moacir e Jane Mar, meus avós Manoel, Benedita, Jarbas e Jany, meus tios em especial a tia Janizelia e tio Cleber e a minha prima Gizeli. Aos meus irmãos Douglas e Gabriel grandes “brothers” de hoje e de sempre.

À minha orientadora professora Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, que me ensinou muito mais que a Microbiologia do Solo. Aos professores Marlon C. Pereira, Catarina M. Kasuya, Mauricio D. Costa e Olinto L. Pereira pelo apoio e incentivo desde a graduação na Universidade Federal de Viçosa.

Aos professores, Juan Carlos Menjivar Flores e Marcio Lambais pela oportunidade concedida de realizar meu intercâmbio na Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira, entre os meses de Maio a Julho de 2009. Ao professor e grande amigo Joel Tupac Otero, que me recebeu na Colômbia e me orientou durante o trabalho de pesquisa. Ao professor Jaime Eduardo Muñoz e ao técnico Andres Posso que possibilitaram minhas análises no laboratório daquela Universidade. A todos os amigos que fiz durante o intercâmbio, em especial a Diana, Juliet, Joaco, Daniel e Hans, nunca vou esquecer vocês.

À pesquisadora Samantha Khöeler, Eng<sup>o</sup> Agrônomo Alexandre Ferreira e ao técnico Dorival pelo apoio durante os trabalhos de campo.

A todos meus amigos do laboratório de microbiologia do solo, em especial Rafael Vasconcellos, Andre Nakatani, Mylenne Pinheiro, Carlos Ribeiro, Marina Horta, Priscilla Trigo, Júlia Lima, Iwanne, Alexandre Martines, Dilmar Baretta, Jamil Pereira, Daniel Bini, Daniel Lammel, Henrique, Carolina Feliciano, Caroline Garcia, Simone, Pilar, Aline, Aninha, Gabriela, Sara e também aos amigos alunos do professor Marcio. Aos técnicos Denise Mescolloti e Fernando Baldesin pela paciência que tiveram comigo. A minha amiga Jeanine Acosta pelas revisões no texto.

Aos meus amigos de república Raphael Beirigo, Alexandre do Nascimento e minha grande amiga Prof<sup>a</sup> Alessandra de Paula. Às minhas amigas Rafaella Pennachi, Letícia

6

Espíndola e Graziela Barreto, amo vocês! Aos meus amigos de Viçosa Maurício Pontes, Melissa Bocayuva, Leticia dos Santos e André Bittencourt grandes e inesquecíveis parceiros.

A todos que de alguma forma acreditaram em mim e me deram aquela força quando necessário. Obrigado!



## Sumário

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Histórico.....	17
2.2 A família Orchidaceae.....	17
2.3 Dependência micorrízica.....	18
2.4 Infecção e colonização.....	19
2.5 Diversidade e especificidade na interação.....	22
2.6 Os fungos rizotonióides.....	23
2.7 Taxonomia de fungos rizotonióides: Uso da região ITS.....	28
2.8 Metabolismo 1: Estratégias para obtenção de Carbono.....	29
2.9 Metabolismo 2: Transferência de nutrientes entre os simbiontes.....	29
2.10 Utilização da associação: Biotecnologia da produção de orquídeas.....	30
3 Material e métodos.....	32
3.1 Coleta.....	32
3.1.1 <i>Coppensia doniana</i> , Campos do Jordão-SP.....	32
3.1.2 Orquídeas da subtribo Oncidiinae, Valle Del Cauca – Colômbia.....	32
3.2 Isolamento.....	34
3.2.1 <i>Coppensia doniana</i> , Campos do Jordão-SP.....	34
3.2.2 Orquídeas da subtribo Oncidiinae, Valle del Cauca – Colômbia.....	35
3.3 Cultivo e manutenção dos fungos rizotonióides.....	35
3.4 Caracterização morfológica.....	35
3.4.1 Características quantitativas.....	35
3.4.1.1 Taxas de Crescimento.....	35
3.4.1.2 Células monilióides.....	36
3.4.1.3 Diâmetro de hifa vegetativa e condição nuclear.....	36
3.4.2 Características qualitativas.....	34
3.5 Germinação simbiótica.....	37
3.5.1 Desinfestação das sementes.....	37

3.5.2 Cultivo simbiótico.....	37
3.5.3 Confirmação da associação micorrízica.....	38
3.6 Análise estatística.....	38
3.7 Análises moleculares.....	38
3.7.1 Extração do DNA.....	38
3.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	40
3.7.3 Sequenciamento.....	40
3.7.4 Análise dos resultados.....	41
4 Resultados.....	42
4.1 Isolamento e identificação preliminar.....	42
4.1.1 <i>Coppensia doniana</i> , Campos do Jordão.....	42
4.1.2 Orquídeas da subtribo Oncidiinae.....	45
4.2 Caracterização morfológica.....	46
4.2.1 Dados qualitativos.....	46
4.2.2 Dados quantitativos.....	50
4.3 Sequenciamento da região ITS e análises filogenéticas.....	53
4.3.1 <i>Coppensia doniana</i> , Campos do Jordão.....	53
4.3.2 Isolados de orquídeas da subtribo Oncidiinae, Colômbia.....	56
4.4 Análises filogenéticas incluindo demais isolados da subtribo Oncidiinae estudadas no continente americano.....	58
4.5 Testes de germinação simbiótica.....	60
5 Discussão.....	64
5.1 Isolamento.....	64
5.2 Análises morfológicas e estatística multivariada.....	65
5.3 Condição nuclear: Fungos rizoctonióides uninucleados x binucleados.....	67
5.4 Sequenciamento e análises filogenéticas moleculares.....	68
5.5 Germinação simbiótica de <i>Coppensia doniana</i> .....	69
5.6 Considerações finais.....	70
CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS.....	87

## RESUMO

### **Diversidade micorrízica em *Coppensia doniana* (Orchidaceae) e filogenia de fungos micorrízicos associados à subtribo Oncidiinae**

Na natureza, as orquídeas são totalmente dependentes de fungos micorrízicos para germinar. Estes fungos podem penetrar nas células das raízes e formar pélotons, os quais, quando digeridos pela planta, providenciam açúcares simples para o embrião. Durante a fase aclorofilada de desenvolvimento da plântula, orquídeas são obrigatoriamente dependentes dos fungos; algumas continuam assim por toda vida enquanto outras se tornam facultativamente responsivas à colonização. O objetivo deste trabalho foi identificar quantos clados de fungos podem estabelecer associação micorrízica com *Coppensia doniana* (sin. *Oncidium donianum*), uma orquídea amplamente distribuída nos arredores de Campos do Jordão e, demonstrar como as características morfológicas dos isolados, quando analisadas com ferramentas de estatística multivariada, podem ser úteis para a taxonomia destes fungos. Dez plantas foram amostradas em um sítio com vegetação típica de campos de altitude, junto ao Parque Estadual de Campos do Jordão. Fungos foram isolados pela transferência asséptica de cortes de raízes contendo pélotons para meios de cultura BDA modificados. Três clados de fungos foram formados, tanto analisando as características qualitativas das culturas quanto as quantitativas. Os clados foram identificados como dois morfotipos do gênero *Ceratrhiza* (fase anamórfica de *Ceratobasidium*) e uma *Rhizoctonia*-uninucleada. O sequenciamento da região ITS produziu resultados idênticos a estes, mostrando os mesmos três clados. Todas as sequências tiveram alta correlação com sequências de *Ceratobasidium* depositadas no *Genbank*, o que sugere uma alta afinidade de *Coppensia doniana* com este gênero. Também ficou demonstrado que os dados morfológicos, quando associados à estatística multivariada são uma ferramenta útil na taxonomia polifásica de *Rhizoctonia* spp. As sequências dos isolados de *Coppensia doniana* também foram comparadas com as de isolados de outras orquídeas, dentro da subtribo Oncidiinae, incluindo: *Ionopsis utricularioides* e *Psycmorchis pussila*, coletadas na região do Valle del Cauca – Colômbia e isolados de

*Ionopsis utricularioides*, *Oncidium altissimum* e *Tolumnia variegata*, estudados por Otero (2002, 2004, 2007), em diferentes regiões de Porto Rico, Costa Rica, Cuba e Panamá. Esta última análise veio a comprovar a preferência de orquídeas da subtribo Oncidiinae por fungos do gênero *Ceratobasidium*, apesar de que os clados obtidos no Brasil e na Colômbia foram distantes filogeneticamente dos clados previamente estudados na América Central. Representantes dos três clados obtidos de *C. doniana* em Campos do Jordão foram também testados quanto à capacidade de induzir germinação em suas sementes. Todos isolados testados tiveram sucesso na germinação das sementes, levando as plântulas a estádios avançados de desenvolvimento após 30 dias, o que indica um alto potencial para utilização biotecnológica destes isolados para a germinação das sementes destas orquídeas, tanto para a floricultura comercial quanto para programas de reintrodução de espécies de orquídeas ameaçadas de extinção.

Palavras chave: Micorrizas ; Orquídeas ; Fungos rizotonióides; Diversidade; Germinação simbiótica; *Ceratobasidium*; Oncidiinae

## ABSTRACT

### **Mycorrhizal diversity in *Coppensia doniana* (Orchidaceae) and phylogeny of mycorrhizal fungi associated with the Oncidiinae subtribe**

In nature, orchids are fully dependent on mycorrhizal fungi for germination. These fungi can penetrate root cells and form pelotons, whose digestion provides simple sugars for the embryo. During the achlorophyllous seedling stage, orchids are obligatory dependent on the fungi, and some species remain so through life, while others become facultatively responsive to fungal infection. The aim of this study was to identify how many fungal clades can establish mycorrhizal associations with *Coppensia doniana*, a widespread orchid from Campos do Jordão–Brazil, and to demonstrate how their morphological features, analyzed with multivariate statistics, can be useful for classification. Ten plants were sampled in an Araucaria forest near Campos do Jordão. Fungi were isolated by transferring surface disinfected root segments containing pelotons to PDA culture medium. Three main fungal clades were formed by qualitative and quantitative morphological data. They were identified as two morphotypes of *Ceratohiza* (anamorphic stage of *Ceratobasidium*) and one uninucleated *Rhizoctonia*. The ITS sequencing corroborates this identification, since the same three clades were found. All sequences were highly correlated to *Ceratobasidium* ITS data deposited at the Genbank, suggesting a high affinity between this species of Oncidiinae and *Ceratobasidium*. It also could be shown that morphological data associated with multivariate statistics can be a useful tool in fungal multi-level taxonomy. *C. doniana* sequences were also compared to sequences obtained from isolates of other orchids, belonging to the sub-tribe Oncidiinae, including: *Ionopsis utricularioides* and *Psygmorchis pussila*, collected in Valle del Cauca – Colombia and isolated from *I. utricularioides*, *Oncidium altissimum* and *Tolumnia variegata*, studied by Otero (2002, 2004, 2007) in different regions of Puerto Rico, Costa Rica and other Caribbean islands. This last analysis confirmed the preference of this Oncidiinae sub-tribe for *Ceratobasidium*, although isolates obtained in Brazil or Colombia belong to different clades from those previously studied in Puerto Rico, Costa Rica, Panama and Cuba.

Fungi representing the three clades obtained from *C. doniana* in Campos do Jordão were also tested for their ability to induce germination of *C. doniana* seeds, with a positive response for all of them, being able to bring the seedlings to advanced development stages in 30 days. These results suggest a high biotechnological potential of these isolates, to be used in orchid symbiotic germination for commercial flower production or for the reintroduction of endangered Brazilian orchid species.

Keywords: Mycorrhiza; Orchids; *Rhizoctonia*-like fungi; Diversity; Symbiotic germination; *Ceratobasidium*; Oncidiinae

## 1 INTRODUÇÃO

Orchidaceae é uma das famílias mais numerosas dentre as famílias das plantas e, várias espécies de orquídeas são caracterizadas por terem uma distribuição geográfica limitada (TREMBLAY et al., 2004; OTERO et al., 2007). No Brasil, aproximadamente 3500 espécies são encontradas, principalmente em fragmentos da Mata Atlântica, um dos ecossistemas mais fragilizados do mundo (MORI, 1989; PEREIRA, 2006). Este ecossistema é reconhecido por sua extrema biodiversidade, com um arranjo muito variado de orquídeas terrestres, litofílicas e epifíticas em especial.

O desmatamento tem diminuído a diversidade das orquídeas brasileiras e levado à extinção de várias espécies. Além disso, muitas orquídeas têm propriedades medicinais e alto valor comercial, o que estimula a coleta predatória. Por isto, existe um esforço crescente da comunidade científica e de organizações não governamentais brasileiras em priorizar pesquisas relacionadas à conservação de orquídeas e programas de reintrodução de espécies ameaçadas de extinção.

Orquídeas possuem sementes diminutas, usualmente chamadas de *dust seeds*. Estas sementes não possuem reservas capazes de serem metabolizadas, portanto, necessitam de uma fonte de energia externa para germinar. Na natureza, utilizam os fungos micorrízicos que penetram nas células das raízes e formam pélotons, que são novelos de hifas que, quando digeridos, fornecem açúcares simples para o embrião (ARDITTI, 1992; PETERSON; UETAKE; ZELMER, 1998; RASMUSSEN 2002). Durante a primeira fase do desenvolvimento da plântula, orquídeas são obrigatoriamente dependentes dos fungos; algumas espécies se mantêm assim por toda vida, enquanto outras estabelecem a fotossíntese, mas, em graus diferentes, se mantêm dependentes da resposta à colonização micorrízica (RASMUSSEN, 2008). Juntamente com a presença de um polinizador compatível e a capacidade genética de cada espécie de se adaptar ao ambiente, a associação micorrízica com um fungo compatível é um dos fatores que controla a distribuição das espécies de orquídeas nos diferentes habitats (OTERO; FLANAGAN, 2006).

A maioria dos fungos micorrízicos pertence ao gênero-forma *Rhizoctonia*, um grupo polifilético de patógenos, endofíticos, saprófitas e fungos micorrízicos. (WARCUP

1981; RASMUSSEN 1995; CURRAH; ZETTLER; MCINNIS,1997; OTERO; ACKERMAN, BAYMAN, 2002; PEREIRA; 2001; PEREIRA, 2006, GONZÁLES-GARCIA; ONCO; SUSAN, 2006). A sistemática atual do complexo (MOORE, 1987; ANDERSEN; STALPERS, 1994; ROBERTS, 1999) divide os fungos filamentosos com fase anamórfica tipo-*Rhizoctonia* em, no mínimo, sete ou oito gêneros anamórficos, dependendo dos autores. *Ascorhizoctonia* Yang & Korf, *Ceratorhiza* R.T. Moore, *Chrysorhiza* Andersen & Stalpers, *Epulorhiza* R.T. Moore emend R.T. Moore & Andersen, *Opadorhiza* Andersen & R.T. Moore, *Moliniopsis* Ruhland, *Rhizoctonia* D.C. e *Thanatophytum* Nees.

Fungos rizoctonióides são caracterizados por terem ramificações de suas hifas em ângulos de noventa graus e constrição e septo próximos ao ponto de ramificação. Frequentemente possuem cadeias de células infladas, denominadas células monilióides (SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991).

O fato de que raramente estes fungos produzem esporos sexuais em meio de cultura foi sempre uma dificuldade para taxonomistas. Assim, a caracterização morfológica baseada em características assexuais produziu vários grupos polifiléticos. Com os recentes avanços em biologia molecular, fungos rizoctonióides têm sido descritos por métodos moleculares, como o sequenciamento e análise da região ITS. (OTERO; ACKERMAN; BAYMAN 2002, 2004; GONZALEZ, 2006).

As orquídeas variam em sua “preferência” micorrízica (OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002, 2004, OTERO et al. 2007). Uma relação de especificidade mais estreita pode ser um motivo da raridade e vulnerabilidade da espécie vegetal, assim como uma preferência alimentar limitada pode ser para uma espécie animal (RASMUSSEN, 2002). Em contraste, orquídeas largamente distribuídas são geralmente mais generalistas em suas preferências por fungos micorrízicos ou, especificamente associadas a um fungo muito bem distribuído, como acontece em várias relações mutualísticas (BASCOMPTE et al., 2003; VAZQUEZ; AIZEN, 2003, OTERO, 2007). O conhecimento de como a diversidade de fungos orquidóides varia entre as diferentes espécies de orquídeas e habitats é um fator crucial para ações de recuperação de orquídeas ameaçadas, sabendo-se que estes isolados fúngicos podem ser usados para



a germinação e o desenvolvimento simbiótico de mudas (BRUNDRETT, 2007; PEREIRA, 2001, 2006; PETERSON; UETAKE; ZELMER 1998; ZETTLER, 2003).

*Coppensia doniana* (Batem. ex. W.Baxt.) Campacci (2006) (sin. *Oncidium donianum*) é uma Oncidiinae bem distribuída na região de Campos do Jordão, estado de São Paulo, Brasil, na Mata Ombrófila Mista. Ela é geralmente encontrada em campos de altitude, variando de 1200-2100 metros de altitude, colonizando rochas ou solos degradados, geralmente sob alta exposição solar. Foi escolhida para este estudo por sua alta densidade populacional e por sua habilidade em colonizar sítios pobres em nutrientes, o que sugere uma alta dependência micorrízica. Acredita-se que, entender a ecologia dos fungos micorrízicos e desenvolver técnicas de germinação e cultivo simbiótico para *C. doniana* deve ser o primeiro passo para a implantação de um programa de reintrodução de espécies ameaçadas ou já extintas em Campos do Jordão.

Sabendo que *Coppensia doniana* é uma orquídea amplamente distribuída nos campos de altitude daquela região, foram feitas algumas perguntas: Quantos clados de fungos podem estabelecer associação micorrízica com *Coppensia doniana* em Campos do Jordão? Os dados morfológicos (qualitativos e quantitativos) dos isolados fúngicos concordam com o sequenciamento da região ITS? Quão eficientes são estes fungos em germinar e promover o desenvolvimento simbiótico das orquídeas? E, finalmente, qual a relação dos fungos isolados de *Coppensia doniana* com fungos isolados de outras orquídeas pertencentes à mesma subtribo Oncidiinae na Colômbia e, com sequências previamente depositadas no *Genbank*, também isolados de oncidíneas em outros Países da América Latina?



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histórico

O primeiro relato de fungos colonizando raízes de orquídeas foi em 1824 por Heinrich Friedrich Link (1767 – 1851). Em 1840, Link apresentou evidências gráficas que fungos colonizavam raízes de *Goodyera procera* (*Goodyera repens*), mas falhou ao tentar reconhecê-los. Em 1846, Reissek sugeriu que fungos estavam presentes nas raízes de várias orquídeas, incluindo *Neottia nidus-avis*. Os fungos também foram observados por Schleiden em 1849, mas ele também não conseguiu atribuir a eles sua real importância. Em 1853, Irmisch descreveu hifas fúngicas que colonizavam o rizoma de uma orquídea aclorofilada, *Corallorhiza innata* (Andersen e Rasmussen, 1996). Warlich (1886) descreveu o processo digestivo das hifas dos fungos e estabeleceu que a associação micorrízica era universal na família Orchidaceae. Provavelmente a segunda descoberta mais importante sobre as micorrizas de orquídeas (depois do seu primeiro relato por Link), foi quando Noel Bernard, em 1899, demonstrou o papel dos fungos na germinação das sementes das orquídeas. Dessa data em diante, vários pesquisadores começaram a isolar alguns fungos associados às orquídeas na natureza, identificando-os como *Rhizoctonia*-like, isto é, fungos rizoctonióides (ARDITTI, 1992; ANDERSEN; RASMUSSEN, 1996; SMITH; READ, 1997; PEREIRA, 2006).

Vários fungos isolados de orquídeas foram situados inicialmente no gênero *Rhizoctonia*. Os três primeiros, isolados por Bernard, foram nomeados *R. repens*, *R. mucoroides* e *R. lanuginosa* (ARTIDDI, 1992). Outros anamorfos micorrízicos em orquídeas foram em seguida descritos, bem como teleomorfos de *Rhizoctonia* associados às orquídeas australianas e norte-americanas (WARCUP; TALBOT, 1980; CURRAH; SIGLER; HAMBLETON, 1987, CURRAH; ZELMER, 1995).

### 2.2 A Família Orchidaceae

A família Orchidaceae é uma das maiores entre as angiospermas. Trabalhos mais recentes estimam que este grupo possua mais de 25.000 espécies (DEARNALEY,

2007). Distribuídos por todo mundo, os membros desta família são plantas perenes e ocupam uma variedade de habitats na natureza. Epífitas, terrestres ou rupícolas, possuem raízes com micorrizas, tuberosas ou não, em geral com presença de velame. Caule muitas vezes rizomatoso, e internós freqüentemente formando pseudobulbos. Folhas simples, inteiras, com nervação usualmente paralelinérvea. Inflorescências racemosas ou paniculadas, algumas vezes reduzidas a uma única flor, terminais ou laterais. Flores usualmente monoclinas, zigomorfas. Três sépalas livres ou conatas e três pétalas livres, a mediana diferenciada em labelo, as laterais semelhantes às sépalas. Néctar em geral ausente e quando presente produzido em cálcar ou em nectários septais. Frutos na forma de cápsula, abrindo por fendas longitudinais; sementes minúsculas, com tegumento membranáceo, embrião muito reduzido e endosperma ausente (DAHLGREN; CLIFFORD; YEO, 1985; DRESSLER, 1993). Característica única da família Orchidaceae é a formação do protocórmio, estrutura originada a partir da diferenciação das células do embrião que originará a plântula (PETERSON; UETAKE; ZELMER, 1998). A fase de protocórmio é heterotrófica, mesmo em orquídeas que são autotróficas na fase adulta (ARDITTI, 1992; SMITH; READ, 1997; PETERSON; UETAKE; ZELMER, 1998, RASMUSSEN, 2002, 2008).

### **2.3 Dependência micorrízica**

Apesar da grande diversidade morfológica e das características reprodutivas das orquídeas, um atributo comum a todas as espécies é a produção de sementes excessivamente pequenas, semelhantes a pó, usualmente chamadas *dust-seeds* (PETERSON; UETAKE; ZELMER, 1998). Estas possuem massa de 3 a 4 µg, comprimento de 0,4 a 1,25 mm e largura de 0,08 a 0,27 mm. O número de sementes produzidas por algumas espécies é por volta de 1.300 por cápsula, enquanto outras podem produzir até 4 milhões. Essas sementes diminutas possuem embrião minúsculo, suspenso dentro de uma testa reticulada, cercado por grande volume de ar (ARDITTI, 1992; PETERSON; UETAKE; ZELMER, 1998).

O embrião é simples e indiferenciado, não contém os meristemas apicais da raiz e da parte aérea. Os embriões pequenos, envoltos em uma grande quantidade de ar,

conferem a capacidade de flutuar no ar ou na água por muito tempo e serem dispersos a longas distâncias (PETERSON; UETAKE; ZELMER, 1998). As sementes podem apresentar lipídeos, proteínas ou glicoproteínas, inclusões globóides de fitina e, raras vezes, grãos de amido (ARDITTI, 1992; PETERSON; UETAKE; ZELMER, 1998). Em sementes imaturas o amido é a principal fonte de carbono. No entanto, com a maturação, esse amido é substituído por proteínas, lipídeos e fontes de reserva complexas, como a celulose e a hemicelulose (HARVAIS, 1974 apud. PEREIRA, 2001). O acréscimo de compostos protéicos implica em dormência da semente de algumas das espécies do gênero *Disperis*, *Disa* e *Huttonaea* (MANNING; VAN STADEN, 1987 apud. PEREIRA, 2001).

Segundo Hadlley (1982), a dormência em sementes de orquídeas é uma característica evolutivamente importante, uma vez que a quantidade de reserva é mínima, ou seja, suficiente apenas para manter o nível basal de respiração até o seu contato com o micossimbionte. Dessa forma, por não possuir reserva energética suficiente para remobilização dos lipídios, a semente não germina sem que haja uma fonte externa de açúcar, como a glicose ou sacarose. Na natureza a planta obtém essa fonte externa de açúcar graças à associação simbiótica que viabiliza energeticamente a germinação, levando a uma dependência do hospedeiro em relação ao fungo micorrízico (PEREIRA, 2001).

## **2.4 Infecção e colonização**

Durante a infecção, uma hifa de um fungo compatível entra em contato com a semente e atravessa a testa pela micrópila ou por falhas no tegumento (PETERSON; UETAKE; ZELMER, 1998; PETERSON; MASSICOTE; MELVILLE, 2004). Uma vez dentro da semente, a hifa é atraída pelo suspensor do embrião (ARDITTI, 1992; PETERSON; UETAKE; ZELMER, 1998; PETERSON; MASSICOTE; MELVILLE, 2004). A primeira infecção também pode ocorrer nos rizóides ou nas células da protoderme, sendo que os rizóides são extensões de uma célula protodérmica, geralmente formados na parte basal do protocórmio, após o entumescimento das células embrionárias e rompimento da testa da semente. A infecção inicial pode ser um importante passo no

reconhecimento entre o hospedeiro e o fungo (RASMUSSEN, 1995; PETERSON; UETAKE; ZELMER, 1998). Dentro do embrião, o fungo micorrízico forma novelos de hifas chamados pélotons. Quando bem desenvolvidos, os pélotons podem ocupar quase todo o volume celular, o que confere extensa superfície de contato entre os simbiossomas (PETERSON; MASSICOTE; MELVILLE, 2004). A maioria das células, exceto aquelas de onde surge o meristema apical, são colonizadas.

O péloton é separado da célula hospedeira por uma membrana perifúngica, uma modificação da membrana plasmática vegetal. A entrada da hifa no embrião ativa vários ciclos de replicação de DNA, o que pode ser constatado pelo aumento no volume nuclear e pelas alterações do citoesqueleto destas células. A hifa fúngica passa de célula para célula, provavelmente pela produção de enzimas hidrolíticas que atuam rompendo áreas localizadas da parede celular do hospedeiro. O embrião cresce a partir de divisões celulares e ganha volume, formando o protocórmio. Enquanto isto acontece, os pélotons formados primeiro são degradados, resultando em amontoados de hifas lisadas. Estas hifas são recobertas por material similar ao da parede celular vegetal que as isolam do citoplasma do hospedeiro, garantindo que não haja um colapso no citoplasma das células da raiz enquanto ocorre a degradação (PETERSON, 1996 apud. PETERSON; MASSICOTE; MELVILLE, 2004). Trealose, um açúcar oriundo do metabolismo do fungo, é translocado para os protocórmios e metabolizado a outros carboidratos, incluindo sacarose. O estímulo ao crescimento do protocórmio durante a infecção ocorre, a princípio, pelos açúcares translocados via fungo (SMITH; READ, 1997; PETERSON; MASSICOTE; MELVILLE, 2004).

Em orquídeas terrestres e, principalmente nas litofílicas, quase toda a área do córtex é colonizada, enquanto nas plantas epífitas, a colonização é menor, ocorrendo nas regiões periféricas em contato com o substrato (ARDITTI, 1992; PEREIRA, 2006).

Na maioria das orquídeas, os ciclos de formação/degradação dos pélotons são observados em todas as etapas de desenvolvimento da planta. A infecção e a lise ocorrem repetidamente em uma mesma célula e tecidos, sugerindo que possa haver uma alternância rítmica ou sazonal entre os períodos de crescimento intracelular da hifa e estágio de digestão do péloton. A obtenção dos sais minerais, dos carboidratos e de outros compostos orgânicos necessários ao desenvolvimento da orquídea se deve à

hidrólise do glicogênio, lipídeos e proteínas do fungo, contidas no novelo de hifas. (ARDITTI, 1992; RASMUSSEN, 1995; PEREIRA, 2006).

A membrana perifúngica tem propriedades que diferem da membrana plasmática; um exemplo é a diferença na atividade da enzima adenilato ciclase, enzima responsável pela conversão de ATP a AMPc, uma importante molécula na transdução de sinal em eucariotos (UETAKE; ISHIZAKA 1996 apud. PETERSON; MASSICOTE; MELVILLE, 2004). Adicionalmente, uma matriz interfacial separa a membrana perifúngica da parede celular das hifas, promovendo assim um compartimento apoplástico entre os simbioses (PETERSON; UETAKE; ZELMER, 1998). Quando o fungo forma os pélotons, o arranjo de microtúbulos e os filamentos de actina desaparecem e novos citoesqueletos começam a ser confeccionados, arranjados em torno dos pélotons. Adicionalmente, perfis do retículo endoplasmático e de mitocôndrias se agregam ao novelo de hifas. Neste momento, os pélotons geralmente são degradados e ocorre a deposição de celulose e pectina, isolando o material em degradação do citoplasma vegetal. Eventos de recolonização destas células são comuns. Apesar de existirem mudanças bem claras na anatomia das células das raízes das orquídeas, os sinais moleculares envolvidos nestas mudanças ainda não foram investigados (PETERSON; MASSICOTE; MELVILLE, 2004).

As fosfatases parecem ter um papel importante na digestão das hifas fúngicas, mas outras enzimas devem estar envolvidas. Juntamente, as enzimas vegetais provavelmente previnem o fungo de se espalhar por células indesejadas. Outros compostos relacionados ao controle da infecção no sistema radicular são as fitoalexinas. A descoberta destes compostos nas orquídeas partiu da observação de Bernard, que uma substância produzida pela planta era tóxica para endófitos. A primeira fitoalexina descrita, o orchinol, encontrado em *Orchis militaris*, foi isolado por Ernst Gäumann entre 1956 e 1961 (ARDITTI, 1992). Recentemente, dois compostos antifúngicos foram isolados de plântulas de *Cypripedium macranthos* por Shimura (2007) e seus colaboradores. O alto incremento nos níveis de lusiatriina (fitoalexina que em sua estrutura lembra o orchinol) nos protocórmios depois da infecção sugerem que este composto esteja envolvido na regulação da simbiose durante a germinação. O

outro composto isolado, chamado crisina, não foi detectado em protocórmios mas sim em plantas adultas. Os autores concluem que a lusiatrina mantém o caráter simbiótico da associação durante a germinação e a crisina deve ajudar nesta manutenção enquanto as orquídeas estão adultas.

## **2.5 Diversidade e especificidade na interação**

A maioria das espécies de orquídeas possui especificidade a determinados grupos, espécies ou isolados de fungos micorrízicos. A especificidade na associação entre orquídeas e fungos micorrízicos pode ser definida como a amplitude filogenética de fungos com que uma espécie em particular de orquídea seria capaz de associar-se. Condições abióticas, tais como composição do substrato, temperatura, altitude e região geográfica, além das variações genéticas entre diferentes populações, afetam a especificidade entre a orquídea e o fungo micorrízico (RASMUSSEN, 1995; PEREIRA; 2006).

A infecção inicial pode ser evento chave para o reconhecimento entre os simbiossios, definindo a compatibilidade da associação. Quando há incompatibilidade, a planta induz a formação de compostos fenólicos nas células infectadas pela hifa fúngica (RASMUSSEN, 1995; ARDITTI, 1992). Alguns fungos, por mais que colonizem as células do embrião, não são capazes de sustentar o desenvolvimento da orquídea até a formação da primeira folha com produção de clorofila, marcando o início da autotrofia na planta (PEREIRA, 2006). Para que a orquídea colonize determinada região, é necessária a presença, no substrato, de fungo compatível com a orquídea e eficiente em permitir o seu desenvolvimento. Dessa forma, a especificidade pode definir as regiões geográficas de crescimento de uma espécie de orquídea, devido à presença ou ausência do fungo compatível (TAYLOR; BRUNS, 1999; MCKENDRICK ET AL., 2002).

A especificidade tem sido estudada pelo isolamento e posterior identificação dos fungos associados à orquídea ou pela indução da germinação de sementes *in vitro* ou *ex vitro* (OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004). O tipo de estudo desenvolvido pode levar à obtenção de diferentes resultados e, conseqüentemente, a diferentes compreensões da especificidade de determinada espécie (TAYLOR; BRUNS, 1999).



## 2.6 Os fungos rizoctonióides

A maioria dos fungos micorrízicos de orquídeas pertencem ao gênero-forma *Rhizoctonia*, um grupo polifilético de patógenos, endofíticos, saprófitas e fungos micorrízicos. (WARCUP 1981; RASMUSSEN 1995, 2002; CURRAH; ZETTLER; MCINNIS, . 1997; OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002; 2004; OTERO et al 2007; SELOSSE; RICHARD; SIMARD, 2006). Os membros deste grupo são considerados um complexo de fungos filamentosos, apresentando em comum uma fase assexuada não promotora de esporos, denominada anamorfo tipo-*Rhizoctonia* (do inglês *Rhizoctonia-like*). Este grupo inclui alguns importantes patógenos como *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (anamorfo= *Rhizoctonia solani* Kühn), a maioria das espécies micorrízicas de orquídeas (principalmente do gênero *Ceratobasidium* D.P. Rogers), e alguns táxons de posição taxonômica variada. O anamorfo tipo-*Rhizoctonia* é definido por uma série de características presentes e comuns em todos os táxons do complexo, como a ramificação das hifas em ângulos de 90 graus, presença de um septo logo após o ponto de ramificação e uma constricção primária junto ao ponto de ramificação (SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991). Geralmente possuem cadeias de células infladas denominadas células monilióides (OTERO; ACKERMAN, BAYMAN; 2004; 2007; PEREIRA, 2001; PEREIRA, 2006; SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991). Os táxons rizoctonióides entre vários gêneros de fungos dentro dos Basidiomycetos empregando critérios de classificação tais como a análise e comparação da ultra-estrutura do aparato septal (GONZÁLEZ-GARCIA; ONCO; SUSAN, 2006).

O gênero *Rhizoctonia* foi descrito em 1815 por De Candolle, sendo a espécie tipo, *R. crocorum*. Os fungos podem ser classificados com base em dois conjuntos de características: (i) os nomes anamórficos, baseados nas características vegetativas, tais como, morfologia da hifa e de estruturas assexuais como as células monilióides e escleródios; (ii) os nomes teleomórficos, baseados nas características das estruturas reprodutivas sexuais, ou seja, características macroscópicas e microscópicas dos esporocarpos. Estruturas sexuais geralmente fornecem caracteres mais informativos para a taxonomia e sistemática do que estruturas vegetativas, entretanto, os fungos micorrízicos de orquídeas, além de não apresentarem conidiogênese em sua fase

assexual, dificilmente se apresentam em estágio sexuado quando cultivados em meio de cultura, conseqüentemente, são relacionados a seus anamorfos (ZELMER; CURRAH, 1995; ANDERSEN; RASMUSSEN, 1996).

Em estudo sobre a morfologia de hifas de *Rhizoctonia* foram demonstrados os problemas relativos ao uso de características morfológicas tradicionais para a delimitação de espécies dentro desse gênero. A taxonomia proposta por Moore (1987), juntamente com a chave dicotômica proposta por Currah e Zelmer (1992), foram acatadas como as melhores para o estabelecimento de características confiáveis da fase anamórfica. Em seu trabalho, Moore correlacionou os gêneros anamórficos dos fungos rizoctonióides, com seus respectivos teleomorfos, o que foi aceito por muitos anos. Os membros anamorfo/teleomorfo do grupo *Rhizoctonia*-like observados em associação com as orquídeas foram: *Opadorhiza/Sebacina*, *Epulorhiza/Tulasnella*, *Ceratorhiza/Ceratobasidium* e *Rhizoctonia/Thanatephorus*. Entretanto, González-García, Onco e Susan (2006) discutem a sistemática atual e ressaltam a existência de, no mínimo, sete gêneros anamórficos, dependendo do autor consultado, sendo estes: *Ascorhizoctonia* Yang & Korf, *Ceratorhiza* R.T. Moore; *Chrysorhiza* Andersen & Stalpers; *Epulorhiza* R.T. Moore emend R.T. Moore & Andersen; *Opadorhiza* Andersen & R.T. Moore; *Moliniopsis* Ruhland; *Rhizoctonia* D.C. e *Thanatophytum* Nees. MOORE, 1987; ANDERSEN; STALPERS, 1994; ROBERTS, 1999, apud. GONZÁLES-GARCIA; ONCO; SUSAN, (2006), dividem os fungos filamentosos com fase anamórfica tipo-*Rhizoctonia* em, no mínimo, sete ou oito gêneros anamórficos, dependendo dos autores.

Quanto às espécies, hoje permanecem somente 7 para as quais a classificação foi considerada correta. Algumas espécies de fungos rizoctonióides encontram-se listadas na Tabela 1, adaptada de González-García, Onco e Susan (2006).

A caracterização e identificação de *Rhizoctonia* spp. são também realizadas pelo método que envolve a análise de anastomose de hifas com isolados padrões, conhecidos como grupos de anastomose ou AGs. Segundo esse método, o isolado em estudo é colocado para crescer junto a isolados padrões, sendo a reação de anastomose observada na zona de confluência das colônias e categorizada pela análise e interpretação do tipo de reação citológica. O pareamento de isolados pode ser

feito por diversas técnicas, sendo, as mais comuns, os pareamentos em placa de Petri com ágar-água, papel celofane sobre ágar e crescimento em lâmina (CARLING, 1996 apud. ; GONZÁLES-GARCIA; ONCO; SUSAN, 2006).

Os fungos micorrízicos de orquídeas apresentam diferentes papéis na natureza. Alguns são conhecidos por serem patógenos importantes na agricultura (SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991), outros usualmente formam ectomicorrizas (SELOSSE et al. 2002, 2006) ou sobrevivem no solo a partir da degradação de compostos orgânicos (SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991). Warcup (1988) observou a germinação de sementes de orquídeas terrestres em associação com o fungo ectomicorrízico *Sebacina vermifera*, que atuava como ponte de transferência de nutrientes entre a planta ectomicorrizada e a orquídea.

Tabela 1 - Sinopse taxonômica do gênero-forma *Rhizoctonia*, com separação dos gêneros anamorfos e teleomorfos reconhecidos atualmente

Anamorfo	Espécies tipo	Basônimo	Teleomorfo	Espécies tipo
<i>Ascorhizoctonia</i> Yang & Korf	<i>A. praecox</i> Yang & Korf	<i>A. praecox</i> Yang & Korf,	<i>Tricharina</i> Eckblad	<i>T. gilva</i> Eckblad
<i>Ceratorhiza</i> R.T. Moore	<i>C. goodyerae-repentis</i> (Constantin) R.T. Moore	<i>Rhizoctonia goodyerae-repentis</i> Constantin.	<i>Ceratobasidium</i> D.P. Rogers	<i>C. calosporum</i> D.P. Rogers
<i>Chrysorhiza</i> Andersen & Stalpers	<i>C. zaeae</i> (Voorhees) Andersen & Stalpers	<i>R. zaeae</i> Voorhees.	<i>Waitea</i> Warcup & Talbot	<i>W. circinata</i> Warcup & Talbot
<i>Epulorhiza</i> R.T. Moore emend Andersen & R.T. Moore	<i>E. repens</i> (Bernard) R.T. Moore	<i>R. repens</i> Bernard.	<i>Tulasnella</i> <i>Shoröeter</i>	<i>T. violeta</i> (Quél) Bourd & Galzin
<i>Opadorhiza</i> Andersen & R.T. Moore	<i>O. globularis</i> (Saksena & Vartaja) Andersen & R.T Moore	<i>R. globularis</i> Saksena & Vartaja.	<i>Sebacina</i>	<i>S. vermifera</i> Oberwinkler
<i>Moniliopsis</i> Ruhland. (Sin. = <i>Rhizoctonia</i> D.C.)	<i>M. aderholdii</i> Ruhland.	<i>R. solani</i> J.G. Kühn.	<i>Thanatephorus</i> Donk	<i>T. cucumeris</i> (Frank) Donk.
<i>Tanatophytum</i> Nees.	<i>T. croccorum</i> (Pers.:Fr.) R.T. Moore.	<i>Sclerotium croccorum</i> Pers.	<i>Helicobasidium</i> Pat.	<i>H. purpureum</i> Pat.

O carbono fornecido a orquídeas associadas com fungos do gênero *Epulorhiza* é produto da degradação da matéria orgânica morta depositada no solo (RASMUSSEN, 2002; PETERSON; MASSICOTE; MELVILLE, 2004; PEREIRA, 2006). Um papel adicional do fungo é o de prover níveis adequados de água para que a germinação ocorra, bem como de auxiliar na obtenção de água durante o desenvolvimento do protocórmio, garantindo maior resistência à dessecação (YODER et al., 2000, PEREIRA, 2006). A disponibilidade de nitrogênio e fósforo tem papel crítico no crescimento e desenvolvimento das orquídeas. Assim, nas primeiras fases do desenvolvimento, o crescimento da planta é completamente dependente do fungo micorrízico para absorção destes materiais (DIJK; WILLWMS; VAN ANDEL, 1997; PEREIRA, 2006). Devido ao fato de as raízes das orquídeas serem pouco ramificadas e pouco numerosas, têm-se que as orquídeas dependem do fungo micorrízico, também na captação de nutrientes minerais, uma vez que os fungos ampliam a área de absorção da raiz (PETERSON; MASSICOTE; MELVILLE 2004; PEREIRA, 2006).

As características culturais do micélio e as hifas ou células monilióides que permanecem estáveis em meios de cultura específicos (BDA e CMA) podem ser consideradas para a validação de novas espécies nesse grupo. Além disso, a distinção entre os gêneros *Epulorhiza* e *Ceratorhiza* pode ser realizada através da utilização de um simples teste enzimático, uma vez que a grande maioria das espécies do gênero *Ceratorhiza* produz polifenol-oxidases em meios de cultivo acrescidos de ácido tânico ou gálico, enquanto espécies de *Epulorhiza* mostram-se negativas para essa enzima (CURRAH; ZELMER, 1995; PEREIRA, 2001).

Apesar de novos métodos e técnicas serem desenvolvidas para a sistemática de fungos, a classificação de espécies de *Rhizoctonia* ainda é considerada em desenvolvimento. Em termos gerais, abordagens sistemáticas para este grupo de fungos têm sido baseadas nas características vegetativas, condição nuclear e, quando possível, classificação em grupos de anastomose. Quando estádios teleomórficos estão disponíveis, estudos comparativos da morfologia do basídio e basidiósporos têm sido rotineiramente empregados e, com as novas ferramentas de biologia molecular, vários destes problemas têm sido sanados. Como consequência, teleomorfos não foram designados para alguns anamorfos e alguns estádios sexuais não tem um epíteto

específico, especialmente dentro do gênero *Ceratobasidium* (GONZÁLES-GARCIA; ONCO; SUSAN, 2006).

Dentro deste contexto, a utilização de análises estatísticas multivariadas de características morfométricas das culturas pode contribuir significativamente para a taxonomia polifásica de espécies de *Rhizoctonia*, simplificando a compreensão dos dados obtidos e realizando agrupamentos consistentes de isolados anamorfos de *Rhizoctonia*.

## **2.7 Taxonomia de fungos rizoctonióides: uso da região ITS.**

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular agregou ferramentas modernas que suportam a classificação de organismos, de acordo com a genética e processo evolutivo de cada um (SHARON, 2008). Dados têm sido continuamente acumulados na literatura e sequências nos bancos de dados, estando prontamente disponíveis para pesquisadores em todo mundo. O estudo de seqüências de regiões ribossomais conservadas (18S e 28S) ou hipervariáveis, como a região intergênica ITS ou do DNA mitocondrial do fungo (*mtLSU*), comparadas por técnicas moleculares como PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) ou sequenciamento têm contribuído significativamente para a taxonomia de *Rhizoctonia* spp. (PEREIRA, 2001).

Atualmente, a análise da seqüência do rDNA da região ITS parece ser o método mais adequado para a classificação de *Rhizoctonia* spp. Sharon (2006, 2008) estudou seqüências de *Rhizoctonia* spp. multinucleadas em geral (MNR), seguidas de análises detalhadas de *Rhizoctonia* binucleadas (BNR), teleomorfos: *Ceratobasidium* spp. e *Tulasnella* spp.; como também de *Rhizoctonia*-uninucleada (UNR), teleomorfo: *Ceratobasidium bicornis*. Dados adequados de todas as BNR e UNR acumulados no GenBank foram analisados em conjuntos de árvores pelo método “neighbour joining” com similaridade seqüencial de porcentagem dentro e entre os grupos de anastomoses (AGs) e subgrupos. Sharon demonstrou que os grupos de seqüências

quase sempre dão fundamentação filogenética para a classificação tradicional de *Rhizoctonia* com base na anastomose de hifas.

## **2.8 Metabolismo 1: estratégias para obtenção de carbono**

Metabolicamente uma planta pode se associar ao fungo com uma diversidade de possibilidades de associações. Existem três formas de associação entre um fungo e a planta micorrizada. O metabolismo fotossintético é aquele em que a planta é auto-suficiente, não necessitando de adquirir carbono do fungo, somente água e sais minerais. O fungo também oferece à planta proteção contra fatores bióticos e abióticos do solo. Já no metabolismo mixotrófico a planta não é capaz sozinha de suprir toda a sua necessidade de carbono, necessitando do fungo para complementar essa necessidade. Neste caso, a planta pode estar em condições ambientais em que a fotossíntese está em seu ponto de compensação luminoso ou mesmo abaixo. No metabolismo mico-heterotrófico a planta possui como fonte de carbono somente o que é oferecido pelo fungo, como acontece com as orquídeas aclorofiladas. Podem ocorrer variações dessa interação, dependendo das condições ecológicas e ambientais em que a relação vai se estabelecer (SELOSSE; RICHARD; SIMARD, 2006).

Inicialmente todas as orquídeas são micoheterotróficas, por causa das características de suas sementes, podendo assumir em sua maturidade os três tipos de metabolismos citados.

## **2.9 Metabolismo 2: transferência de nutrientes entre os simbioses**

De acordo com Smith e Read (1997), não haveria nenhuma evidência de que, em qualquer fase de desenvolvimento da planta, haja ocorrência de um fluxo de carbono da planta para o fungo nas associações micorrízicas de orquídeas. Com relação ao suprimento de nitrogênio, não existiam evidências diretas sobre o padrão de absorção e transferência em associações micorrízicas. Entretanto, Cameron *et al.*, (2006) demonstraram pela primeira vez a passagem de carbono e de nitrogênio de plantas adultas de *Goodyera repens* para o fungo associado. Nesse trabalho também foi

demonstrado que o fungo micorrízico continua a suprir com carbono as plantas adultas fotossintéticas. Estes resultados, diferentes dos estudos anteriores, podem ser atribuídos à maior atividade fisiológica tanto da planta quanto do fungo simbionte. O ambiente de cultivo estabelecido durante o experimento reproduziu melhor as condições naturais, otimizando a interação entre o fungo e a planta (Cameron *et al.*, 2006). A transferência de C e N do fungo para a orquídea foi medida usando espectrofotometria de massa depois de se adicionar [ $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ ] glicina ao meio de cultura em que o micélio fúngico associado à planta estava sendo cultivado. A transferência de C da orquídea para o fungo foi revelada e quantificada por imagem de radioisótopos e cintilação líquida.

### **2.10 Utilização da associação: biotecnologias para produção de orquídeas**

Existem duas estratégias principais para a germinação de sementes de orquídeas *in vitro*: assimbiótica e simbiótica. A germinação assimbiótica é utilizada em larga escala na floricultura para produção comercial de plantas híbridas. Quando as sementes são propagadas em um substrato úmido os embriões indiferenciados absorvem água, incham ligeiramente e podem romper a testa. Para completar o seu desenvolvimento, o embrião deve receber do meio a fonte exógena de carbono reduzido, usualmente na forma de dissacarídeos, e várias espécies necessitam ainda de vitaminas e outros fatores de crescimento. Nas sementes a embebição ativa uma série de processos fisiológicos, porém, normalmente não se detecta nenhum estágio de germinação nos primeiros 15 dias, pois as reservas de lipídios não sofrem transformação em menos de dois meses em cultura (SMITH; READ, 1997). Isto faz com que este processo assimbiótico venha a consumir um maior período de tempo para atingir um estágio avançado de desenvolvimento. Na germinação simbiótica, sementes previamente desinfetadas são embebidas em meio de cultura contendo polissacarídeos complexos como fonte de carbono. Vários substratos incluindo amido, celulose ou grãos de aveia pulverizados, entre outros, têm sido usados. O inóculo de estirpes de fungos compatíveis são também adicionados. As hifas do fungo crescem e hidrolisam os polissacarídeos. Após a infecção das sementes, e durante o seu desenvolvimento, o



fungo disponibiliza açúcares solúveis, além de vitaminas, aminoácidos e fatores de crescimento para estas. A colonização pelo fungo é requerida também para estimular o desenvolvimento de glioxissomos para degradação das reservas endógenas de lipídeos, e a gliconeogênese, provendo o suporte nutricional antes do início da fotossíntese (SMITH; READ, 1997).

Tanto a germinação simbiótica quanto a assimbiótica podem ser conduzidas inicialmente em placas de Petri, no escuro, por um período variável de tempo, usualmente em ambiente controlado de câmara de crescimento. Porém, quando os protocórmios se desenvolvem, estes devem ser expostos a luz e transferidos para um recipiente adequado, que permita o seu crescimento. Desta forma, é necessário otimizar o fotoperíodo, a intensidade ideal de luz, a temperatura ótima e também a ventilação para permitir trocas gasosas. Finalmente, quando as orquídeas atingem o estado de plântulas, estas são transferidas para tubetes contendo substrato pasteurizado e são acondicionadas em casa de vegetação para rustificação (Batty, 2006). Depois de passar por este processo estas podem ser utilizadas em programas de reintrodução em habitat natural ou na floricultura comercial.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta

##### 3.1.1 *Coppensia doniana* em Campos do Jordão-SP

A coleta foi realizada nos dias 9 e 10 de agosto de 2008 em uma estrada vicinal que circunda o Parque Estadual de Campos do Jordão, com destino a São José do Pinhal (22° 42'S, 45° 28'O) e altitude média de 1830m. Foram coletadas amostras de 10 plantas distribuídas ao longo de um talude, à beira da estrada (Figura 3). Amostras de raízes saudáveis foram cortadas, armazenadas em sacos de papel e transportadas até o Laboratório de Microbiologia do Solo (ESALQ-USP) em isopor com gelo. As amostras foram armazenadas em câmara fria (4°C) por 24 horas. Também foram coletadas cápsulas (frutos) maduras contendo sementes viáveis para os testes de germinação simbiótica. Adicionalmente, 8 plantas tiveram partes vegetativas coletadas para cultivo e identificação baseada em características da floração. Os locais de coleta foram georreferenciadas com GPS (Figura 1).



Figura 1 - Pontos de amostragem de *Coppensia doniana* (sin. *Oncidium donianum*) em Campos do Jordão – SP, Brasil. Imagem obtida do software Google Earth versão 4.2.0205.5730

### 3.1.2 Orquídeas da subtribo Oncidiinae, Valle del Cauca – Colômbia

Foram realizadas duas amostragens de orquídeas pertencentes à subtribo encontradas na região do Valle del Cauca, Colômbia. As coletas ocorreram nos dias 20 de junho na cidade de Buenaventura ( $3^{\circ} 25' 00''\text{N}$ ,  $77^{\circ} 03' 11''\text{O}$ ), na costa do oceano Pacífico colombiano e, em um sítio próximo ao corregimento de Felídea ( $3^{\circ} 40' 55''\text{N}$ ,  $76^{\circ} 40' 52''\text{O}$ ), região metropolitana de Cali, capital do departamento Valle del Cauca. Em Buenaventura foram coletadas cinco amostras para as duas oncidíneas *Ionopsis utricularioides* e *Psygmorchis pusilla*. Em Felídea foi coletada uma amostra de *Oncidium abortivum*.

As amostras foram trazidas para o laboratório de Microbiologia do Solo da Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira e processadas num período máximo de uma semana. Os dois pontos de coleta em território Colombiano e os locais de onde foram coletadas as demais oncidíneas (OTERO 2002, 2004, 2007), usadas para as comparações filogenéticas de seus isolados, estão indicados na Figura 2.



Figura 2 - Pontos de coleta de orquídeas pertencentes à subtribo Oncidiinae. JTO = coletadas por Otero et al. (2002, 2004, 2007), RBSV = coletadas no presente trabalho

## **3.2 Isolamento**

### **3.2.1 *Coppensia doniana*, Campos do Jordão-SP**

As raízes amostradas foram cuidadosamente lavadas em água corrente e cortadas em segmentos de aproximadamente 8cm. Os segmentos foram desinfestados superficialmente pela imersão consecutiva em etanol a 70 % por 1 minuto, solução de hipoclorito comercial a 20 % (0.5% de cloro ativo) por 4 minutos e lavados cinco vezes em água destilada e esterilizada.

Os segmentos foram seccionados transversalmente sob lupa estereoscópica, para observação da colonização pelo fungo micorrízico. Secções transversais dos segmentos contendo pélotons tiveram o velame descartado com auxílio de duas agulhas estéreis. Os fragmentos de córtex colonizados foram lavados novamente em água estéril e depois transferidos para placas de Petri contendo 15 mL de duas variações do meio BDA (15 g de ágar, 15 de glicose e 1 L de caldo de batata, pH 5,6) com rosa bengala ou estreptomina: 1. Com o objetivo de inibir o rápido crescimento de bactérias e limitar o desenvolvimento de fungos esporulantes, um dos meios foi acrescido do corante Rosa Bengala (500µL/L) antes da autoclavagem (20 minutos com pressão controlada entre 1 e 1,5atm); 2. A outro meio BDA foi adicionado aproximadamente 1mg/L de estreptomina em pó, após autoclavagem, enquanto o meio estava ainda quente. Isto facilita a solubilização do bactericida e pode ser considerado uma maneira pratica de preparar um meio seletivo para fungos.

As placas foram monitoradas diariamente e, as colônias fúngicas transferidas para uma nova placa contendo o mesmo meio. Destas placas foram selecionados e cultivados os fungos com características semelhantes aos agrupados no gênero forma *Rhizoctonia*.

### **3.2.2 Orquídeas da subtribo Oncidiinae, Colômbia**

Para as amostras coletadas na Colômbia, o isolamento foi realizado seguindo a metodologia proposta por Otero em 2002, utilizando fragmentos de aproximadamente 3

cm, lavados e desinfestados superficialmente com etanol a 70% por 1 minuto e solução de hipoclorito comercial a 20% (0,5% de cloro ativo), seguido de três lavagens sucessivas em água destilada. Os fragmentos foram plaqueados em meio BDA com 1mg/L de estreptomicina em pó e observados sob microscopia de luz sob um aumento de 400x. As culturas fúngicas com características de rizoctonióides foram cultivadas em placas com meio BDA e em meio líquido BD (caldo de 250g de batata cozida e 15g de glicose por litro, pH=5,6) para a extração de DNA.

### **3.3 Cultivo e manutenção dos fungos rizoctonióides**

Os isolados identificados selecionados foram mantidos em meio BDA+estreptomicina em estufa de cultivo em temperatura ambiente durante todo o trabalho de pesquisa. A cada 15 ou 20 dias, fragmentos da borda da colônia eram repicados para placas novas contendo o mesmo meio. Cópias de segurança foram mantidas em tubos com meio BDA e em placas de Petri contendo meio BDA mantidas em câmara fria (4°C). Posteriormente, os isolados também foram armazenados seguindo o método de Castellani (APARECIDO et al., 2007).

### **3.4 Caracterização morfológica**

A caracterização morfológica foi realizada para os isolados obtidos de *Coppensia doniana*, utilizando parâmetros quantitativos e qualitativos adotados por PEREIRA (2006).

#### **3.4.1 Características quantitativas**

##### **3.4.1.1 Taxas de crescimento**

As taxas de crescimento em meios BDA e CMA (15 g ágar e 1 L de caldo obtido do cozimento de 30g de farelo de milho, pH=5,6) em placas de Petri foram determinadas. Discos de ágar de 9mm de diâmetro, contendo micélio fúngico da borda

da colônia crescida em meio BDA, foram transferidos para o centro de três placas de Petri contendo 15 mL do meio de cultura e incubadas a 28 °C. A taxa de crescimento em  $\text{mm h}^{-1}$  foi determinada com base nas variações diárias dos raios das colônias, em, pelo menos, três intervalos de tempo, até a colônia atingir o tamanho da placa. Para isso, foram usadas duas linhas perpendiculares traçadas no verso da placa, utilizando o disco de ágar como o centro da intersecção das linhas.

### **3.4.1.2 Células monilióides**

Para a caracterização das células monilióides, os isolados foram cultivados em meio CMA em placas de Petri. Para facilitar a observação sob microscópio invertido foram feitos sulcos no meio de cultura que serviam como janelas de observação do micélio fúngico. O material foi fotografado juntamente com uma escala micrométrica. As imagens capturadas foram utilizadas para determinar a largura e o comprimento das células monilióides no software Image Tool 2.0.

### **3.4.1.3 Diâmetro da hifa vegetativa e condição nuclear**

Discos de ágar de nove mm de diâmetro, contendo os micélios fúngicos de cada isolado, foram transferidos para lâminas microscópicas contendo uma faixa central com 50  $\mu\text{L}$  de meio BDA. Após o crescimento do micélio, as lâminas foram tratadas com 20  $\mu\text{L}$  de SYBR GREEN I® diluído 1000 vezes em  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 10mmol.  $\text{L}^{-1}$ , contendo 18 % de glicerol e 1  $\mu\text{g/mL}$  de calcofluor (CAMPOS, 2004, citado por PEREIRA, 2006). As lâminas foram observadas em microscópio óptico com acessório para epifluorescência.

A condição nuclear (células uni, bi, ou multinucleadas) foi observada sob fluorescência e o diâmetro de hifa sob a luz branca. Uma câmera digital Leica acoplada ao microscópio foi utilizada para capturar as imagens, que foram processadas em um editor de imagens Leica IM50. As imagens processadas foram então utilizadas para medição do diâmetro e comprimento das hifas vegetativas no software Image Tool 2.0

### 3.4.2 Características qualitativas

Discos de 9mm dos isolados em estudo foram inoculados em meio BDA e incubados a 28°C por 21 dias. As características culturais como cor, aspecto, margem, micélio aéreo e zoneamento foram observadas após 72 horas e 21 dias de incubação.

## 3.5 Germinação simbiótica

### 3.5.1 Desinfestação das sementes

Duzentos microgramas de sementes de *Coppensia doniana* foram superficialmente desinfestadas por imersão em solução de água sanitária a 20% (c.a. 0,5 % de cloro ativo), seguido de três lavagens sucessivas em água destilada autoclavada. As sementes desinfestadas foram mantidas imersas em um volume de 50 mL de água destilada autoclavada.

### 3.5.2 Cultivo simbiótico

A suspensão de sementes foi submetida à agitação constante para homogeneização e, posteriormente, 200 µL da mesma foi aplicada sobre a superfície de cada placa de Petri contendo 20 mL de meio ágar aveia modificado (Dixon, 1987). Cada placa foi inoculada com um disco de 9 mm de diâmetro, contendo o micélio fúngico, retirado das bordas das colônias em crescimento em meio BDA. Placas contendo meio ágar aveia e sementes de *Coppensia doniana*, sem inoculação, foram utilizadas como controle. As placas foram seladas com filme plástico parafilm e incubadas a 23 °C, sob ausência de luz. Três repetições de cada tratamento foram distribuídas ao acaso na câmara de crescimento.

Após 30 dias foi realizada a avaliação do desenvolvimento dos protocórmios, sob microscópio estereoscópico (Leica). Foi desenhado um *grid* de 1x1cm no verso de cada placa para auxílio na contagem das sementes. Aos diferentes estádios de desenvolvimento dos protocórmios foram atribuídas notas de 0 a 4, a saber: 0 = não ocorreu germinação; 1 = embrião bem desenvolvido dentro do envoltório e formação de

rizóides; 2 = rompimento da testa; 3 = aparecimento do pró-meristema; 4 = início da formação da primeira folha.

### **3.5.3 Confirmação da associação micorrízica**

Os protocórmios foram clareados e corados com *Trypan blue* segundo método proposto por Phillips e Hayman (1970). Protocórmios em diferentes estádios de desenvolvimento foram cuidadosamente montados entre lâmina e lamínula com lactoglicerol para observação, sob microscópio de luz (Olympus BX50), da formação dos pélotons, que caracterizam a associação simbiótica micorrízica em orquídeas (SMITH e READ, 1997; ZETTLER, 1997).

### **3.6 Análise estatística**

Os dados das características quantitativas foram submetidos à análise de variância e à comparação de médias pelo teste de Scott Knott, a 5 % de probabilidade, utilizando o programa GENES, versão 2006.4.1. A diversidade genética dos isolados, inferida com base nas características morfométricas, foi estudada por análise multivariada, utilizando técnicas de agrupamento baseadas na distância generalizada de Mahalanobis e nas duas primeiras variáveis canônicas.

A análise de agrupamento foi realizada no programa GENES, versão 2006.4.1, com base na distância generalizada de Mahalanobis (CRUZ e REGAZZI, 1997), utilizando o método UPGMA (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Averages) e o algoritmo de Tocher (RAO, 1952, citado por CRUZ e REGAZZI, 1997). Estas técnicas têm por finalidade reunir genótipos em diferentes grupos, de forma que exista máxima homogeneidade dentro dos grupos e máxima heterogeneidade entre os grupos (CRUZ; REGAZZI, 1997; PEREIRA, 1999).

As variáveis canônicas têm por finalidade resumir as informações do conjunto inicial de caracteres em poucos componentes, representados por combinações lineares daqueles caracteres, simplificando a análise de dados. Assim, a divergência, influenciada a princípio por um conjunto n-dimensional ( $n$ = número de variáveis), passa



a ser avaliada por um complexo bi ou tridimensional de fácil interpretação geométrica (CRUZ; REGAZZI, 1997).

A análise de variáveis canônicas foi realizada no programa Genes versão 2006.4.1, possibilitando avaliar a dissimilaridade dos genótipos por intermédio de uma dispersão gráfica. A percentagem de protocórmios em cada estágio de desenvolvimento foi calculada para cada isolado. A percentagem de germinação total para cada isolado foi calculada considerando os protocórmios do estágio 0 até o estágio 4.

O índice de crescimento foi calculado utilizando a seguinte fórmula:  $IC = (N1 + N2 \times 2 + N3 \times 3 + N4 \times 4) \div (N0 + N1 + N2 + N3 + N4)$ , onde N0 é o número de sementes no estágio 0, N1 o número de sementes no estágio 1 e assim até N4 (Otero et al., 2002, 2004, 2007). A porcentagem de germinação e o índice de crescimento foram calculados utilizando o programa Microsoft<sup>®</sup> Office Excel 2003, sendo o gráfico de percentagem de germinação e de desenvolvimento de protocórmios e o de índice de crescimento gerados pelo mesmo programa.

### **3.7 Análises moleculares**

Para as análises filogenéticas, a região ITS do DNA ribossomal dos isolados em estudo foi amplificada e seqüenciada. As seqüências foram editadas no programa Codon Code Aligner e alinhadas no programa ClustalW. As seqüências foram comparadas entre si pelo método UPGMA e com seqüências depositadas no GenBank pelo método neighbor Joining.

#### **3.7.1 Extração do DNA**

Os isolados foram cultivados em erlenmeyers contendo 50ml de meio BD por 10 dias, sob agitação e temperatura de 28 graus Celsius. Para a extração do DNA, foi utilizado o kit Invisorb DNA Spin Plant Mini Kit, conforme instruções do fabricante. O produto da extração foi aplicado em gel de agarose 1%, acrescido de 1 µL Load Buffer,

1  $\mu\text{L}$  de SYBRgreen, submetido à eletroforese e observado sob luz ultra violeta. A quantificação do DNA extraído foi feita utilizando o marcador Low DNA Mass Ladder.

### 3.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Amplificação da região ITS do rDNA: Para amplificar a região ITS1 foram utilizados os primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (WHITE et al. 1990). O mix de reagentes foi preparado utilizando 13,25  $\mu\text{L}$  de água MiliQ, 2,5  $\mu\text{L}$  de Tampão Tris-EDTA, 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 0,5  $\mu\text{L}$  de DNTP, 0,25 de Taq Polimerase, 1  $\mu\text{L}$  do primer ITS1, 1  $\mu\text{L}$  do primer ITS4 aplicados junto a 5  $\mu\text{L}$  de DNA amostral. A reação em cadeia da polimerase foi realizada no termociclador PTC-100 MJ-Research Inc., com 35 ciclos de desnaturação a 95° por 1 minuto, anelamento a 52 ° por 1 minuto e extensão a 72° por 1 minuto. Ao final do último ciclo foi programada uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

O produto da reação foi purificado utilizando o kit QIAquick PCR Purification Kit fornecido pela QIAGEN seguindo as instruções do fabricante. Os produtos das reações de PCR, juntamente com o DNA genômico extraído na Colômbia, foram trazidos para o Brasil após serem liofilizados.

### 3.7.3 Sequenciamento

Os produtos da PCR purificados foram sequenciados utilizando o kit ETdyenamic em sequenciador ABI3100. A PCR com nucleotídeos marcados foi feita utilizando 2 $\mu\text{L}$  do produto da PCR (aproximadamente 60 ng de DNA), 2,0 $\mu\text{L}$  do mix ETdye, 2,0 $\mu\text{L}$  do tampão *save money*, 2  $\mu\text{L}$  do primer a 5pmol/ $\mu\text{L}$  e 2  $\mu\text{L}$  de água Mili-Q.

Para a purificação dos produtos da PCR do sequenciamento foi preparada uma solução 1:1 de Acetato de sódio 3M pH 9,0 e EDTA 0,5M pH 8,0. 60 $\mu\text{L}$  deste mix foi aplicado em cada amostra da placa de sequenciamento e a placa vortexada. Em seguida foi adicionado etanol absoluto (60 $\mu\text{L}$ /amostra) e agitado no vórtex novamente. A placa foi centrifugada por 45 minutos a 4000rpm com a temperatura mantida em 4°C.

O álcool foi dispensado e a placa centrifugada invertida por mais 1 minuto a 1000 rpm para garantir a remoção do resíduo de álcool. Depois foi adicionado etanol a 70% (150µL por amostra) e a placa novamente centrifugada por 5 minutos, 4000 rpm a 4°C. Por fim, a placa foi centrifugada invertida por 1 minuto a 1000 rpm para eliminar o resíduo de álcool e guardada na gaveta até o dia seguinte. No outro dia a placa foi envolvida em papel alumínio e encaminhada para o laboratório CBTEC onde foi realizado o sequenciamento.

#### **3.7.4 Análise dos resultados**

Os contigs foram editados no software Codon Code Aligner® e alinhadas no software ClustalW® utilizando as penalizações de abertura e extensão de *gaps* configuradas em 10 e 0,1 respectivamente. No programa MEGA® (Tamura et al, 2007). Também foram feitas as comparações com sequências do Genbank pelo software online BLAST e as análises filogenéticas entre os isolados pelo método “neighbor Joining” e “minimum evolution”.

Foram feitas árvores filogenéticas para: 1. Identificação dos isolados obtidos de *Coppensia doniana* em Campos do Jordão; 2. Identificação dos isolados obtidos de outras oncidíneas na Colômbia; 3. Filogenia de isolados do gênero *Ceratobasidium* associados à subtribo Oncidiinae, em diferentes países da América Latina, estudados até o momento.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Isolamento e identificação preliminar

#### 4.1.1 *Coppensia doniana*, Campos do Jordão

Pélotons intactos e degradados foram observados em raízes de *Coppensia doniana*. A maior parte dos fragmentos de raízes estava densamente colonizada por pélotons brancos, que ocupavam toda a região do córtex, circundando o cilindro vascular. Os fragmentos de raízes colonizadas foram facilmente diferenciados dos fragmentos não colonizados. (Figura 3 A, B).

134 fungos isolados foram obtidos com o método descrito (Tabela 2). Lâminas de microscopia óptica foram montadas e as características dos fungos rizoctonióides foram observadas para 131 isolados (Figura 3 C e D), indicando 97,75% de sucesso com a técnica utilizada. Foram isolados fungos uni ou binucleados (Figura 4). Em um caso, as duas formas foram encontradas colonizando a mesma orquídea. Três isolados representativos de cada planta amostrada foram selecionados para análises morfológicas e sequenciamento da região ITS do DNA, exceto para a planta número 10 da qual se obteve apenas um isolado Rizoctonióide (Tabela 3).

Tabela 2 - Relação dos isolados obtidos por planta em estudo

Planta amostrada	Nº total de		
	isolados	Rizoctonióides	Morfotipos
C. doniana 01	9	9	2
C. doniana 02	15	15	1
C. doniana 03	20	20	1
C. doniana 04	18	18	1
C. doniana 05	13	13	1
C. doniana 06	3	0	3
C. doniana 07	7	7	1
C. doniana 08	23	23	1
C. doniana 09	25	25	1
C. doniana 10	1	1	1
Total	134	131	

Tabela 3 - Isolados selecionados para caracterização morfológica e molecular, condição nuclear e código de acesso das sequências no *Genbank*. UNR= Fungo rizoctonióide uninucleado. BNR= Fungo rizoctonióide binucleado

Orquídea	Número da planta	Código da cultura	Condição nuclear	Núm. de acesso no <i>Genbank</i>
<i>Coppensia doniana</i>	1	RBSV01	UNR	GQ892591
<i>Coppensia doniana</i>	1	RBSV02	UNR	GQ892592
<i>Coppensia doniana</i>	1	RBSV03	BNR	GQ892593
<i>Coppensia doniana</i>	2	RBSV04	BNR	GQ892594
<i>Coppensia doniana</i>	2	RBSV05	BNR	GQ892595
<i>Coppensia doniana</i>	2	RBSV06	BNR	GQ892596
<i>Coppensia doniana</i>	3	RBSV07	UNR	GQ892597
<i>Coppensia doniana</i>	3	RBSV08	UNR	GQ892598
<i>Coppensia doniana</i>	3	RBSV09	UNR	GQ892599
<i>Coppensia doniana</i>	4	RBSV10	BNR	GQ892600
<i>Coppensia doniana</i>	4	RBSV11	BNR	GQ892601
<i>Coppensia doniana</i>	4	RBSV12	BNR	GQ892602
<i>Coppensia doniana</i>	5	RBSV13	BNR	GQ892603
<i>Coppensia doniana</i>	5	RBSV14	BNR	GQ892604
<i>Coppensia doniana</i>	5	RBSV15	BNR	GQ892605
<i>Coppensia doniana</i>	6	RBSV16	BNR	GQ892606
<i>Coppensia doniana</i>	6	RBSV17	BNR	GQ892607
<i>Coppensia doniana</i>	6	RBSV18	BNR	GQ892608
<i>Coppensia doniana</i>	7	RBSV19	UNR	GQ892609
<i>Coppensia doniana</i>	7	RBSV20	UNR	GQ892610
<i>Coppensia doniana</i>	7	RBSV21	UNR	GQ892611
<i>Coppensia doniana</i>	8	RBSV22	BNR	GQ892612
<i>Coppensia doniana</i>	8	RBSV23	BNR	GQ892613
<i>Coppensia doniana</i>	8	RBSV24	BNR	GQ892614
<i>Coppensia doniana</i>	9	RBSV25	UNR	GQ892615

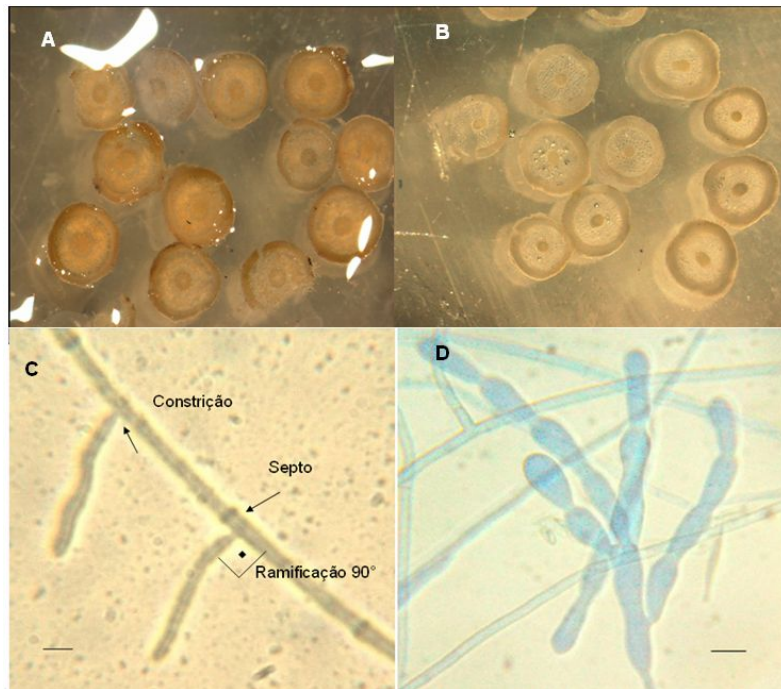


Figura 3 – A: Raízes colonizadas e B: raízes não colonizadas de *C. doniana* sob microscópio estereoscópico (50X). C: Características utilizadas para a identificação de fungos rizoctonióides e D: Células monilióides de RBSV25 (UNR). Barra= 10 $\mu$ m em C e 25 $\mu$ m em

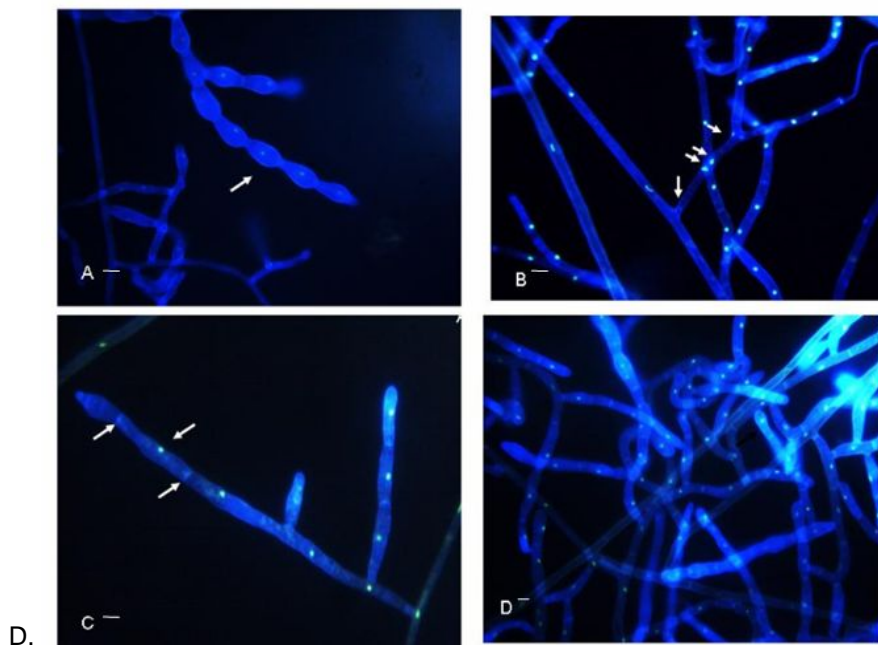


Figura 4 - Células uninucleadas (A, C e D) e binucleadas (B) dos fungos rizoctonióides selecionados para caracterização morfológica e molecular. Setas indicam posição dos núcleos e septos delimitando as células.

#### 4.1.2 Orquídeas da subtribo Oncidiinae, Colômbia.

Do isolamento realizado nos dois pontos de coleta na Colômbia foram selecionados 23 isolados que apresentavam características de fungos rizoctonióides dentre um grande número de endofíticos. Os isolados selecionados foram prontamente cultivados em meio líquido BD para a identificação molecular. A lista contendo os códigos dos isolados para cada planta amostrada e seus respectivos pontos de coleta se encontram na Tabela 4.

Tabela 4 - Código dos isolados obtidos na Colômbia e seus respectivos pontos de coleta e planta hospedeira

<b>Local</b>	<b>Orquídea</b>	<b>Código</b>
Buenaventura	<i>Ionopsis utricularioides</i>	RBSV 101
		RBSV 102
		RBSV 103
		RBSV 104
		RBSV 105
		RBSV 106
		RBSV 107
		RBSV 108
		RBSV 109
		RBSV 110
		RBSV 111
		RBSV 112
		RBSV 113
Felídea	<i>Oncidium abortivum</i>	RBSV 114
		RBSV 115
		RBSV 116
		RBSV 117
Buenaventura	<i>Psychmorchis pusilla</i>	RBSV 118
		RBSV 119
		RBSV 120
		RBSV 121
		RBSV 122
		RBSV 123
		RBSV 124
		RBSV 125

Diferentes níveis de colonização puderam ser observados. As amostras de *Coppensia doniana*, de hábito terrestre em Campos do Jordão, eram quase que em sua totalidade densamente colonizadas. As orquídeas coletadas na Colômbia eram em sua totalidade epífitas e nelas foi visualizada pouca colonização. Isto vem se tornando uma regra geral para orquídeas estudadas em climas tropicais: as epífitas apresentam menor colonização, quando comparadas às terrestres e principalmente às rupícolas.

## **4.2 Caracterização morfológica**

### **4.2.1 Dados qualitativos**

Após 72 horas de incubação a 28°C, em meio BDA, alguns isolados apresentaram cor branca enquanto outros apresentaram cor creme. O aspecto da colônia variou entre aveludado e cotonoso e as hifas da margem da colônia eram sempre imersas no meio de cultura (Tabela 5). Neste período, as colônias estavam em desenvolvimento e, portanto, as características qualitativas disponíveis não foram suficientes para disintiguir grupos consistentes dentre os isolados fúngicos.

O cladograma construído pelo método UPGMA (Figura 5), baseado na matriz de Mahalanobis e algoritmo de Tocher, utilizando parâmetros qualitativos dos isolados após 21 dias de incubação em meio BDA (Tabela 6), distinguiu claramente três grupos de fungos: O primeiro grupo (BNR1) compreende todos os isolados binucleados de cor creme, com micélio aéreo abundante e hifas tocando o topo das placas de Petri (Figura 6A). O segundo grupo (BNR2) foi formado por fungos também binucleados de cor creme, aspecto aveludado e micélios aéreos mas com ornamentações rendilhadas nas margens da colônia e formação de escleródios de cor laranja (1 – 2 mm) sobre o meio de cultura (Figura 6B -6C). O último grupo (UNR) compreende os isolados uninucleados, com zonas de crescimento circulares em tonalidades laranja mais escuras e mais claras de forma intercalada na placa de petri, aspecto do micélio aveludado e hifas marginais imersas no meio de cultura. Os dados utilizados para os agrupamentos após 72 horas e após 21 dias de incubação estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.



Os clados de fungos binucleados (BNR1 e BNR2) foram identificados como pertencentes ao gênero *Ceratrhiza* (fase anamorfica de *Ceratobasidium*), baseando-se na chave dicotômica proposta por Currah e Zelmer (1992) e, o clado de fungos uninucleados (UNR) foi identificado como *Rhizoctonia*-uninucleada, conforme recomendado por GONZALES (2006).

Tabela 5 - Características culturais dos isolados de *Coppensia doniana* sp. após 72 dias de incubação a 28°C

<b>Isolado</b>	<b>Cor</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Margem</b>	<b>Micélio aéreo</b>	<b>Zoneamento</b>
RBSV01	Creme	aveludado	imersa	presente	-
RBSV02	Creme	aveludado	imersa	presente	-
RBSV03	Branco	aveludado	imersa	abundante	-
RBSV04	Branco	Avelud. pulverulento	imersa	abundante	-
RBSV05	Branco	Avelud. pulverulento	imersa	abundante	-
RBSV06	Branco	Avelud. pulverulento	imersa	abundante	-
RBSV07	Creme	aveludado	imersa	presente	eminente
RBSV08	Creme	aveludado	imersa	presente	eminente
RBSV09	Creme	aveludado	imersa	presente	eminente
RBSV10	Creme	grumoso	imersa	presente	circular
RBSV11	Creme	aveludado	imersa	presente	circular
RBSV12	Creme	grumoso	imersa	presente	circular
RBSV13	Creme	aveludado	imersa	presente	eminente
RBSV14	Creme	aveludado	imersa	presente	eminente
RBSV15	Creme	aveludado	imersa	presente	eminente
RBSV16	Branco	Avelud./pulverulento	imersa	abundante	-
RBSV17	Branco	Avelud./pulverulento	imersa	abundante	-
RBSV18	Branco	Avelud./pulverulento	imersa	abundante	-
RBSV19	Creme	aveludado	imersa	presente	-
RBSV20	Creme	aveludado	imersa	presente	-
RBSV21	Creme	aveludado	imersa	presente	-
RBSV22	Branco	Avelud. pulverulento	imersa	abundante	-
RBSV23	Branco	Avelud. pulverulento	imersa	abundante	-
RBSV24	Branco	Avelud. pulverulento	imersa	abundante	-
RBSV25	Creme	aveludado	imersa	presente	eminente

Tabela 6 - Características culturais dos isolados de *Coppensia doniana* sp. após 21 dias de incubação a 28°C

<b>Isolado</b>	<b>Cor</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Margem</b>	<b>Micélio aéreo</b>	<b>Zoneamento</b>
RBSV01	creme	aveludado	lmersa	presente	circular
RBSV02	creme	aveludado	lmersa	presente	circular
RBSV03	creme	cotonoso	lmersa	abundante	rendilhado
RBSV04	creme	cotonoso	lmersa	abundante	rendilhado
RBSV05	creme	cotonoso	lmersa	abundante	rendilhado
RBSV06	creme	cotonoso	lmersa	abundante	rendilhado
RBSV07	creme	aveludado	lmersa	presente	circular
RBSV08	creme	aveludado	lmersa	presente	circular
RBSV09	creme	aveludado	lmersa	presente	circular
RBSV10	creme	grumoso	lmersa	denso	ausente
RBSV11	creme	grumoso	lmersa	denso	ausente
RBSV12	creme	grumoso	lmersa	denso	ausente
RBSV13	creme	grumoso	lmersa	denso	ausente
RBSV14	creme	grumoso	lmersa	denso	ausente
RBSV15	creme	grumoso	lmersa	denso	ausente
RBSV16	creme	cot./pulverulento	lmersa	abundante	rendilhado
RBSV17	creme	cot./pulverulento	lmersa	abundante	rendilhado
RBSV18	creme	cot./pulverulento	lmersa	abundante	rendilhado
RBSV19	creme	aveludado	lmersa	presente	circular
RBSV20	creme	aveludado	lmersa	presente	circular
RBSV21	creme	aveludado	lmersa	presente	circular
RBSV22	creme	cotonoso	lmersa	abundante	rendilhado
RBSV23	creme	cotonoso	lmersa	abundante	rendilhado
RBSV24	creme	cotonoso	lmersa	abundante	rendilhado
RBSV25	creme	aveludado	lmersa	presente	circular

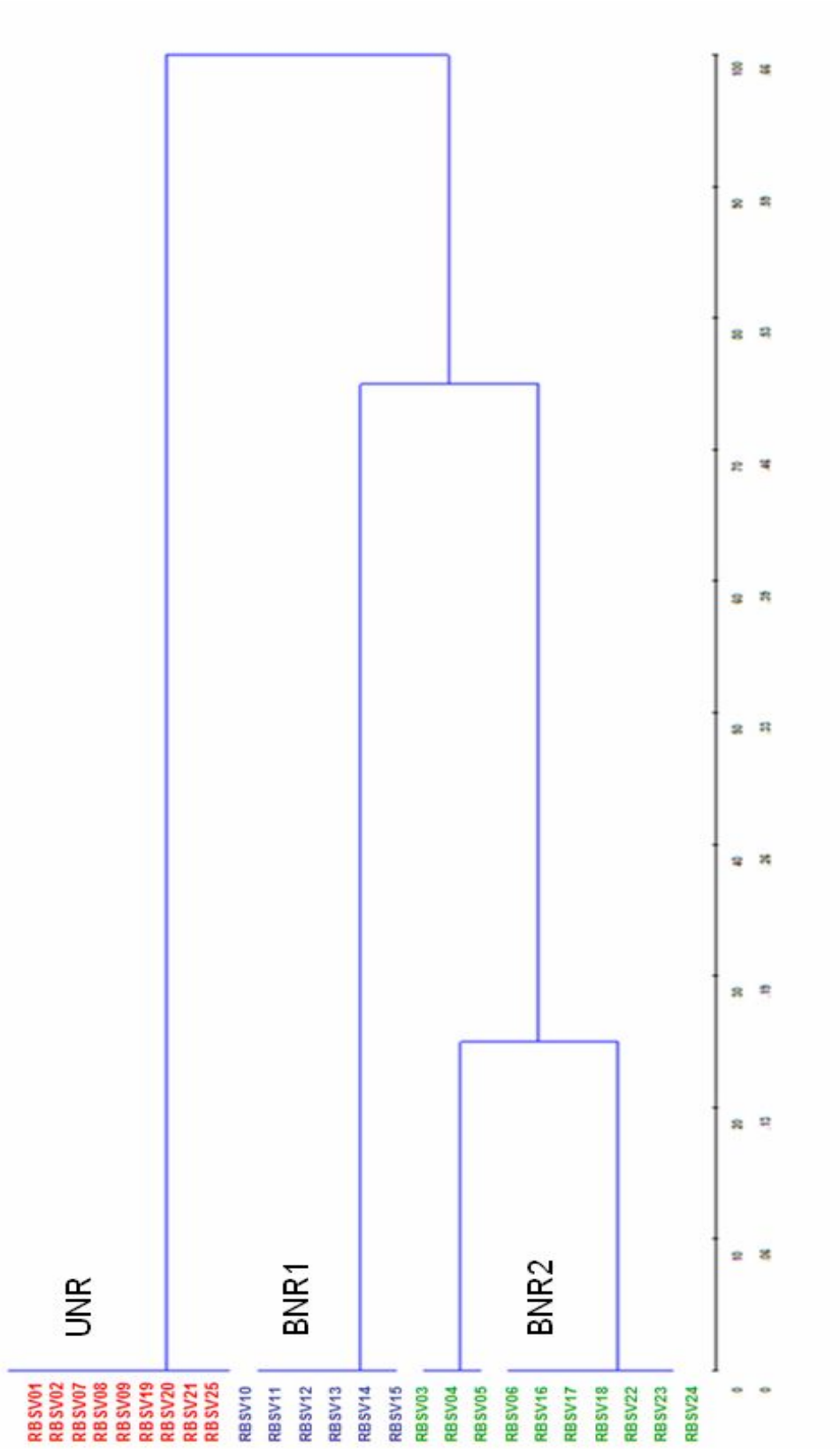


Figura 5 - Cladograma obtido pelo método UPGMA, baseado na matriz de Mahalanobis, utilizando características qualitativas após 21 dias de incubação em meio BDA.

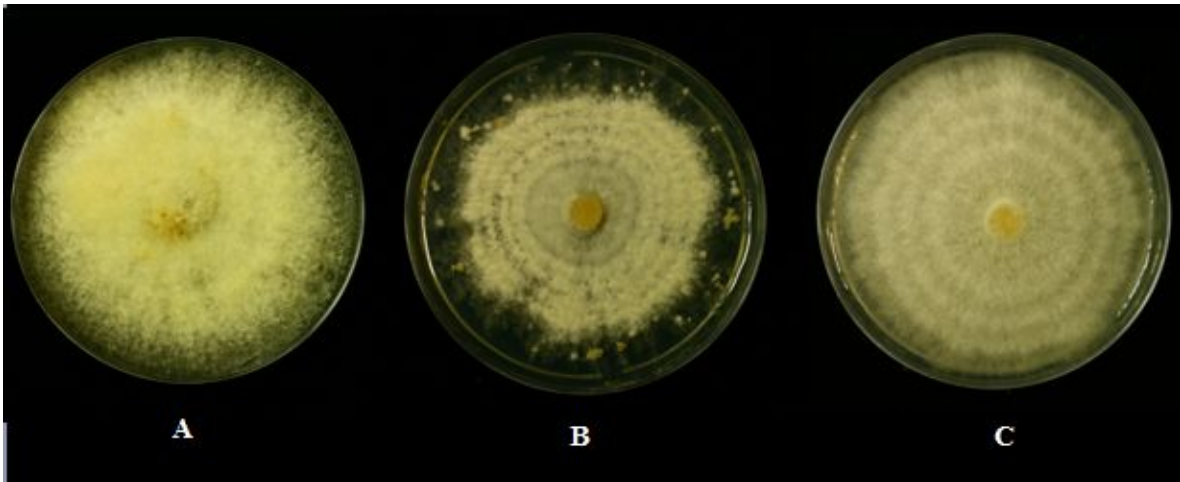


Figura 6 - Isolados representativos dos três clados obtidos neste estudo. A: BNR1, B: BNR2, C: UNR

#### 4.2.2 Dados quantitativos

A maioria dos parâmetros analisados mostrou diferenças entre os isolados (Tabela 6). As taxas de crescimento e o diâmetro da cultura após 72 horas de incubação em meios BDA e CMA separaram os isolados fúngicos em dois grupos distintos: um grupo formado por fungos de crescimento lento (BNR2) e outro por fungos de crescimento rápido (BNR1 e UNR). Os parâmetros quantitativos fundamentais para separar os dois morfotipos de crescimento rápido foram as dimensões das células monilióides. Neste caso, o parâmetro diâmetro de hifa não foi considerado uma boa característica morfométrica, porque as diferenças entre os isolados não mostraram significância (5%) no teste de Scott-Knott.

A análise discriminante utilizando as três primeiras variáveis canônicas agrupou os isolados em três clados (Figura 7): O primeiro grupo é composto por fungos uninucleados de crescimento rápido, com células monilióides em forma de barril. O segundo, formado por fungos binucleados, também de crescimento rápido, com células monilióides em forma de barril, mas com dimensões inferiores ao primeiro grupo e, o último clado, composto por fungos binucleados de crescimento lento, com duas diferentes formas de células monilióides (Tabela 6) (Figura 7).

Tabela 7 - Dados quantitativos: Taxas de crescimento (TC) e diâmetro após 72 horas (D) em meios BDA e CMA; diâmetro de hifa vegetativa (DH) e dimensões das células monilóides (LCM e CCM)

Cód.	C.Nuclear	TC <sup>BDA</sup>	TC <sup>CMA</sup>	D <sup>BDA</sup>	D <sup>CMA</sup>	DH	LCM	CCM
		-----mm.h <sup>-1</sup> -----		-----cm-----		-----µm-----		
1	Uni	0,03345	0,04583	5,33333	6,35000	4,53500	11,800	28,740
2	Uni	0,03345	0,04583	5,46667	6,35000	5,19833	12,280	26,020
3	Bi	0,01609	0,02276	2,86667	3,15667	4,77500	5,200	24,300
4	Bi	0,01505	0,02240	2,68333	3,21667	5,30500	5,890	25,100
5	Bi	0,01586	0,02274	2,85000	3,50000	5,72833	5,480	22,630
6	Bi	0,01366	0,02274	2,53333	3,48333	5,71667	6,320	23,180
7	Uni	0,02894	0,03455	4,90000	5,16667	5,46833	12,030	30,440
8	Uni	0,02789	0,03854	4,45000	5,31667	5,25667	12,500	28,010
9	Uni	0,02685	0,03698	4,60000	5,13333	5,41833	12,500	28,730
10	Bi	0,02921	0,03733	4,33333	5,83333	5,66500	10,100	20,050
11	Bi	0,02963	0,04210	4,81667	5,95833	4,67833	10,110	20,960
12	Bi	0,03188	0,04080	4,88333	5,83333	5,01000	11,050	20,360
13	Bi	0,03009	0,03821	4,66667	5,32000	4,87833	10,230	23,690
14	Bi	0,03067	0,03830	4,66667	4,33333	4,92333	9,880	23,020
15	Bi	0,02998	0,03899	4,65000	4,40000	4,76833	9,100	23,040
16	Bi	0,02141	0,02083	3,28333	3,53000	5,19500	6,160	22,330
17	Bi	0,01921	0,02237	3,21667	3,66667	5,28333	5,480	23,960
18	Bi	0,02106	0,02243	3,33333	3,59333	5,53667	5,840	21,570
19	Uni	0,03515	0,04427	4,98333	6,25000	5,45000	11,040	29,980
20	Uni	0,03414	0,04358	5,21667	6,01667	5,72833	11,010	29,740
21	Uni	0,03264	0,04097	4,98333	5,80000	5,07500	12,050	30,050
22	Bi	0,01400	0,02483	2,73333	3,75000	5,14833	6,160	23,230
23	Bi	0,01366	0,02604	2,76667	3,86667	4,79667	6,230	20,960
24	Bi	0,01399	0,02656	2,70000	3,90000	4,82667	5,840	23,570
25	Uni	0,02847	0,03507	4,71667	5,06667	5,28167	14,330	28,800

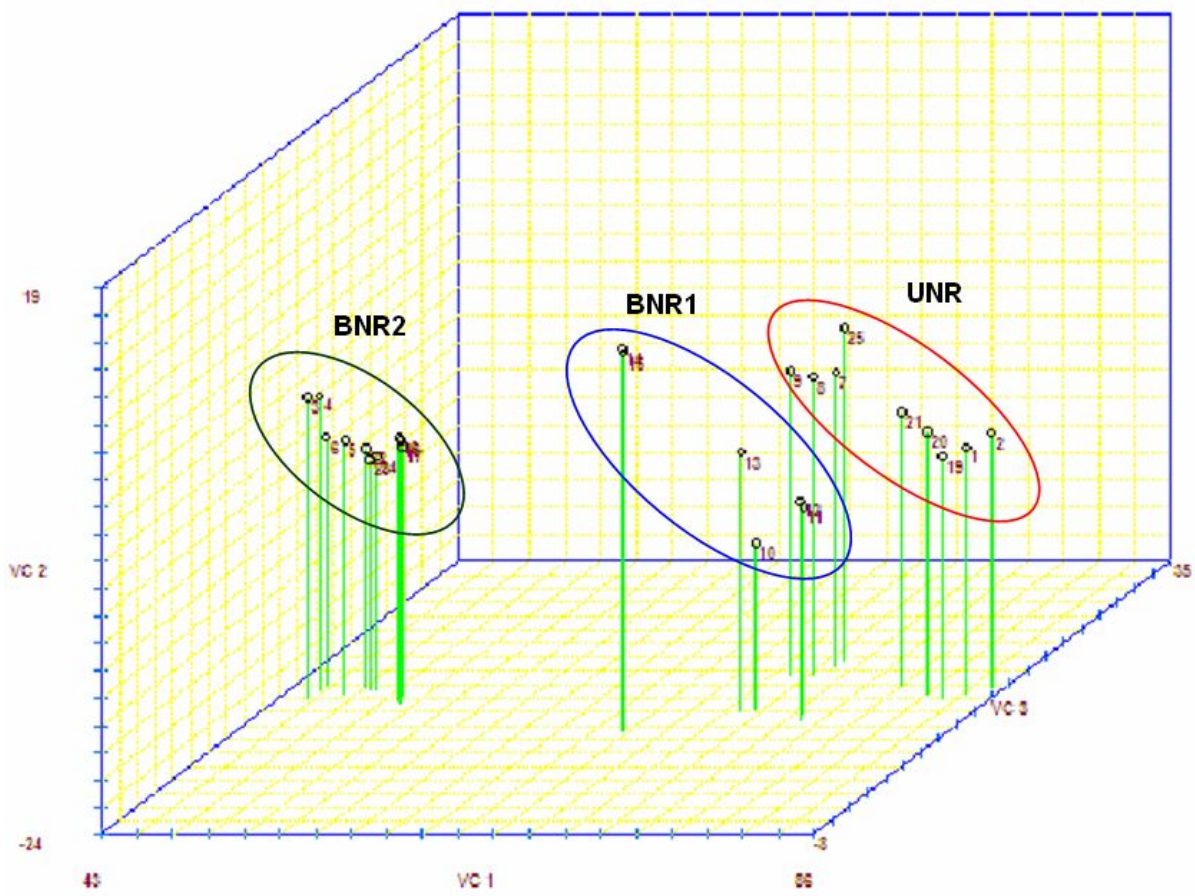


Figura 7 - Dispersão gráfica utilizando as três primeiras variáveis canônicas, baseadas nos dados quantitativos (morfométricos) das colônias

### 4.3 Sequenciamento da região ITS e análises filogenéticas

#### 4.3.1 *Coppensia doniana* – Campos do Jordão

Seguidas tentativas foram realizadas para o sequenciamento da região ITS do rDNA dos isolados em ambas as direções, utilizando os primers ITS1 e ITS4. Entretanto, sequências de qualidade foram obtidas em 100% dos casos para o primer ITS1 mas não para o primer ITS4. As sequências produzidas com qualidade mínima desejável variaram portanto de 499pb a 630pb. Portanto, para o alinhamento, as sequências dos isolados obtidos de *Coppensia doniana* foram delimitadas em 499 pares de base.

A história evolutiva dos isolados de *C. doniana* foi inferida utilizando o método de “neighbor-Joining” (SAITOU; NEI, 1987). A árvore otimizada com a soma do comprimento dos ramos = 0.93825655 é mostrada na Figura 8. Os valores de bootstrap com 1000 replicações são mostrados próximos aos ramos. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de ramo nas unidades idênticas às das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método *Maximum composite likelihood* (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004).

Os mesmos três clados obtidos anteriormente pelas análises multivariadas dos dados morfológicos foram revelados na árvore filogenética.

Fungos do clado BNR1 (binucleados de crescimento rápido) têm como “parente” mais próximo no *Genbank* (99%) um isolado do gênero *Ceratobasidium*, obtido de *Epipactis palustris*, Orchidaceae pertencente à tribo Neottieae, isolado na Hungria em região pantanosa (*wetland*). Segundo o autor da sequência, este isolado foi obtido de segmento de raiz incubado em meio BDA. Já os isolados do clado *UNR* têm suas sequências 98% relacionadas com um fungo micorrízico isolado de *Taeniophyllum aphyllum*, Orchidaceae da tribo Vandeeae, subtribo Aeridinae, isolado no Japão. Espécies desta subtribo de orquídeas ocorrem em regiões de temperaturas quentes da Ásia, Austrália, ilhas do leste do Oceano Pacífico.

O clado *BNR2*, formado pelos fungos binucleados de crescimento lento, não possui “parentes” no *GenBank* com mais de 90% de similaridade, o que indica a possibilidade da descoberta de um novo grupo dentro do gênero *Ceratobasidium*.

Relacionando os cladogramas obtidos em Campos do Jordão com os grupos de anastomose (AG's) estudados por Sharon (2008), podemos observar que um representante do grupo de anastomose C (*Ceratobasidium* sp. AG-C) se encaixa dentro do clado BNR1 e que o grupo de anastomose mais próximo dos isolados uninucleados (UNR) é o AG-B. Novamente, os isolados binucleados de crescimento lento (BNR2) não possuem relação de proximidade com nenhum dos grupos de anastomose estudados de *Ceratobasidium* (Figura 8).



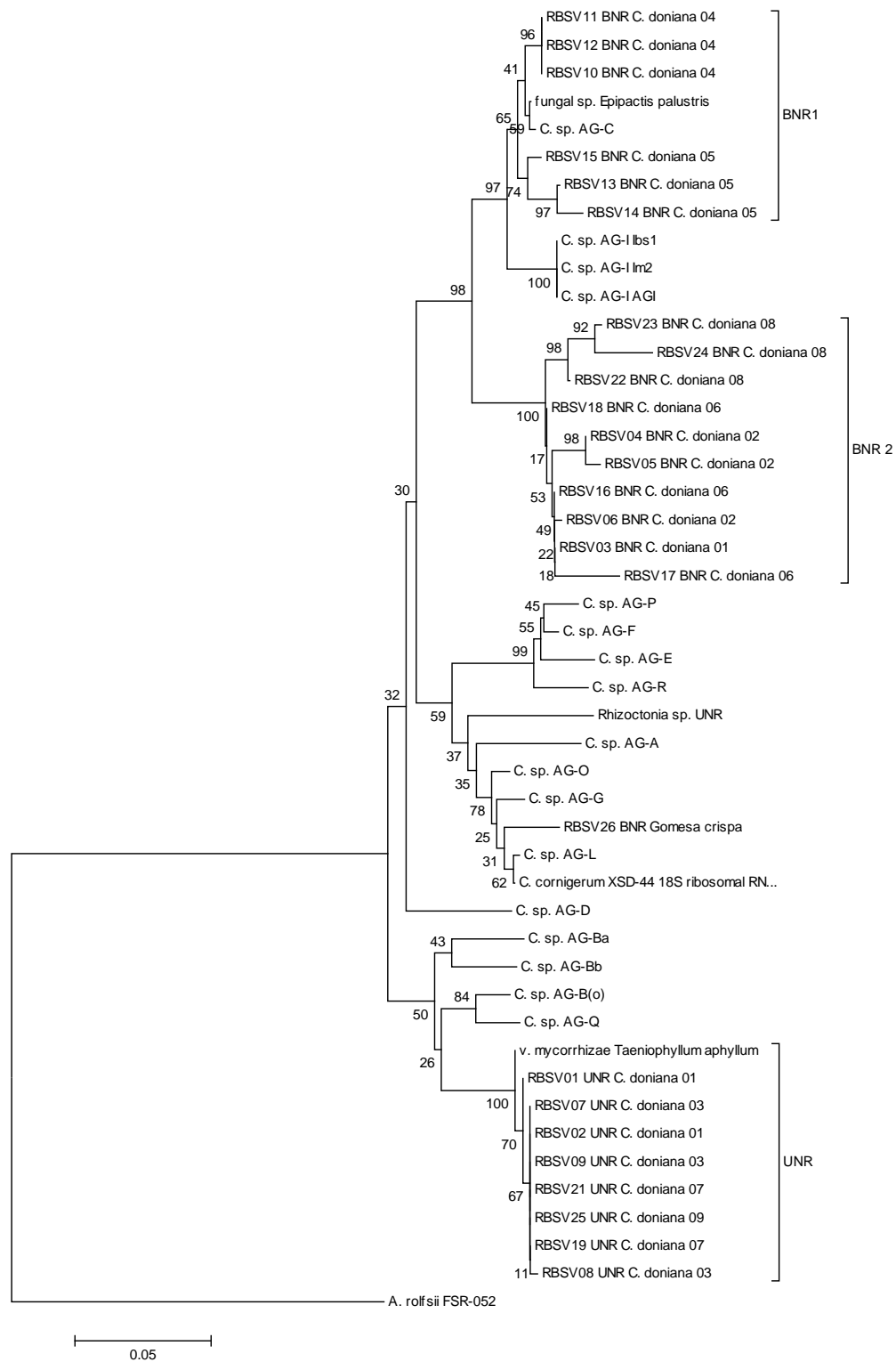


Figura 8 –Árvore filogenética dos isolados de *C. doniana* e sua relação com os grupos de anastomose (AG's) do gênero *Ceratobasidium*

#### 4.3.2 Isolados de orquídeas da subtribo Oncidiinae – Colômbia

Para os isolados de *Ionopsis utricularioides*, *Psychmorchis pussila* e *Oncidium abortivum* obtidos na Colômbia, o sequenciamento da região ITS foi feito com sucesso em ambas as direções. Os *contigs* produzidos com qualidade mínima desejável variaram de 540pb a 667pb.

Todos os isolados de *I. utricularioides* foram identificados dentro do gênero *Ceratobasidium*. Algumas sequências são 98% idênticas a um isolado (JTO232) também de *I. utricularioides* estudado por Otero (2007) na Costa Rica. Os fungos isolados de *Psychmorchis pussila*, também relacionados em sua totalidade com o gênero *Ceratobasidium*, tiveram como parentes mais próximos no *GenBank* sequências pertencentes ao grupo de anastomose AG-B (97%), e uma das sequências foi 100% idêntica ao isolado da Costa Rica JTO232. Os fungos obtidos de *Oncidium abortivum* foram identificados como *Nodulisporium sp.*, *Curvularia affinis* (patógeno) e dois fungos endofíticos não-cultiváveis (99% e 97%).

A história evolutiva dos isolados foi inferida utilizando o método de Neighbor-Joining. A árvore otimizada com a soma do comprimento dos ramos = 0.62421862 é mostrada na Figura 9. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos dos ramos nas unidades idênticas às das distâncias evolutivas usadas para construção da árvore. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método *Maximum Composite Likelihood*. Todas as posições que continham *gaps* e dados em falta foram eliminados do conjunto de dados (opção de deleção completa).

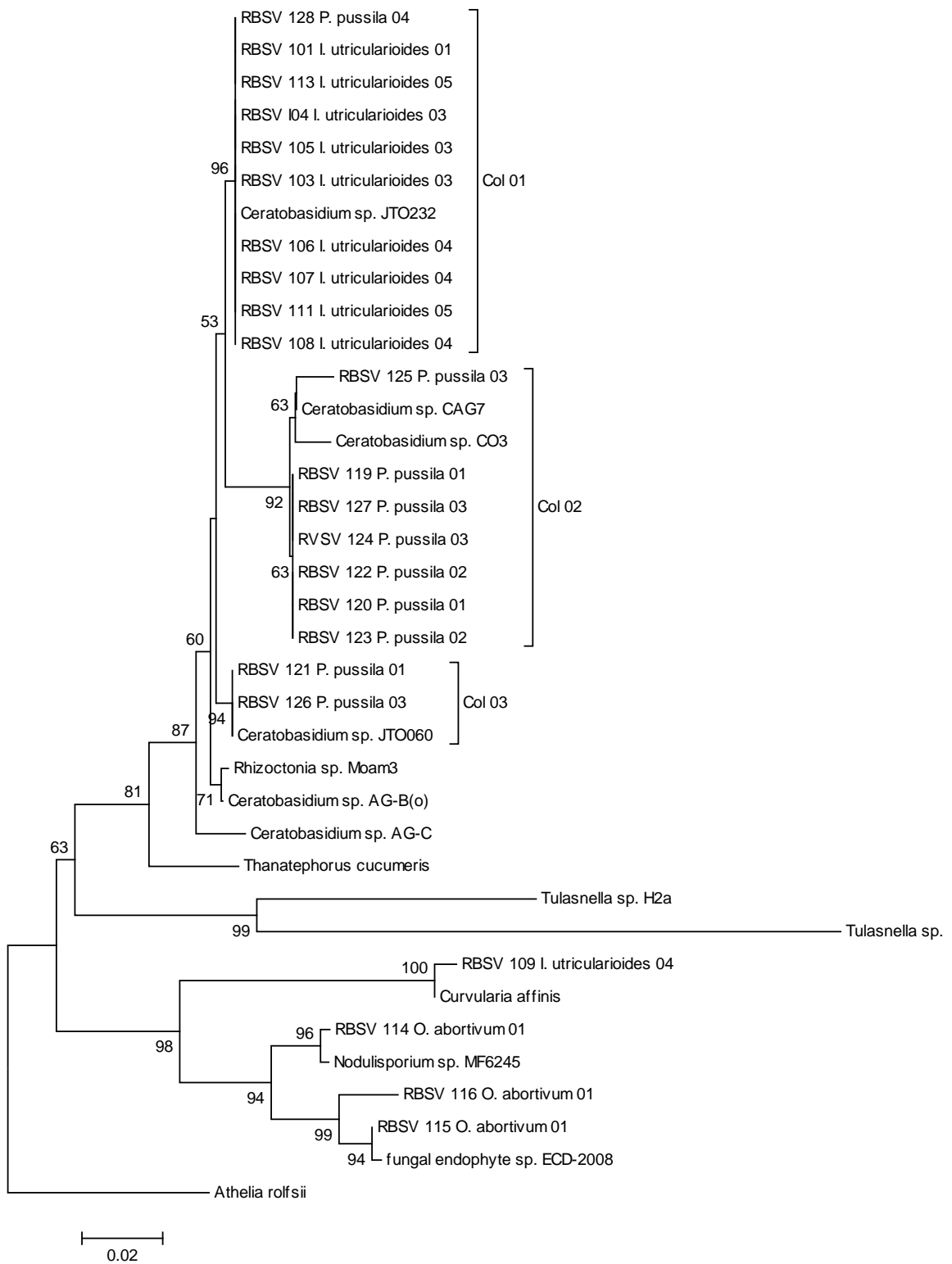


Figura 9 - Árvore filogenética mostrando a relação dos isolados obtidos na Colômbia com fungos rizoctonióides. Col01, Col02 e Col03 são os clados obtidos neste estudo.

#### 4.4 Análises filogenéticas incluindo demais isolados associados à subtribo *Oncidiinae*

A história evolutiva dos isolados pertencentes ao gênero *Ceratobasidium*, associados a orquídeas da subtribo *Oncidiinae* foi inferida utilizando o método *neighbor-joining*. A árvore otimizada, com a soma dos comprimentos das ramificações = 0.34817359, é mostrada na Figura 10. Os clados obtidos de *Coppensia doniana* em Campos do Jordão (UNR, BNR1 e BNR2) e os obtidos de *Ionopsis utricularioides* e *Psygmorchis pussila* na Colômbia (Col01, Col02 e Col03) são mostrados condensados para facilitar a visualização da árvore como um todo. A porcentagem de repetições em que os mesmos táxons são agrupados juntos no teste de *bootstrap* (1000 repetições) é mostrada junto às ramificações. A árvore foi desenhada em escala com as ramificações nas mesmas unidades das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método *Maximum Composite Likelihood* e o algoritmo Neighbor-Joining foi utilizado para gerar a primeira árvore. Todas as posições contendo *gaps* ou falta de dados foram eliminadas do conjunto final de dados.

Podemos observar com clareza que os clados obtidos de *Coppensia doniana* são grupos de *Ceratobasidiiums* diferentes dos estudados por Otero (2002, 2004, 2007) em países da América Central. Também podemos destacar os clados obtidos no Brasil, BNR1 e BNR2 que estão próximos na árvore e, assim como o clado B (OTERO; ACKERMAN, BAYMAN, 2002) é composto por isolados da Costa Rica e Porto Rico, também próximos geograficamente, indicando uma tendência regional de agrupamento filogenético.

Adicionalmente, os fungos isolados na Colômbia também não se agrupam aos previamente estudados por Otero, nem mesmo os isolados de *I. utricularioides*, que foi uma planta amplamente amostrada em Porto Rico, Panamá, Cuba e Peru, com dezenas de fungos sequenciados. A árvore contendo os clados completos é mostrada no anexo 1 e uma lista incluindo todas as sequências, obtidas no *GenBank*, utilizadas para os estudos filogenéticos deste trabalho, incluindo as devidas referências bibliográficas, se encontra no anexo 2.

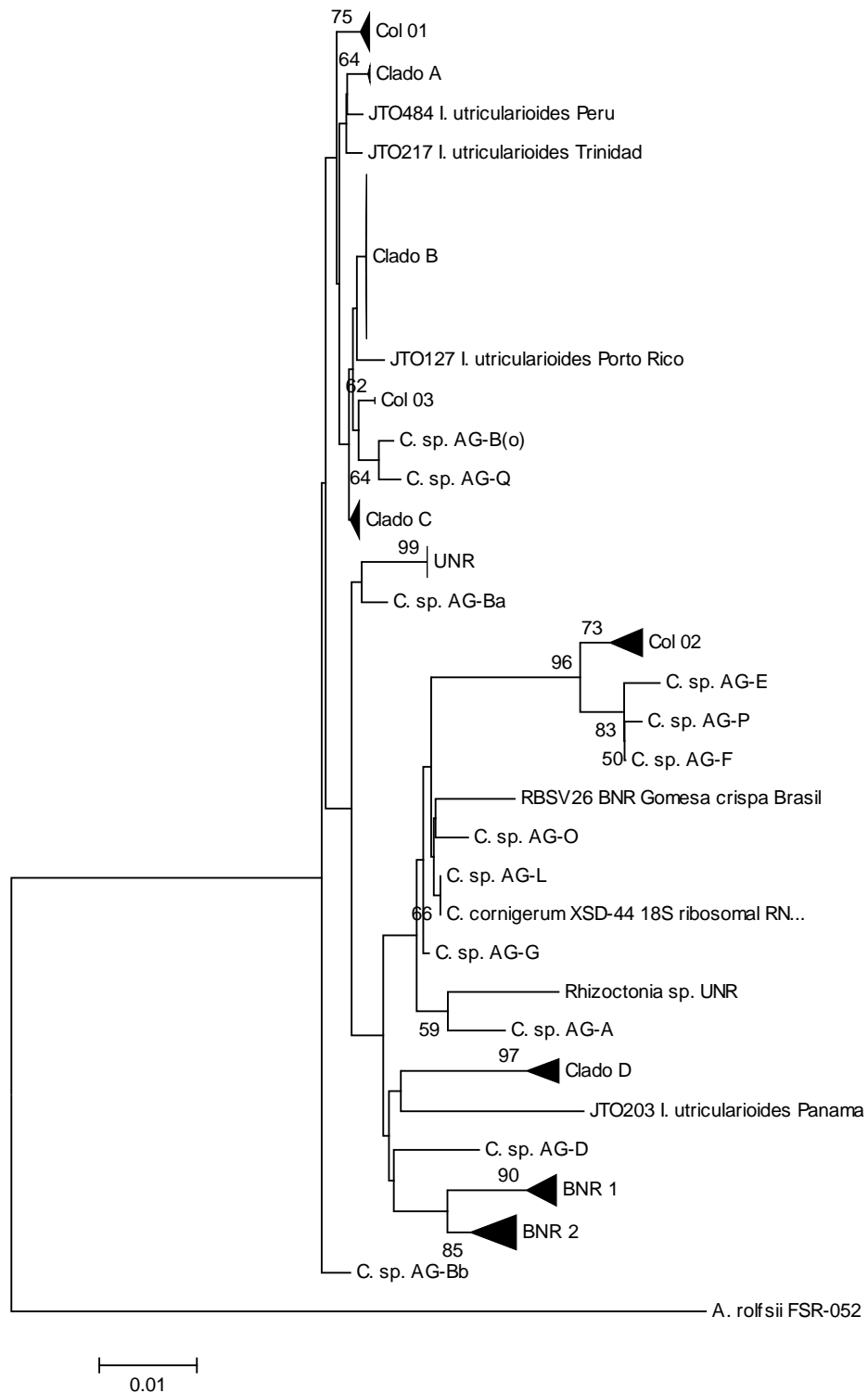


Figura 10 - Árvore filogenética mostrando as relações evolutivas dos diferentes clados pertencentes ao gênero *Ceratobasidium*, associados a orquídeas pertencentes à subtribo Oncidiinae em países da América Central, Brasil e Colômbia

#### 4.5 Testes de germinação simbiótica

Três isolados de cada clado obtido de *Coppensia doniana* foram testados quanto à capacidade de promover a germinação simbiótica das sementes desta orquídea. Devido ao alto número de placas contaminadas com bactérias endofíticas o clado BNR1 não pode ser quantificada após 30 dias de inubação do experimento, apesar da indução da germinação ter sido constatada visualmente. O número total de sementes avaliadas, os estádios de desenvolvimento (PETERSON; UETAKE; ZELMER, 1998) no qual as sementes se encontravam após 30 dias, a porcentagem de germinação e o índice de crescimento (OTERO; ACKERMAN, BAYMAN; 2002; 2004; 2005;; PEREIRA, 2006) estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8 - Testes de germinação simbiótica. (0, 1, 2, 3 e 4 representam os estádios de desenvolvimento das plântulas após 30 dias).

	n° sementes	0	1	2	3	4	%germinação	Índice de crescimento
RBSV05 BNR2	113	10,5	0,0	1,9	56,1	59,1	92,12%	3,20
RBSV24 BNR2	104	15,9	2,3	9,9	75,3	5,2	85,48%	2,47
RBSV18 BNR2	115	14,4	13,5	2,6	69,6	32,2	89,09%	2,69
RBSV19 UNR	127	16,2	6,4	11,1	79,7	47,9	89,63%	2,85
RBSV25 UNR	102	7,6	0,5	3,6	33,6	58,3	92,65%	3,30
Controle	103	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0%	0

A porcentagem de germinação das sementes variou de 89,09% nas placas inoculadas com o isolado RBSV18 a 92,65% para as inoculadas com RBSV25. O índice de crescimento variou de 2,85 a 3,30, sendo RBSV25 o isolado que induziu o maior desenvolvimento dos protocórmios em menor espaço de tempo. De uma forma geral, a maioria das sementes se encontravam entre os estádios 3 e 4 após 30 dias do experimento em todos os tratamentos testados (figura 11).

Após três dias de incubação, os fungos inoculados entraram em contato com as primeiras sementes (Figura 12A). No quarto dia, o entumescimento do embrião já podia ser observado para as sementes inoculadas com fungos do clado *UNR* e *BNR2* com

destaque para o isolado RBSV25 (Figura 12B). No décimo dia, foi verificado que as sementes inoculadas emitiam rizóides (Figura 12C) e no décimo nono dia o desenvolvimento do pró-meristema já podia ser observado (Figura 12D). Finalmente, no trigésimo dia, grande parte das sementes inoculadas apresentavam formação da primeira folha.

Pélotons intactos puderam ser observados ocupando quase todo o volume das células corticais (Figura 12E). Pélotons degradados também foram observados, geralmente na região mais interna do protocórmio. A colonização dos protocórmios foi observada principalmente na região basal dos mesmos. Observaram-se hifas crescendo na superfície e no interior do protocórmio (Figura 12F) juntamente às células monilióides que se formavam também dentro das células corticais.

Após 92 dias de cultivo, as plântulas foram repicadas para potes de vidro contendo 50ml de meio ágar-aveia acrescido de 1% de carvão ativado e foram incubadas sob luz branca a 24°C. Aos 6 meses de cultivo as orquídeas com pelo menos dois pares de folha foram transplantadas para vasos de cerâmica contendo Sphagno e mantidas no orquidário do Departamento de Genética da ESALQ (Figura13).

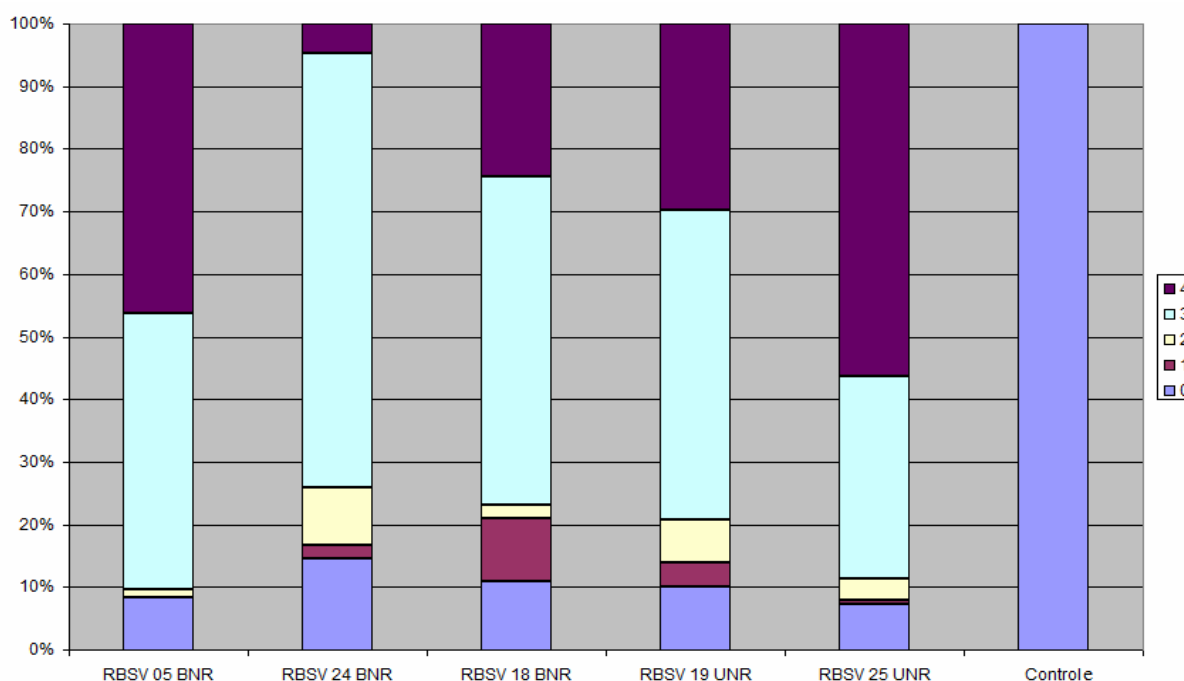


Figura 11: Porcentagem de sementes nos diferentes estádios de desenvolvimento após 30 dias de incubação.

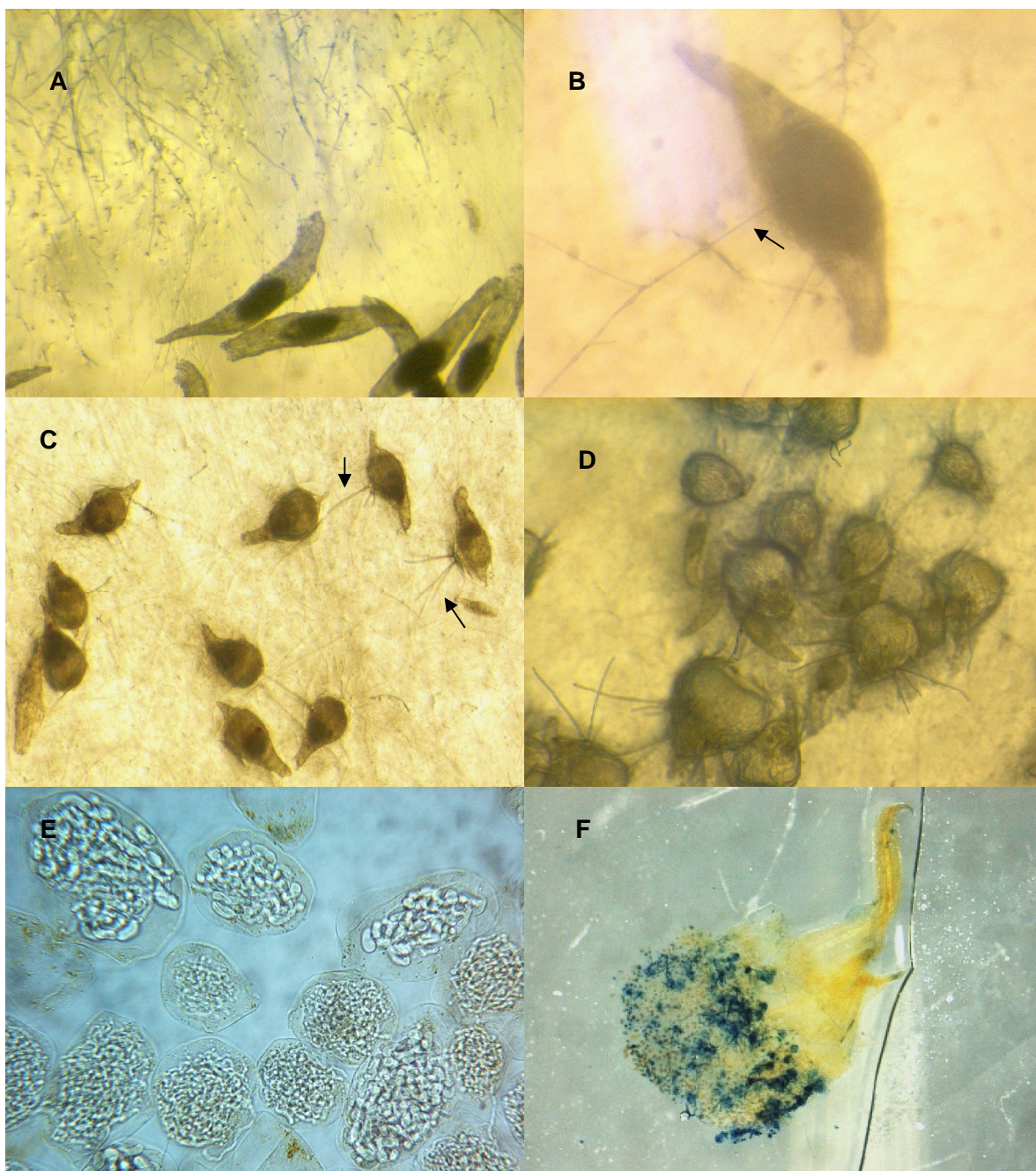


Figura 12 – A: Isolado RBSV25 e sementes de *Coppinsia doniana* após 2 dias de incubação. B: Entumescimento do embrião após 4 dias. C: Desenvolvimento do embrião e formação de rizóides (setas) após 10 dias. D: 19° dia do experimento, formação do primórdio foliar. E: Pélotons sob aumento de 400x. F: Protocórmio corado com Trypan Blue seguindo metodologia de Phillips e Hayman (1970), cor azul=estruturas do fungo



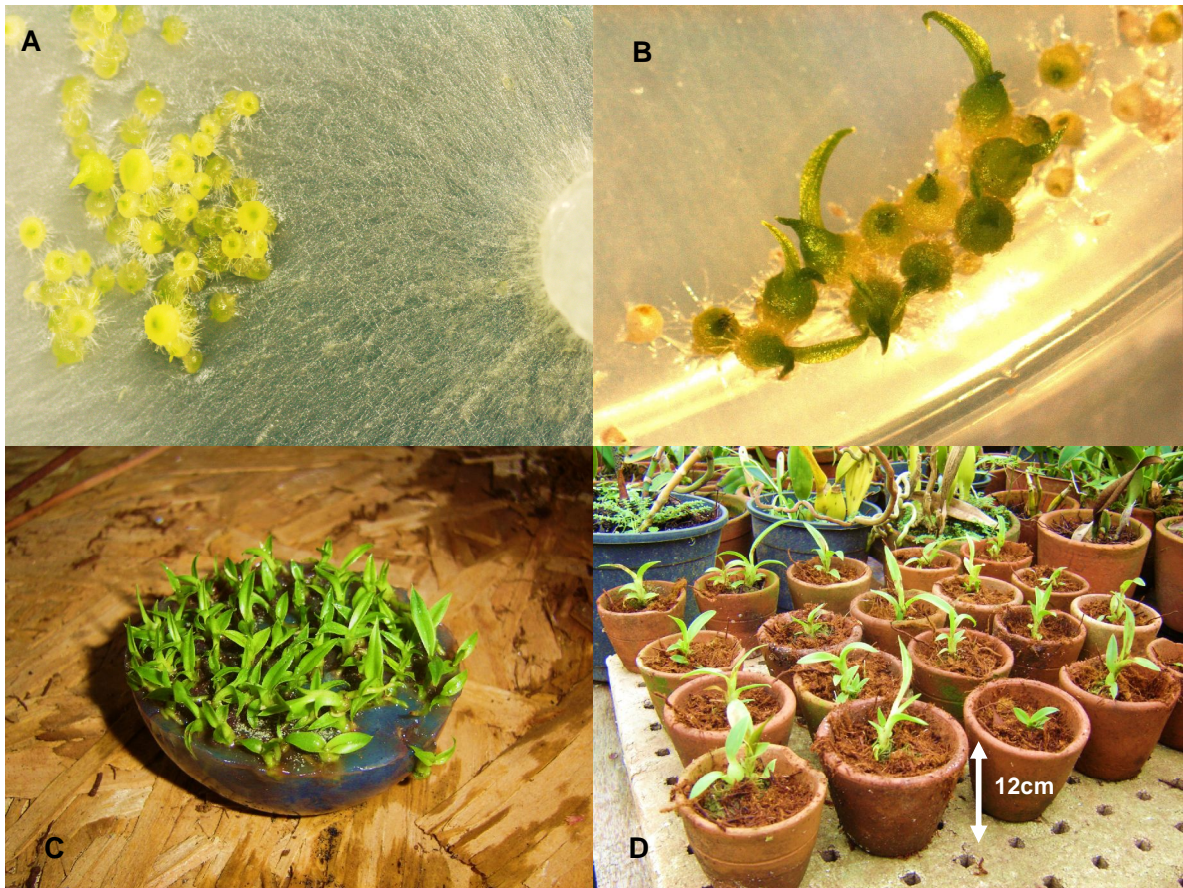


Figura 13 - A: 41 dias, aspecto da placa visualizada a olho nu (Foto: Carlos Marcelo Ribeiro). B: 91 dias, aspecto visualizado no microscópio estereoscópico sob aumento de 30x. C: 150 dias, plântulas de *C. doniana* cultivadas em potes de vidro com 1% de carvão ativado e D: 10 meses, cultivo das plântulas em vasos de cerâmica contendo *Sphagno* como substrato para as plantas

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento

A associação micorrízica é um sistema biológico compartimentalizado, formado a partir da interação entre solo, planta e fungo micorrízico (MOREIRA E SIQUEIRA;2006). Por este motivo, fatores que afetam a biologia do fungo, as condições fisiológicas da planta ou a fertilidade do solo influenciam a dinâmica da interação.

Em um ambiente estressante, pobre em nutrientes ou com falta de água em alguma época do ano, as plantas se beneficiam da associação micorrízica para suplementar a absorção de nutrientes e água (SMITH; READ, 1997). *Coppensia doniana* foi coletada em um ambiente muito erodível, sabidamente escasso em nutrientes e água, sob plena insolação durante todo o ano. As condições ambientais citadas associadas à alta colonização visualizada nos segmentos de raízes sugerem uma alta dependência micorrízica de *C. doniana*, ao menos naquele sítio amostrado, mesmo durante a fase adulta. Do outro lado, oncídíneas epífitas coletadas na Colômbia viviam em um ambiente muito menos hostil, com fácil acesso a água e nutrientes que escorrem pelo tronco das árvores. Na maioria das raízes dessas plantas foi muito mais difícil a visualização dos pélotons. Adicionalmente, orquídeas terrestres são usualmente consideradas mais dependentes do seu fungo micorrízico do que as epífitas. Plântulas terrestres de clima temperado se mantêm no solo por meses ou até anos, em condições de baixa luminosidade, enquanto plântulas epífitas, que têm acesso imediato a luz, podem começar o processo fotossintético logo nos primeiros estádios de desenvolvimento. Por outro lado, orquídeas terrestres tropicais usualmente têm contato com solos muito intemperizados e de baixa fertilidade (RASMUSSEN, 2005).

Comparando os métodos de isolamento utilizados no Brasil (a partir dos fragmentos de raízes colonizadas) e na Colômbia (sem visualização prévia da colonização), devemos destacar o alto sucesso no isolamento de fungos de *C. doniana*, no qual 131 isolados eram rizoctonióides dentre os 134 isolados totais obtidos. Por outro lado, a técnica de isolamento a partir da incubação de raízes desinfestadas, sem observação prévia dos pélotons, utilizada para as orquídeas estudadas na Colômbia,

permite o isolamento em fragmentos com pouca ou nenhuma colonização visível (OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002), entretanto, a proporção de fungos micorrízicos em relação ao total de endofíticos isolados é muito menor. Por isto, um passo importante no uso desta técnica é o reconhecimento das características de fungos rizoctonióides direto nas placas de isolamento (observando a posição dos septos e ramificações das hifas), que pode ser realizada com auxílio da microscopia óptica sob aumento de 400x.

Os métodos de isolamento a partir dos fragmentos de raízes privilegiam os fungos de crescimento rápido, podendo levar a um resultado precipitado do ponto de vista da diversidade de fungos existentes (Pereira, 2006). Fungos não cultiváveis podem ser acessados a partir da amplificação direta com *primers* específicos do DNA total de raízes das orquídeas (SELOSSE; RICHARD; SIMARD, 2006). A análise da região ITS dos clones destas bibliotecas genômicas é atualmente o método mais adequado para inferir a diversidade total de fungos micorrízicos e outros endofíticos associados a orquídeas.

## **5.2 Análises morfológicas e estatística multivariada**

Filogenia é o estudo das relações evolutivas entre vários grupos de organismos e, pode ser baseada em parâmetros moleculares ou matrizes de dados morfológicos (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967). Desde que Darwin demonstrou que todos os organismos compartilham um ancestral comum, a taxonomia tem tentado representar e refletir a história evolutiva dos organismos. O termo “clado” é amplamente empregado por filogeneticistas. Utilizado na taxonomia moderna, baseada na classificação dos organismos vivos e fósseis, o termo é utilizado para designar um grupo monofilético, definido como um grupo que compartilha um ancestral comum. Portanto o termo clado não existia e não se encaixa na rígida hierarquia do sistema de Linneu, baseada apenas nas similaridades morfológicas entre os organismos.

Com base na análise multivariada das características qualitativas (Figura 5, Tabela 6) e quantitativas (Figura 7, Tabela 7) das culturas, avaliadas por técnicas de agrupamento baseadas na distância generalizada de Mahalanobis, nas três primeiras

variáveis canônicas e na observação das características das culturas e das células monilióides dos isolados, foi possível detectar a diversidade de fungos rizoctonióides associados a *Coppensia doniana*. A análise de agrupamento (UPGMA) e a dispersão gráfica baseada nas três primeiras variáveis canônicas foram categóricas ao distinguir três clados de fungos associados a *C. doniana*. Estas técnicas têm por finalidade reunir genótipos em diferentes grupos, de forma que exista máxima homogeneidade dentro dos grupos e máxima heterogeneidade entre os grupos (CRUZ; REGAZZI, 1997; PEREIRA, 1999).

A análise multivariada tem sido utilizada em diversas áreas pois simplifica a compreensão dos dados, analisando múltiplos atributos de uma amostra simultaneamente (BARETTA; 2007). Assim, a necessidade da análise multivariada surge toda vez que o pesquisador tem mais que uma variável a ser analisada em um conjunto grande de indivíduos e necessita estudar simultaneamente suas relações (GAUCH, 1982 apud. BARETTA; 2007).

Os dados qualitativos da colônia (cor, aspecto, margem, zoneamento e micélio aéreo) se mostraram de grande valor para o agrupamento de fungos rizoctonióides com fase anamórfica em *Ceratorhiza*. Estes fungos, apesar de pertencerem ao mesmo gênero, apresentam significativas variações morfológicas na colônia, que podem facilmente ser detectadas visualmente (Figura 5). O agrupamento UPGMA destas características tem como finalidade sistematizar estas diferenças e é uma maneira de demonstrar estatisticamente o polimorfismo que podemos observar ao examinarmos as colônias.

Os dados quantitativos (taxas de crescimento e dimensões celulares) corroboraram as diferenças visuais e o principal parâmetro para diferenciar os isolados foram as dimensões das células monilióides. É interessante ressaltar que, nas análises quantitativas, houve uma tendência em agrupar os dois clados que possuem crescimento rápido. A compreensão plena dos dados se deu quando se analisaram em conjunto os dois gráficos (Figuras 5 e 6) e estas inferências foram comparadas com os resultados do sequenciamento da região ITS do rDNA dos fungos.

A identificação morfológica dos gêneros anamórficos *Ceratorhiza* e *Rhizoctonia*-uninucleada foi baseada principalmente no diâmetro das hifas vegetativas, na condição

nuclear e nas taxas de crescimento. Fungos destes gêneros possuem hifas vegetativas maiores que 4µm, são uni ou binucleados e possuem taxas de crescimento maiores em comparação aos micorrízicos do gênero *Epulorhiza* (CURRAH; ZELMER, 1992).

### 5.3 Condição nuclear: fungos rizoctonióide uninucleados x binucleados

Do ponto de vista molecular, *Rhizoctonia* uninucleada é considerada um grupo geneticamente homogêneo e distinto de *Rhizoctonia* binucleada (LILJA; HIETALA; KARJALAINEN, 1996; HIETALA; VAHALA; HANTULA, 2001). A condição uninucleada havia sido reportada em *Rhizoctonia quercus* (BURPEE; SANDERS; COLE, 1980) e em uma *Rhizoctonia* patogênica em trigo (HALL, 1986). Recentemente foi encontrada em fungos micorrízicos de orquídeas associados a oncídeas (OTERO; ACKERMAN, BAYMAN, 2002). Nossos resultados mostram que estes fungos, antes considerados raros, estão comumente associados a orquídeas em regiões tropicais, especialmente à da subtribo Oncidiinae.

Chama a atenção a identidade morfológica dos fungos do clado UNR (teleomorfo *Ceratobasidium bicornis* Erikss. & Ryv.) de *Coppensia doniana* com o isolado RBSV26, binucleado, obtido de *Gomezia crispa* (VALADARES et al., 2008), outra orquídea da subtribo Oncidiinae, isolada em um afloramento rochoso na região de Apiaí-SP. Otero (2002) encontrou fungos uni e binucleados pertencentes ao mesmo clado e, em um caso, o micélio de um único isolado possuía as duas condições nucleares. Isto sugere que alguns destes fungos podem transitar entre estas duas formas e parece estar relacionado com a taxa de crescimento dos fungos (OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002; HIETALA; KORHONEN; SEN, 2003), uma vez que as *Rhizoctonias* uninucleadas encontradas até hoje possuem crescimento mais rápido do que seus “estados” binucleados.

#### 5.4 Sequenciamento e análises filogenéticas moleculares

A identificação dos fungos associados a *C. doniana* em Campos do Jordão e *Ionopsis utricularioides* e *Psygmorchis pussila* na Colômbia como pertencentes ao gênero teleomórfico *Ceratobasidium* concorda com resultados de trabalhos anteriores. PEREIRA (2001) caracterizou morfologicamente um isolado pertencente ao gênero *Ceratorhiza*, associado a *Oncidium flexuosum* e outro, associado a *Gomezia crispa*. OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002, 2004, OTERO ET AL. 2007 identificou quatro clados de *Ceratobasidium* (A, B, C, D) associados a orquídeas da subtribo Oncidiinae. *Ceratobasidium spp.* também são conhecidos como patógenos de gramíneas e cereais (CURRAH; ZETTLER; MCINNIS, 1997; OTERO; ACKERMAN, BAYMAN, 2002) e têm sido reportadas como endófitos de orquídeas na Austrália, Estados Unidos, Canadá, Europa e Ásia (CURRAH; ZETTLER; McINNIS, 1997). *Ceratorhiza*, o gênero anamórfico de *Ceratobasidium* (CURRAH, 1991), é um dos endofíticos mais comuns em orquídeas de clima temperado e, nos últimos anos, tem sido também descrito em orquídeas tropicais.

Em *C. doniana*, os resultados do sequenciamento mostraram que os fungos mais proximamente relacionados aos existentes no *Genbank* atualmente são também simbioses de orquídeas, mas localizados em países distantes: O clado BNR1 tem como parente mais próximo (99%) um isolado da orquídea *Epipactis palustris* na Hungria e o clado UNR tem sua seqüência mais proximamente relacionada a um isolado de *Taeniophyllum aphyllum* do Japão (informações obtidas em contato direto com os autores das seqüências).

Já os isolados obtidos na Colômbia se dividiram também em três clados (Col01, Col02 e Col03), mas com padrões de distribuição dos grupos diferenciados para as oncidíneas amostradas. *Ionopsis utricularioides* se associa a apenas um clado de fungos, enquanto *Psygmorchis pussila* possui fungos representantes dos três clados. Estes resultados em muito se assemelham aos obtidos previamente em Porto Rico (OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002; 2004), onde *I. utricularioides* também se associava a apenas um clado de fungos, enquanto *Tolumnia variegata* se associava a três. Apesar do mesmo comportamento observado entre as oncidíneas dos dois países,

os clados de fungos obtidos na Colômbia são filogeneticamente distintos dos obtidos em Porto Rico.

As orquídeas variam em suas preferências pelos fungos micorrízicos (OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004; OTERO et al. 2007). Orquídeas bem distribuídas são generalistas em relação a associação micorrízica, ou se associam a um fungo igualmente bem distribuído (BASCOMPTE ET AL., 2003; VAZQUEZ AND AIZEN, 2003). Nossos resultados, portanto, confirmam as diferentes estratégias de associação dentro da subtribo Oncidiinae. Além das diferenças em nível de espécie de orquídea amostrada, o grau de especificidade da interação pode estar relacionado com o hábito de crescimento da planta, uma vez que o nível de dependência micorrízica é um dos fatores determinantes da especificidade (OTERO et al, 2007).

Analisando a árvore filogenética que inclui todos os isolados do gênero *Ceratobasidium* isolados de orquídeas da subtribo Oncidiinae até hoje, podemos notar que os clados de fungos obtidos na Colômbia e no Brasil são diferentes dos clados A,B,C,D estudados por Otero e seus colaboradores (2002, 2004, 2007), mesmo quando se trata de *I. utricularioides*, previamente amostrada nestes outros trabalhos. Adicionalmente podemos visualizar que o clado B é exclusivamente formado por fungos isolados em Porto Rico e na Costa Rica, sugerindo que este agrupamento está relacionado com sua localização na América Central. Isto reafirma a importância do isolamento de fungos locais para programas de germinação e reintrodução de espécies ameaçadas. Fungos e sementes adquiridos da mesma origem têm alta compatibilidade, como demonstrado no experimento de germinação de *C. doniana* discutido a seguir.

### **5.5 Germinação simbiótica de *Coppensia doniana***

Fungos compatíveis são aqueles capazes de induzir a germinação simbiótica das orquídeas e as levarem a estádios avançados de desenvolvimento da plântula (BATTY et al. 2001; BONNARDEAUX et al. 2007). Sementes de *C. doniana* germinaram com os três clados de fungos testados. A alta compatibilidade dos fungos com as sementes testadas pode ser explicada pelo fato de que os isolados são em sua totalidade oriundos de *C. doniana* em Campos do Jordão, uma vez que estes resultados não

foram reproduzidos quando os mesmos fungos foram testados com *Oncidium flexuosum* (dados não mostrados).

A habilidade de *C. doniana* em se beneficiar da associação com os três clados de fungos isolados pode explicar sua ampla distribuição no sítio amostrado. Rasmussen (2008) sugere que algumas orquídeas possuem nutrição micofágica, ou seja, atraem o fungo micorrízico e induzem a formação dos pélotons pelo desencadeamento dos mecanismos de defesa e, pela degradação dos pélotons obtém, além de macro, micronutrientes e água, carbono orgânico prontamente assimilável.

Fungos micorrízicos de orquídeas vêm sendo testados quanto à capacidade de induzir germinação de sementes de orquídeas *in vitro*, para fins de reintrodução de espécies ameaçadas de extinção em seu ambiente natural (ZETTLER, 1997; 1999; 2004; PEREIRA et al., 2003), multiplicação de espécies de interesse ornamental (ZETTLER; BURKHEAD; MARSHALL, 1999; WANG et al., 2000) e medicinal (CHANG; CHOU, 2001). Entretanto, a maioria destes trabalhos foi realizada com orquídeas de ambiente temperado, com exceção dos estudos de Otero (2005) e Pereira (2005). Nossos resultados mostraram o alto potencial dos isolados obtidos para a utilização na floricultura comercial e, principalmente, para a utilização em um programa de reintrodução de espécies ameaçadas em Campos do Jordão.

## 5.6 Considerações finais

Com base nos resultados dos estudos filogenéticos dos isolados associados a oncidíneas, devemos destacar a necessidade de dar continuidade a esta abordagem. Com um maior número de oncidíneas amostradas, de outras espécies e em diferentes locais, poderemos realizar mais inferências em relação à filogenia das espécies de *Ceratobasidium* associadas. Com os resultados que temos até o momento ainda não podemos explicar porque os clados do Brasil são diferentes dos da Colômbia e dos outros países da América Central estudados por Otero (2002, 2004, 2007). A próxima etapa de trabalho seria, portanto, entender se a distribuição destes fungos se dá pelo hábito de crescimento da planta (epífita x terrestres), pela espécie da planta ou pela região amostrada.



Também é interessante destacar os resultados obtidos com os testes de germinação. A otimização e a estabilidade deste sistema possibilitará estudos avançados da interação planta-fungo micorrízico em orquídeas, que é um campo ainda pouco explorado. Além disso, a utilização com sucesso de um fungo compatível, obtido da mesma planta ou pelo menos do mesmo local onde foram coletadas as sementes, pode ser usada como modelo para programas de reintrodução de orquídeas ameaçadas de extinção.

Existem inúmeras possibilidades e questionamentos em aberto quando tratamos de micorrizas de orquídeas, especialmente em ambiente tropical. Estudos fisiológicos com isótopos estáveis para visualizar as transferências de C e N nos diferentes estádios da interação e, estudos de expressão gênica com alvo nos genes de defesa e controle da infecção podem promover novas descobertas e criarem um novo olhar sobre os aspectos que regem esta interação.



## 6 CONCLUSÕES

Ao menos três clados de *Ceratobasidium* podem estabelecer interação micorrízica com *Coppensia doniana* em Campos do Jordão.

Fungos rizoctonióides uni e binucleados podem ser encontrados colonizando esta oncidínea, as vezes compartilhando a mesma planta.

Dados morfológicos qualitativos e quantitativos, quando analisados com ferramentas de estatística multivariada originam diferentes agrupamentos que são confirmados pelo sequenciamento da região ITS.

Os três clados de fungos obtidos de *Coppensia doniana* são capazes de promover a germinação simbiótica e levar as plântulas a estádios avançados de desenvolvimento, em curto período de tempo.

*Ionopsis utricularioides* se associa preferencialmente a um clado de fungos enquanto *Psygmorchis pussila* é capaz de interagir com três clados distintos, todos incluídos no gênero *Ceratobasidium*.

Os clados obtidos na Colômbia e no Brasil são diferentes dos previamente estudados para outras oncidíneas na América Central.



## REFERÊNCIAS

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***. Noordwykerhout : Kluwer Academic Publishers,1996. p. 379-390,

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

APARECIDO C. C., HUANG C. T. M., PASSADOR M. M., FINATTI D., FIGUEIREDO M. B. Avaliação da viabilidade de culturas fúngicas preservadas pelos métodos de castellani (água destilada) e liofilização. ***Biológico***, São Paulo, v.69, n.1, p.5-8, 2007.

ARDITTI, J. ***Fundamentals of orchid biology***. New York : John Wiley & Sons, 1992, 691 p.

ARDITTI, J.; GHANI, A.K.A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. ***New Phytologist***, Oxford, v.145, p.367-421, 2000.

BASCOMPTE, J.; P. JORDANO, C. J.; MELIAN ;J. OLESEN M.; The nested assembly of plant–animal mutualistic networks. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, Washington, v.100: 9383–9387, 2003.

BATTY A.L.; BRUNDRETT M.C.; DIXON K.W.;SIVASITHAMPARAM, K. In situ symbiotic seed germination and propagation of terrestrial orchid seedlings for establishment at field sites. ***Australian Journal of Botany***, Melbourne. v.54 p.375–381, 2006.

BATTY A. L., DIXON K. W.; BRUNDRETT M.C.; SIVASITHAMPARAM K. Long-term storage of mycorrhizal fungi and seed as a tool for the conservation of endangered Western Australian terrestrial orchids. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.49, p.619–628, 2001.

BONNARDEAUX, Y.; BRUNDRETT. M. C.; BATTY A.; DIXON K.; KOCH J.; SIVASITHAMPARAM K. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. **Mycological Research**, Cambridge, v.111 p. 51-61, 2007.

BRUNDRETT M. C.; Scientific approaches to Australian temperate terrestrial orchid conservation. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.55 p.293–307, 2007.

BURPEE, L. L.; SANDERS P. L.; SANDERS, H.; COLE, H.; SHERWOOD, R. T. Anastomosis groups among isolates of *Ceratobasidium cornigerum* and related fungi. **Mycologia**, Lawrence, v.72 p.689–701, 1980.

CAMERON, D. D.; LEAKE, J. R.; READ. D. J. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant– fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **New Phytologist**, Oxford, v.171 p.405–416, 2006.

CAMPOS, A.N.R. **Formação de basidiósporos no fungo ectomicorrízico *Pisolithus* sp.** 2004, 85p., Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004

CARLING D.E. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: SNEH, B.; JAJBAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G.(Ed.) ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control.** Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1996. p. 35-47.

CHANG, D. C. N. ; CHOU, L. C. Seed germination of *Haemaria discolor* var. *dawsoniana* and the use of mycorrhizae. **Symbiosis**, Rehovot, v.30 p. 29-40, 2001.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. Viçosa,G, Editora UFV, 394p, 1997.

CURRAH, R. S., SIGLER, L., HAMBLETON, S. New records and new taxa of fungi from the mycorrhiza of terrestrial orchids of alberta. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, V.65, P.2473-2482, 1987.

CURRAH, R.S; ZELMER, C.D. A key and notes for the genera of fungi with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. **Reports of the Tottori Mycological Institute**, Tottori, v.30, p.43-59, 1992.

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

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F.. **The families of the Monocotyledons**. New York, Verlag Springer, 1985.

DEARNELEY J. D. W., Further advances in orchid mycorrhizal research. **Mycorrhiza**, Berlin, v.17 p.475–486, 2007.

DIJK, E.; WILLWMS, J. H.; VAN ANDEL, J. Nutrient responses as a key factor to the ecology of orchid species. **Acta Botanica Neerlandica**, Oxford, v.46; p.339-363, 2007.

DIXON, K. Raising terrestrial orchids from seed. In: HARRIS, W.K., (Ed.) **Modern orchid growing for pleasure and profit**. Enfield : Orchid Club of South Australia ., 1987. p.47-100.

DRESSLER, R.L. **The orchids, natural history and classification**. Harvard:University Press. Harvard, 1981.

EDWARDS, A. W, F; L. L. CAVALLI-SFORZA. Reconstruction of evolutionary trees. V. H. HEYWOOD ; J. MCNEILL (Ed.). **Phenetic and phylogenetic classification**. London : Systematics Association, 1964, p.76-77.

GONZÁLEZ GARCÍA,V.; M.A. PORTAL ONCO,V; RUBIO SUSAN. Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia* **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 4, p.55-79, 2006.

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

HALL, G.. A species of *Rhizoctonia* with uninucleate hyphae isolated from roots of winter wheat. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.87 p. 466–471, 1986.

HIETALA A. M.; KORHONEN K.; SEN R. An unknown mechanism promotes somatic incompatibility in *Ceratobasidium bicorne*. **Mycologia**, Lawrence, v.95, p.239-250, 2003.

HIETALA, A. M.; J. VAHALA J.; HANTULA J. Molecular evidence suggests that *Ceratobasidium bicorne* has an anamorph known as a conifer pathogen. **Mycological Research**, Cambridge, v.105, p.555–562, 2001.



LILJA, A.; HIETALA A. M.; KARJALAINEN, R. Identification of a uninucleate *Rhizoctonia* sp. by pathogenicity, hyphal anastomosis and RAPD analysis. **Plant Pathology**, London, v.45 p.997–1006, 1996.

MANNING, J. C.; VAN STADEN, J. The development and mobilization of seed reserves in some African orchids. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, , v.35, p.343-353, 1987.

MCKENDRICK, S. L.; LEAKE, J. R.; TAYLOR, D. L.; READ, D .J. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp.. **New Phytologist**, Oxford, v.154, p.233-247, 2002.

MOORE, R.T. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. **Mycotaxon**, Ithaca, v.29, p.91-99, 1987.

MOREIRA, F. M .S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006, 729 p.

MORI, S.A. Eastern, extra Amazonian Brazil. In: D.G. CAMPBELL D. G.; HAMMOND H. D.: **Floristic inventory of tropical countries**: the status of plant systematic, collections, and vegetation, plus recommendations for the future. New York : The New York Botanical Garden, 1989 p. 427–454.

OTERO J. T.; FLANAGAN, N. S. Orchid diversity – beyond deception. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v.21 p. 64, 2006.

OTERO J. T.; ACKERMAN J. D.; BAYMAN P.; Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. **American Journal of Botany**, New York v.89, no.11 p.1852–1858, 2002.

\_\_\_\_\_ Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. **Molecular Ecology**, Malden, v.13, p.2393-2404.

\_\_\_\_\_ Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* *in vitro*: the potential for natural selection. **Evolutionary Ecology**, Dordrecht v.19, p.29-43, 2005.

OTERO, J. T., FLANANGAN, N. S., HERREN E. A., ACKERMAN, J. D., BAYMAN P. Widespread mycorrhizal specificity correlates do mycorrhizal function in the neotropical epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, New York v. 94 No. 12, 2007.

PEREIRA, M. C. **Diversidade e especificidade de fungos micorrízicos de orquídeas associados a *Epidendrum secundum* em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-MG.** 2006. 72p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

PEREIRA, O. L. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécies de orquídeas neotropicais.** 2001. 48p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; ROLLEMBERG, C. L.; BORGES, A. C. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Coppensia doniana flexuosum* por fungos micorrízicos rizoctonióides **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa-MG, v.29, p. 199-206, 2005.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M, C, M.; ROLLEMBER, C. L.; CHAER, G. M.; Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizotonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v.29 p.191-197, 2005.

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**, Tokyo, v.44 p.153-155, 2003.

PETERSON, R. L.; UETAKE, Y.; ZELMER, C. Fungal symbioses with orchid protocorms. **Symbiosis**, Revohot, v.25; p.29-55, 1998.

PETERSON, R.L., MASSICOTTE, H.B., MELVILLE, L.H. **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. Saint Paul : NRC Research Press, 2004. 173p.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transaction of the British Mycological Society**, Cambridge, v.55; p.158-161, 1970.

RASMUSSEN, H. N.. **Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant**. Cambridge, Cambridge University Press, 2005.

\_\_\_\_\_. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.244 p.149-163, 2002.

RASMUSSEN H. N.; RASMUSSEN F. N. **Orchid mycorrhiza**: implications of a mycophagous life style. doi: 10.1111/j.1600-0706.2008.17116.x, 2008.

ROBERTS P., **Rhizoctonia-forming fungi**: a taxonomic guide. Royal Botanical Gardens, Kew. 239 pp, 1999.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.4, p.406-425, 1987.

SELOSSE, M A.; WEI, J. M.; JANY L.;TILLER A. Communities and populations of sebacinoid Basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. **Molecular Ecology**, Malden v.11 p.1831–1844, 2002.

SELOSSE, M. A.; RICHARD, F.; SIMARD, S. W. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge. v.21 ,n.11,p. 621-628, 2006.

SHAN X. C. Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. **Mycologia**, Lawrence, v.94,p. 230–239, 2002.

SHARON, M.; KUNINAGA, S.; HYAKUMACHI, M.;NAITO, S; SNEH, B.; Classifi-  
cation of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic  
basis of the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, Tokyo, v.49 p.93–114,  
2008.

SHIMURA, H.; MATSUURA M.; TAKADA N.; KODA Y. An antifungal compound  
involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense*  
(Orchidaceae). **Phytochemistry**, Oxford, v.68 p.1442-1447, 2007.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**, Revohot 2.ed. San Diego : Academic Press, 1997, 605p,.

SNEH B.; BURPEE L.; OGOSHI A. (Ed)., **Identification of *Rhizoctonia* species**. Saint Paul : APS Press, 1991.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. New York : v.101 p.11030-11035, 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24 p.1596-1599, 2007.

TAYLOR, D.L.; BRUNS, T.D. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza macula* and *C. mertensiana*. **Molecular Ecology**, Malden, v.8, p.1719-1732, 1999.

TREMBLAY, R. L., J. D. ACKERMAN, J. K. ZIMMERMAN, AND R. N. CALVO. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. **Biological Journal of the Linnean Society**, London v.84 p.1–54, 2004.

UETAKE Y.; ISHIZAKA N., Cytochemical localization of adenylate cyclase activity in the symbiotic protocorms of *Spiranthes sinensis* **Mycological Research**, Cambridge, v. 100 No.1, p.105-112, 1996.

VALADARES, R. B. S.; PEREIRA, M. C.; KASUYA, M. C. M.; CARDOSO, E. J. B. N. **Isolamento e identificação de fungos micorrízicos de *gomeza* sp. (orchidaceae) em uma floresta de araucária do estado de são paulo.** In: XXVIII Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, XII Reunião Brasileira sobre Micorrizas, X Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, VII Reunião Brasileira de Biologia do Solo, FERTBIO 2008, 2008, Londrina. **Resumos...**Viçosa : SBCS, 2008, CDROM.

VAZQUEZ, D. P., AND M. A. AIZEN. 2003. Null model analyses of specialization in plant–pollinator interactions. **Ecology**, London, v.84 p.2493– 2501, 2003.

WARCUP, J. H. The mycorrhizal relationships of Australian orchids. **New Phytologist**, Oxford, v.87, p.371-381, 1981.

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

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

YODER, J. A.; ZETTLER, L. W.; STEWART, S. L. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedling, and evidence for water uptake by means of micotrophy. **Plant Science**, Amsterdan v.156; p.145-150, 2000.

ZELMER, C. D.; CURRAH, R. S. *Ceratorhiza pernacatena* and *Epulorhiza calendulina* spp. nov.: mycorrhizal fungi of terrestrial orchids. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.73, p. 1981-1985, 1995.

ZETTLER, L. W. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. **Selbyana**, Sarasota, No. 199 v.18, p.188-194, 1997.

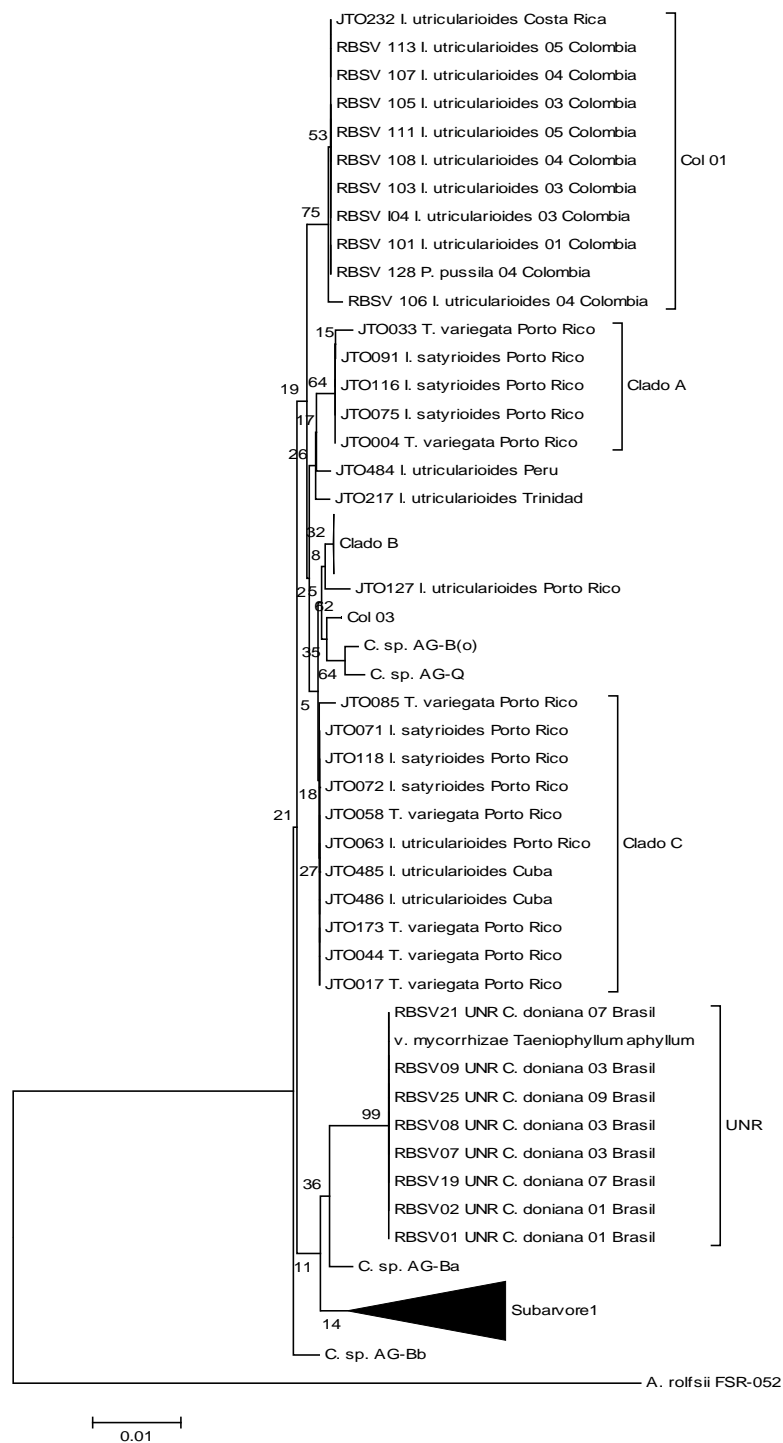
ZETTLER, L. W.; BURKHEAD, J. C.; MARSHALL, J. A. Use of a mycorrhizal fungus from *Epidendrum conopseum* to germinate seed of *Encyclia tampensis in vitro*. **Lindleyana**, West Palm Beach, v.14; p.102-105, 1999.



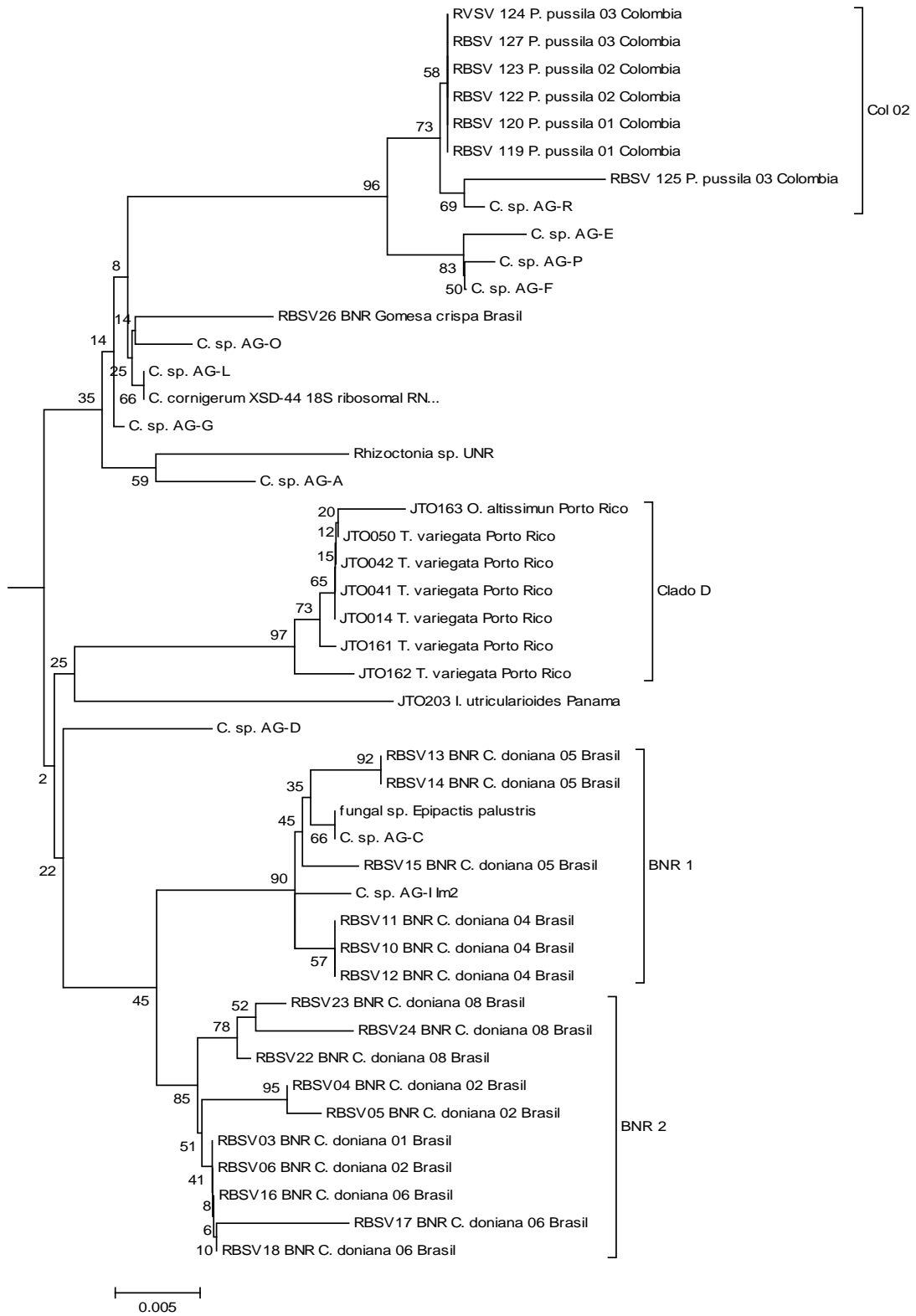


## **ANEXOS**





Anexo 1A - Árvore filogenética completa dos isolados associados a subtribo Oncidiinae na América Latina. Sub-árvore 1 e Clado B são mostrados nas figuras 13B e 13C respectivamente.



Anexo 1B: Sub árvore 1 expandida.



H  
0.00002

Anexo1: Clado B expandido.

Anexo 2 – Relação dos organismos utilizados para análises filogenéticas incluindo código de acesso no *genbank* e referências bibliográficas (continua)

Organismo	Código de acesso no Genbank	Referência
Fungal sp.	AM697947	não publicado
Vouchered mycorrhiza UD3-10	AB449197	não publicado
<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-C	AB290021	SHARON, 2008
<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-I	DQ102444	SHARON, 2008
<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-I	DQ102444	SHARON, 2008
<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-I	AB196650	SHARON, 2008
<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-D	AB198710	SHARON, 2008
<i>Rhizoctonia</i> UNR	AF200516	HIETALA; VAHALA; HANTULA, 2001
<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-G	DQ102399	SHARON et al, 2007
<i>Ceratobasidium</i> AG-L	AF354093	GONZALES et al, 2001
<i>Ceratobasidium</i> AG-O	AF354094	GONZALES et al, 2001
<i>Ceratobasidium</i> AG-A	DQ102424	SHARON et al, 2007
<i>Ceratobasidium</i> AG-Ba	AF354088	GONZALES et al, 2001
<i>Ceratobasidium</i> AG-B	AF354087	GONZALES et al, 2001
<i>Ceratobasidium</i> AG-B	DQ102431	SHARON et al, 2007
<i>Ceratobasidium</i> AG-Q	AF354095	GONZALES et al, 2001
<i>Ceratobasidium</i> AG-E	AB290019	SHARON et al, 2007
<i>Ceratobasidium</i> AG-P	AB286938	SHARON, 2008
<i>Ceratobasidium</i> AG-F	DQ102435	SHARON, 2008
<i>Ceratobasidium</i> AG-R	DQ 885780	não publicado
<i>Athelia</i> rolfsii	AY684917	não publicado
<i>Nodulisporium</i> sp.	AF201756	POLISHOOK et al, 2001
<i>Ceratobasidium</i> AG-7	AF354084	GONZALES et al, 2001
Fungal endophyte ECD-2008	EU686056	DAVIS; SHAW, 2008
<i>Rhizoctonia</i> sp. Moam	AJ318431	MA, 2001
Epulorrhiza H2a	AJ313457	MA; TAN; WONG, 2003
<i>Tulasnella</i> sp. 175	AY373304	MCCORNICK; WHIGHAM; O'NEIL, 2004
<i>Ceratobasidium</i> CO3	DQ279022	não publicado
<i>Curvularia</i> affinis	GQ352986	não publicado
<i>Thanatephorum</i> cucumeris	GQ996576	não publicado
JTO004	AF472279	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO075	AF472291	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO116	AF472299	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO091	AF472295	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO064	AF472288	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO076	AF472292	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO010	AF472280	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO093	AF472281	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO024	AF472281	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO032	AF472282	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO057	AF472286	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO078	AF472293	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO043	AF472283	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO047	AF472284	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO002	AF472278	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO071	AF472289	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002

Anexo 2 – Relação dos organismos utilizados para análises filogenéticas incluindo código de acesso no *genbank* e referências bibliográficas **(continuação)**

JTO124	AF472301	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO115	AF472298	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO115	AF472298	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO072	AF472290	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO085	AF472294	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO058	AF472287	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2002
JTO089	AF503980	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO126	AF503984	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO128	AF503986	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO134	AF503991	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO135	AF503992	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO138	AF503993	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO141	AF503994	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO142	AF503995	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO144	AF503997	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO145	AF503998	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO147	AF503999	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO148	AF504000	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO149	AF504002	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO153	AF504001	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO161	AF504008	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO162	AF472302	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO171	AF504009	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO173	AF504010	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO 044	AF503975	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO017	AF503963	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO014	AF503960	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO041	AF503973	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO042	AF503974	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO049	AF503976	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO050	AF503977	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO161	AF504008	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO060	AF503978	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO063	AF503979	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO092	AF503981	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO112	AF503982	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO127	AF503985	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO131	AF503988	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO132	AF503989	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO133	AF503990	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO135	AF503992	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO158	AF504003	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO160	AF504007	OTERO; ACKERMAN; BAYMAN, 2004
JTO201	DQ083999	OTERO et al, 2007
JTO203	DQ084001	OTERO et al, 2007
JTO209	DQ084003	OTERO et al, 2007
JTO212	DQ084004	OTERO et al, 2007

Anexo 2 – Relação dos organismos utilizados para análises filogenéticas incluindo código de acesso no *genbank* e referências bibliográficas

**(conclusão)**

JTO217	DQ084007	OTERO et al, 2007
JTO218	DQ084006	OTERO et al, 2007
JTO219	DQ084008	OTERO et al, 2007
JTO222	DQ084009	OTERO et al, 2007
JTO226	DQ084010	OTERO et al, 2007
JTO230	DQ084011	OTERO et al, 2007
JTO231	DQ084012	OTERO et al, 2007
JTO232	DQ084013	OTERO et al, 2007
JTO235	DQ084014	OTERO et al, 2007
JTO236	DQ084015	OTERO et al, 2007
JTO484	DQ084016	OTERO et al, 2007
JTO485	DQ084017	OTERO et al, 2007
JTO486	DQ084018	OTERO et al, 2007
JTO487	DQ084019	OTERO et al, 2007

---



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)