

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS *Epulorhiza* spp. ISOLADOS DE *Epidendrum secundum* (ORCHIDACEAE)⁽¹⁾

Marlon Corrêa Pereira⁽²⁾, Olinto Liparini Pereira⁽³⁾, Maurício Dutra Costa⁽⁴⁾,
Rodrigo Barros Rocha⁽⁵⁾ & Maria Catarina Megumi Kasuya⁽⁴⁾

RESUMO

Fungos micorrízicos rizoctonioides *Epulorhiza* spp. têm sido isolados de orquídeas do gênero *Epidendrum* e vêm sendo utilizados na germinação simbiótica das sementes de orquídeas. *Epidendrum secundum* é uma orquídea largamente distribuída em campos de altitude do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), Minas Gerais, e pouco se sabe sobre a associação micorrízica dessa espécie nesse parque. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade morfológica dos fungos micorrízicos rizoctonioides isolados de quatro populações de *E. secundum* em três regiões de um campo de altitude localizado na subserra Totem Deitado, PESB. Vinte e seis isolados fúngicos foram obtidos, todos pertencentes ao gênero *Epulorhiza*. As características morfológicas qualitativas e quantitativas avaliadas revelaram, de modo geral, baixa variabilidade entre os isolados obtidos de uma mesma população e de populações localizadas na mesma região, porém grande variabilidade foi observada entre os isolados obtidos das populações de diferentes regiões. Com base nessas características morfológicas, os isolados foram divididos em quatro grupos: o primeiro constituído pelos fungos obtidos das populações I e II da região A, o segundo pelos fungos da população III da região B, o terceiro pelo isolado M61 da população II da região A, e o quarto pelo único isolado obtido na população IV da região C. A variabilidade morfológica observada é um indicativo da diversidade dos fungos *Epulorhiza* spp. associados a *E. secundum* no PESB.

Termos de indexação: biodiversidade, conservação, fungos rizoctonioides, orquídea, simbiose.

⁽¹⁾ Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa – UFV. Trabalho financiado pela FAPEMIG e CNPq. Recebido para publicação em junho de 2007 e aprovado em junho de 2009.

⁽²⁾ Professor do Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba. BR 354, Km 310, Caixa Postal 22, CEP 38810-000 Rio Paranaíba (MG). E-mail: marlon.pereira@ufv.br

⁽³⁾ Professor do Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa – UFV. Av PH Rolfs s/n, CEP 36570-000 Viçosa (MG). E-mail: oliparini@yahoo.com.br

⁽⁴⁾ Professores do Departamento de Microbiologia, UFV. E-mails: mdcosta@ufv.br; mkasuya@ufv.br

⁽⁵⁾ Pesquisador da Embrapa Rondônia. BR 364, Km 5,5, Caixa Postal 406, CEP 78900-970 Porto Velho (RO). E-mail: rodrigo@cpafro.embrapa.br

SUMMARY: *DIVERSITY OF MYCORRHIZAL FUNGI* *Epulorhiza* spp.
ISOLATED FROM *Epidendrum secundum* (ORCHIDACEAE)

Rhizoctonia-like mycorrhizal fungi *Epulorhiza* spp. have been isolated from orchids of the genus *Epidendrum* and have been used to promote the symbiotic germination of orchid seeds. *Epidendrum secundum* is a widely distributed orchid in campo de altitude (high elevation grassy vegetation) regions of the State Park of Serra do Brigadeiro (PESB), Minas Gerais, Brazil, and little is known about the mycorrhizal relationships of this species in the park. The objective of this study was to evaluate the morphological diversity of Rhizoctonia-like mycorrhizal fungi isolated from four *E. secundum* populations growing in three regions of a campo de altitude, in the region of Totem Deitado Mountain, PESB. Twenty-six fungal isolates were obtained, all belonging to *Epulorhiza*. The quantitative and qualitative morphological characteristics revealed, in general, low variability among the fungi isolated from the same orchid population and among isolates from the same region, but high variability among the fungi isolated from the populations from different regions. Based on these morphological characteristics, the isolates were separated into four groups. The first consisted of the fungi from populations I and II from region A, the second of isolates from population III from region B, the third of isolate M61 from population II from region C, and the fourth of a single isolate obtained from population IV from region C. The morphological variability observed indicates the existence of diversity of *Epulorhiza* spp. associated with *E. secundum* in PESB.

Index terms: biodiversity, conservation, Rhizoctonia-like fungi, orchid, symbiosis.

INTRODUÇÃO

A maioria das orquídeas apresenta associação simbiótica com fungos rizoctonioides na natureza (Currah & Zelmer, 1992; Rasmussen, 1995; Andersen & Rasmussen, 1996; Pereira et al., 2005a). Esses basidiomicetos dificilmente formam estruturas reprodutivas sexuais, sendo utilizadas características vegetativas morfológicas (construção da hifa na região do septo, ramificação logo após o septo em ângulo reto, condição nuclear, formação de células de resistência espessadas – células monilíoides – e forma do septo dolipórico) para classificá-los em gêneros anamórficos (Currah & Zelmer, 1992; Stalpers & Andersen, 1996; Taylor et al., 2002; Pereira et al., 2003). Fungos micorrízicos pertencentes aos três principais gêneros anamórficos de fungos micorrízicos de orquídea, *Ceratorhiza*, *Rhizoctonia* e *Epulorhiza*, já foram isolados de orquídeas brasileiras encontradas em fragmentos de Mata Atlântica, como fragmentos pertencentes ao Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), e em Campo Rupestre (Pereira et al., 2003, 2005a,b; Nogueira et al., 2005).

Apenas fungos micorrízicos rizoctonioides *Epulorhiza* spp. têm sido isolados de orquídeas do gênero *Epidendrum* e da espécie *E. secundum* em seus ambientes naturais, e fungos desse gênero têm induzido a germinação simbiótica de sementes de orquídeas *in vitro* (Zettler et al., 1998; Nogueira et al., 2005; Pereira et al., 2005a; Linhares, 2006; Zettler et al., 2007). Esses fungos são os principais simbiontes de orquídeas terrestres, entretanto também têm sido isolados de orquídeas epífitas (Currah & Zelmer, 1992;

Currah et al., 1997; Pereira et al., 2003, 2005a). Eles são estritamente saprófitas, largamente distribuídos na natureza, essenciais à realização do ciclo de vida dessas orquídeas e atuam como via de transporte de nutrientes entre a orquídea e o substrato (Currah & Zelmer, 1992; Smith & Read, 1997; Rasmussen, 2002; Peterson et al., 2004). A partir da degradação dos *pelotons*, ou seja, envelados de hifas fúngicas formadas nas células colonizadas, a semente da orquídea obtém água, carboidratos simples e minerais para sua germinação e desenvolvimento do embrião à plântula fotossinteticamente ativa, e essa plântula obtém, principalmente, água e os minerais requeridos para sua manutenção e desenvolvimento (Rasmussen, 1995; Peterson et al., 1998, 2004; Dearlaney, 2007).

Os fungos do gênero *Epulorhiza* podem ser diferenciados daqueles pertencentes aos gêneros *Ceratorhiza* e *Rhizoctonia* com base no aspecto da colônia, número de núcleos e diâmetro da hifa vegetativa (Currah & Zelmer, 1992). Os fungos pertencentes ao gênero *Epulorhiza* apresentam colônia de coloração creme, crescimento lento, com margem da colônia submersa no meio, micélio aéreo escasso e aspecto mucoso (Currah et al., 1997; Currah & Zelmer, 1992). O diâmetro da hifa da maioria dos fungos *Epulorhiza* spp. é menor que 4 µm e apresenta septo dolipórico com parateossoma imperfurado (Moore, 1987; Currah et al., 1997; Currah & Zelmer, 1992; Pereira et al., 2003). Os fungos *Ceratorhiza* spp. também são binucleados, mas apresentam micélio aéreo abundante e diâmetro de hifa vegetativa maior que 4 µm (Currah & Zelmer, 1992). Os fungos *Rhizoctonia* spp. são multinucleados, com micélio

aéreo abundante (Currah & Zelmer, 1992). *Ceratorhiza* spp. e *Rhizoctonia* spp. apresentam perfurações no parateossoma do septo (Moore, 1987). Durante a caracterização dos fungos rizoctonioides, é gerado um conjunto de dados quantitativos e qualitativos úteis na identificação dos isolados (Currah & Zelmer, 1992; Currah et al., 1997). As características culturais, que são dados qualitativos, podem ser utilizadas para agrupar isolados utilizando técnicas multivariadas (Pereira et al., 2005a). As características morfológicas, tais como taxa de crescimento, diâmetro da colônia, dimensão das células monilioides e diâmetro de hifa, geram dados quantitativos que também podem ser analisados por técnicas multivariadas revelando a existência, ou não, da diversidade desses fungos (Cruz, 2008).

Epidendrum secundum Jacq. está compreendida na subfamília Epidendroideae, tribo Epidendreae, subtribo Laellinae (van den Berg et al., 2000, 2005). É uma espécie de orquídea de hábito terrestre e, ou, rupícola, comum em campos graminóides e em afloramentos rochosos dos campos de altitude da Serra das Cabeças, que está localizada no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), MG (Caiafa & Silva, 2005). Essa orquídea apresenta floração durante todo o ano, o que, além de facilitar sua identificação no campo, a torna uma espécie de grande aplicação na horticultura comercial. Porém, não há trabalhos sobre a diversidade morfológica dos fungos micorrízicos associados a essa espécie de orquídea. Desse modo, os objetivos deste trabalho foram isolar e caracterizar fungos micorrízicos rizoctonioides associados a quatro populações de *E. secundum* crescendo em três diferentes regiões da subserra Totem Deitado, localizada na Serra das Cabeças, e avaliar a diversidade de fungos associados a essas populações com base na análise multivariada das características culturais e morfológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem do sistema radicular de orquídeas e do solo dos diferentes locais

Quatro populações de *E. secundum* foram selecionadas em três diferentes regiões de um campo de altitude localizado na Serra das Cabeças, subserra

Totem Deitado, pertencente ao Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, cidade de Araponga, MG (Quadro 1). Em agosto de 2005 (Licença Instituto Estadual de Floresta 050/05), dez segmentos de raiz foram coletados de um indivíduo de cada uma das populações selecionadas, que apresentava inflorescência e cápsula madura. As raízes foram armazenadas separadamente em sacos plásticos, acomodados em bolsa térmica contendo gelo. Uma amostra composta de solo, compreendida de dez amostras simples obtidas com auxílio de um trado de 160 cm³, foi coletada do local de cada uma das populações para posterior análise físico-química. As amostras de solo foram armazenadas em caixa de isopor contendo gelo triturado. As amostras do sistema radicular foram armazenadas em geladeira a 4 °C até o processamento. As amostras do solo foram secas ao ar, passadas em peneira de 2 mm e enviadas ao Laboratório de Análise de Solos do Departamento de Solos da UFV para a realização das análises físicas e químicas.

Isolamento dos fungos micorrízicos

Os segmentos de raiz foram cuidadosamente lavados sob água corrente e cortadas em três a cinco fragmentos de, aproximadamente, 8 cm cada. Esses fragmentos foram desinfestados superficialmente, como descrito por Pereira et al. (2005a), e seccionados transversalmente sob lupa, de forma asséptica, para confirmação da colonização pela observação de pelotons e isolamento dos fungos micorrízicos. A partir dos fragmentos colonizados, foram selecionados de quatro a oito secções transversais e a porção do córtex contendo pelotons intactos foi rasgada e transferida para placa de Petri contendo 15 mL de meio BDA (15 g de ágar, 15 g de glicose e 1 L de caldo de batata, pH 5,6). Foram transferidas para uma mesma placa contendo o meio de isolamento de quatro a oito porções de córtex de um mesmo fragmento de raiz, tendo sido selecionados três fragmentos colonizados por população. As placas foram incubadas a 28 °C, sendo monitoradas diariamente para observação do crescimento de micélio fúngico. Após início do crescimento, extremidades do micélio foram transferidas para novas placas de Petri contendo meio BDA.

Caracterização cultural e morfológica

Os fungos foram caracterizados morfolologicamente

Quadro 1. Altitude, coordenadas geográficas e características do habitat das populações de *Epidendrum secundum* amostradas em cada uma das regiões selecionadas

População	Região	Altitude	Coordenadas geográficas	Característica
I	A	1.706 m	S 20° 42' 11,1" / W 42° 28' 32,0"	Campo graminóide próximo a afloramento rochoso
II	A	1.705 m	S 20° 42' 10,8" / W 42° 28' 31,8"	
III	B	1.692 m	S 20° 42' 6,5" / W 42° 28' 30,1"	Campo graminóide próximo a escrube
IV	C	1.581 m	S 20° 42' 22,3" / W 42° 28' 45,1"	Campo graminóide em afloramento rochoso

pela avaliação de características qualitativas (micélio aéreo, margem, aspecto, cor da colônia e número de núcleo por célula) e quantitativas (diâmetro da colônia, taxa de crescimento, largura e comprimento das células monilíoides e diâmetro de hifa) da colônia.

Para a avaliação do micélio aéreo, da margem, do aspecto e da cor da colônia, utilizando-se colônias crescidas em placas de Petri contendo 15 mL de meio BDA, incubadas a 25 °C (Currah & Zelmer, 1992; Pereira et al., 2005a). As características foram avaliadas visualmente após 72 e 336 h, segundo descrito por Currah & Zelmer (1992) e Pereira et al. (2005a).

O diâmetro da colônia (DC) de cada isolado foi avaliado em três placas de Petri contendo 15 mL de meio BDA. Discos de ágar de 9 mm de diâmetro, contendo micélio fúngico da borda da colônia crescida em BDA, foram transferidos para o centro de três placas de Petri contendo 10 mL de meio e incubadas a 25 °C. Após 72 h, mediu-se o diâmetro da colônia, em cm, sobre duas linhas perpendiculares traçadas no verso das placas, tomando-se o disco de ágar contendo o inóculo como centro da interseção.

A taxa de crescimento em meio BDA (Merck®; TBDA) e a taxa de crescimento em meio CMA (15 g ágar e 1 L de caldo obtido do cozimento de 30 g de farelo de milho; TCMA) foram determinadas em placas de Petri. Discos de ágar de 9 mm de diâmetro, contendo micélio fúngico da borda da colônia crescida em BDA, foram transferidos para o centro de três placas de Petri contendo 10 mL de meio, as quais foram incubadas a 28 °C. A taxa de crescimento, em mm h⁻¹, foi determinada com base na variação do raio da colônia, em, pelo menos, três intervalos de tempo, durante um período de 10 dias. Para isso, duas linhas perpendiculares foram traçadas no verso da placa, utilizando o disco de ágar como o centro da interseção das linhas.

As células monilíoides foram observadas em culturas crescidas em meio CMA, com pelo menos dois meses de incubação, e fotografadas em microscópio invertido acoplado à câmera digital (Olympus E300), sendo as imagens capturadas utilizadas para determinar a largura (LCM) e o comprimento (CCM) da célula monilíode, utilizando o programa Image Pro Plus (versão 4.5.0.29).

Para a medição do diâmetro da hifa vegetativa (DH) e observação do número de núcleos por célula (condição nuclear), um disco de ágar de 9 mm de diâmetro, contendo o micélio fúngico dos isolados crescidos em meio BDA, foi transferido para lâminas microscópicas contendo gotas de 50 µL de meio BDA. Após uma semana, o micélio crescido sobre a lâmina foi tratado com uma mistura de SYBR GREEN I® e Calcofluor e observado em microscópio de fluorescência (Meinhardt et al., 2001; Campos et al., 2006). A condição nuclear foi observada sob a fluorescência e o diâmetro de hifa foi observado sob a luz branca. As imagens posteriormente

capturadas foram utilizadas para medição do diâmetro de hifa no programa Image Pro Plus (versão 4.5.0.29).

Identificação dos isolados fúngicos

Os isolados fúngicos foram identificados usando a chave dicotômica para gênero de fungos micorrízicos associados a orquídeas (Currah & Zelmer, 1992) e chave para espécies do gênero *Epulorhiza* (Currah et al., 1997).

Análise dos dados

Os dados das características morfológicas quantitativas foram submetidos à análise de variância e à comparação de médias pelo teste de Scott Knott a 5 %, utilizando-se o programa SAEG, versão 9.0. A diversidade genética dos isolados foi estudada por duas técnicas de análise multivariada executadas no programa GENES (versão 2006.4.1), sendo a primeira técnica baseada na distância generalizada de Mahalanobis (Cruz & Regazzi, 1997), utilizando o método UPGMA (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Averages) para realizar o agrupamento, e a segunda baseada nas duas primeiras variáveis canônicas, utilizando a dispersão gráfica.

Os dados das características físicas e químicas dos solos foram submetidos a duas técnicas de análise multivariada para agrupamento dos locais, também executadas no programa GENES (versão 2006.4.1). A matriz de distância euclidiana padronizada (D²) foi calculada como medida de dissimilaridade e utilizada para agrupamento dos locais pelo método UPGMA. A técnica de componentes principais foi utilizada para realizar a dispersão gráfica em 3D dos locais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelotons intactos e degradados foram observados nas raízes de *E. secundum* durante o procedimento de isolamento dos fungos micorrízicos. Um total de 44 fungos foi isolado das quatro populações de *E. secundum* amostradas. Foram isolados 11 fungos da população I, 7 da II, 12 da III e 14 da IV. Por serem os principais fungos micorrízicos de orquídeas, este trabalho objetivou caracterizar morfológicamente somente os 26 isolados que apresentaram as características de fungos rizoctonioides (Figura 1), ou seja, constrição da hifa vegetativa na região do septo, ramificação após o septo em ângulo reto e formação de células monilíoides (Currah & Zelmer, 1992; Rasmussen, 1995; Andersen & Rasmussen, 1996; Stalpers & Andersen, 1996; Roberts, 1999; Taylor et al., 2002). Esses fungos rizoctonioides foram obtidos de oito dos 12 fragmentos utilizados durante o isolamento (Quadro 2). A partir dos demais cresceram fungos não rizoctonioides, os quais foram armazenados para estudos posteriores, ou não houve crescimento de micélio fúngico.

Todos os fungos rizotonioides isolados apresentaram colônias de coloração creme, aspecto aveludado, liso ou cotonoso, dois núcleos por hifa (Figura 1a) e DH menor que 4 μm (Quadro 2). Desse modo, os isolados foram identificados como pertencentes ao gênero anamórfico *Epulorhiza* (Currah & Zelmer, 1992;

Currah et al., 1997; Pereira et al., 2005a). Os isolados M51 a M67, respectivamente da população I e II, e o isolado M76 (população IV) apresentaram aspecto aveludado, enquanto os isolados M68 a M75 (população III) apresentaram aspecto cotonoso. Entre os isolados de aspecto aveludado, foram observadas diferenças na

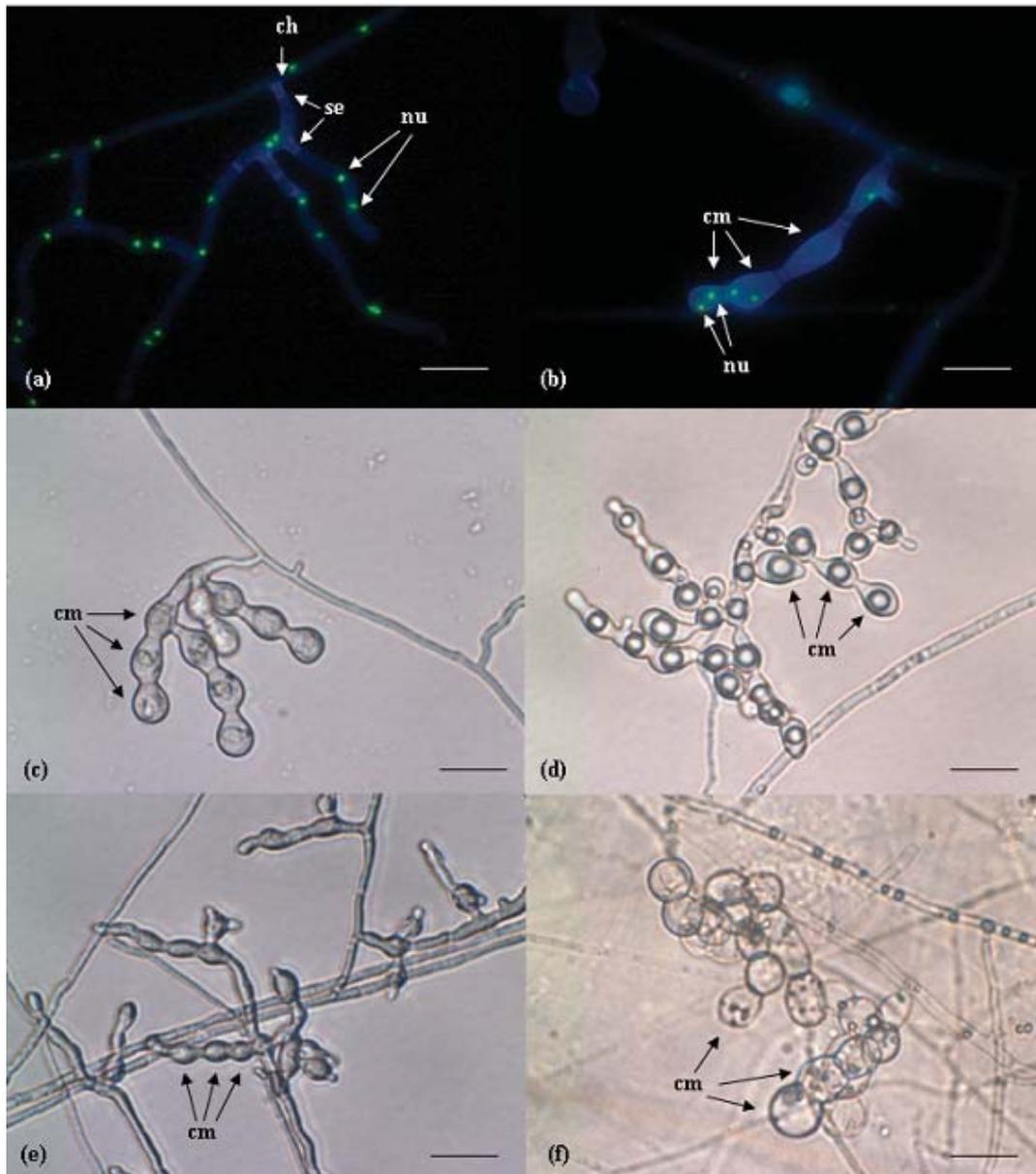


Figura 1. Hifas vegetativas e células monilioides de fungos rizotonioides, isolados de *Epidendrum secundum* em quatro diferentes localidades, cultivados durante uma semana em microcultura para posterior tratamento com os cromóforos SYBER GREEN I® e Calcofluor e observação em microscopia de fluorescência (a-b). Células monilioides, observadas em microscopia de luz, formadas pelos isolados após, pelo menos, dois meses de cultivo em placas contendo meio CMA (c-f). (a) Isolado M55, mostrando ramificação da hifa em ângulo reto com constrição (ch) na altura dos septos (se), dois núcleos (nu) na célula da extremidade da hifa e delimitados pelos septos. (b) Células monilioides (cm) do isolado M66 apresentando dois núcleos por célula. Células monilioides dos isolados: (c) M53, ovaladas com depressões formando cadeias com duas a seis células; (d) M61, pequenas, hialinas e desuniformes ao longo da cadeia; (e) M70, pequenas, em cadeias de uma a oito células, opacas, com leve constrição entre as células; e (f) M76, grandes, esféricas e em cadeias de duas a quatro células. Barra = 20 μm .

Quadro 2. Diâmetro da colônia (DC), taxa de crescimento em meio BDA (TBDA) e em meio CMA (TCMA); largura (LCM) e comprimento (CCM) de células monilíoides e diâmetro de hifas (DH) dos fungos micorrízicos rizoctoníoides isolados de diferentes fragmentos de raiz de quatro populações de *Epidendrum secundum*. DC foi avaliado em meio BDA 48 h após a inoculação, TBDA e TCMA foram determinadas com base na variação do raio da colônia em, pelo menos, três intervalos de tempo durante um período de 10 dias, LCM e CCM foram avaliadas após cultivo dos isolados em meio CMA por, pelo menos, dois meses, e DH foi determinado em micélio crescido em microcultura durante uma semana

População ⁽¹⁾	Fragmento ⁽¹⁾	Isolado ⁽¹⁾	DC	TBDA	TCMA	LCM	CCM	DH
			cm	mm h ⁻¹		µm		
I	II	M51	2,97 D	0,178B	0,350D	13,56B	16,20B	3,09B
		M52	3,78 B	0,169C	0,418A	12,10C	16,27B	3,07B
	II	M53	3,12D	0,180B	0,401A	11,93C	16,17B	4,00A
		M54	3,52B	0,184B	0,388B	12,28C	15,47C	3,77A
	II	M55	3,77B	0,164C	0,363C	11,94C	15,28C	3,15B
		M56	3,18C	0,199A	0,370C	11,47C	16,62B	3,75A
	III	M57	3,25C	0,199A	0,399A	12,94B	14,97C	3,78A
		M58	3,57B	0,209A	0,380B	12,22C	15,36C	3,25B
	III	M59	2,68E	0,138D	0,375C	12,72B	15,49C	3,85A
		M60	3,68B	0,205A	0,382B	13,07B	14,55C	3,90A
II	II	M61	1,85G	0,033F	0,121F	9,85D	13,11D	2,28B
		M62	3,27C	0,134D	0,349D	12,81B	17,87A	2,97B
	II	M63	3,37C	0,095E	0,351D	12,38C	16,21B	4,07A
		M64	3,88A	0,185B	0,373C	13,06B	18,19A	2,80B
	III	M65	3,90A	0,164C	0,387B	12,49C	17,59A	2,68B
		M66	3,43C	0,161C	0,385B	11,78C	17,53A	3,80A
	III	M67	4,10A	0,180B	0,372C	13,60B	18,93A	3,21B
III		I	M68	1,87G	0,066F	0,163E	7,69E	19,50A
	M69		2,08F	0,056F	0,181E	8,66D	12,29D	3,62A
	I	M70	2,17F	0,061F	0,187E	7,39E	11,90D	2,84B
		M71	1,78G	0,049F	0,165E	9,44D	14,41C	2,81B
	I	M72	1,72G	0,057F	0,174E	9,13D	14,79C	3,67A
		M73	2,02F	0,077E	0,165E	8,81D	13,81D	3,38A
	II	M74	2,17F	0,058F	0,169E	9,05D	13,85D	3,55A
		M75	1,73G	0,055F	0,182E	10,12D	12,97D	3,64A
IV	II	M76	2,97D	0,175B	0,380B	16,22A	17,02B	3,21B
CV (%)			5,20	11,29	4,60	6,92	8,72	10,60

⁽¹⁾ Código das populações amostradas, dos fragmentos de onde os isolados foram obtidos e dos isolados. ⁽²⁾ CV: coeficiente de variação. Média de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5%.

morfologia das células monilíoides. O isolado M61 (população II) apresentou células monilíoides de tamanho muito reduzido, hialinas e desuniformes ao longo da cadeia (Figura 1d). As células monilíoides do isolado M76 (população IV) eram maiores, esféricas, em cadeias de duas a quatro células (Figura 1f). Os demais isolados da população I e II, exceto M61, apresentaram células monilíoides mais ovaladas, com depressões, formando cadeias com duas a seis células, individualizadas claramente por uma constricção bem acentuada na região do septo (Figura 1c). Os isolados de aspecto cotonoso da população III apresentaram células monilíoides pequenas, opacas, com leve constricção entre as células dispostas em cadeias contendo de uma a oito células (Figura 1e). As diferenças nas dimensões das células monilíoides, tanto na largura (LCM) quanto no comprimento (CCM) (Quadro 2), confirmaram as diferenças observadas no aspecto da colônia e na morfologia das células

monilíoides. As características qualitativas da colônia, o diâmetro da hifa vegetativa e a morfologia e a dimensão das células monilíoides são importantes na identificação dos isolados de fungos rizoctoníoides em nível de gênero e de espécie (Currah & Zelmer, 1992; Zelmer & Currah, 1995; Currah & Zelmer, 1997; Shan et al., 2002; Pereira et al., 2003), entretanto a identificação em nível de espécie é mais segura quando subsidiada pela avaliação de características moleculares, tais como sequência da região ITS (internal transcribed spacer) do rDNA ou da região mtLSU (mitochondrial large subunit) (Taylor & Bruns, 1999; Taylor et al., 2002).

A análise multivariada das características quantitativas (Quadro 2), utilizando o método UPGMA, baseado na distância generalizada de Mahalanobis (Figura 2), e a dispersão gráfica, baseada nas duas primeiras variáveis canônicas (Figura 3), juntamente com a observação das características

qualitativas das culturas e das células monilíoides dos isolados (Figura 1c, d, e, f) permitiram avaliar a diversidade de fungos rizotonioides associados às populações de *E. secundum* estudadas. Há uma grande similaridade entre os fungos isolados da população I, II, exceto M61, e IV, os quais foram agrupados no mesmo ramo do dendrograma (< 15 % de dissimilaridade – Figura 2) e organizados no grupo C na dispersão gráfica (Figura 3). Entretanto, o isolado M76 (população IV) distingue-se deste grupo na morfologia e dimensões das células monilíoides (Figura 1f, Quadro 2). O isolado M61 (população II) foi agrupado aos isolados da população III no dendrograma (Figura 2), porém, ele pode ser separado dos fungos desta população com base na dispersão gráfica (Grupo A – Figura 3) e na morfologia das células monilíoides (Figura 1c), diferindo de todos os fungos isolados de *E. secundum*, até mesmo daqueles obtidos do mesmo fragmento de onde foi isolado (isolados M62, M63 e M64). Isso mostra uma grande semelhança entre fungos obtidos em um mesma população e em populações de uma mesma região, mas, quando se comparam os isolados das diferentes regiões, observa-se acentuada dissimilaridade, tanto em relação às análises multivariadas como à morfologia e dimensão das células monilíoides. A menor variabilidade entre os isolados fúngicos de uma mesma população pode ser interpretada como baixa diversidade, e a maior heterogeneidade entre os isolados de regiões distintas pode ser considerada como alta diversidade.

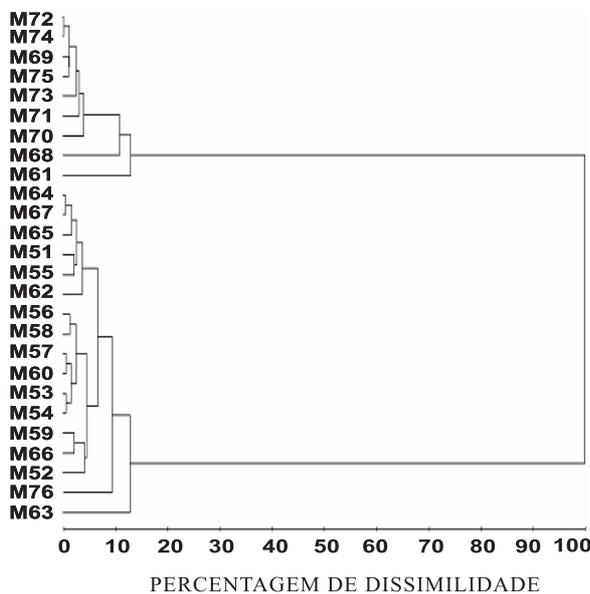


Figura 2. Dendrograma mostrando a percentagem de dissimilaridade entre 26 fungos micorrízicos isolados de quatro populações de *Epidendrum secundum*. O dendrograma foi obtido pela técnica UPGMA a partir da análise da matriz de distância de Mahalanobis. População I, isolados M51 a M60, população II, isolados M61 a M67, população III, isolados M68 a M76, e população IV, isolado M76.

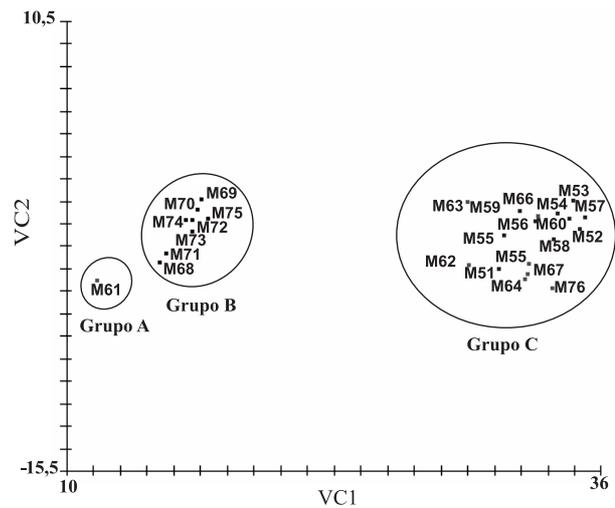


Figura 3. Dispersão gráfica em relação às duas primeiras variáveis canônicas (VC1 e VC2), calculadas a partir das características morfométricas, mostrando a relação dos 26 fungos isolados das quatro populações de *Epidendrum secundum*. População I, isolados M51 a M60, população II, isolados M61 a M67, população III, isolados M68 a M76, e população IV, isolado M76.

Resultados semelhantes foram observados por Shan et al. (2002) em *Goodyera procera* (Lindl.) Hook., pois houve grande homogeneidade entre isolados de *Epulorhiza* sp. obtidos de uma mesma localidade e grande heterogeneidade entre isolados obtidos em diferentes localidades. Entretanto, nem todos os fungos isolados em uma mesma localidade apresentaram alto grau de similaridade.

Taylor & Bruns (1999) também observaram diferentes espécies de *Russula* associadas a *Corallorhiza maculata* (Raf.) Raf. em populações de diferentes localidades, entretanto, em uma mesma localidade, quanto menor era o número de plantas amostradas, maior era a tendência de identificar apenas uma espécie. Os indivíduos amostrados eram considerados de uma mesma população quando cresciam até 2 km de distância e as localidades estudadas estavam a, pelo menos, 8 km de distância uma da outra. Utilizando esse critério, Taylor & Bruns (1999) observaram um total de 20 espécies de *Russula* associadas às populações desta espécie de orquídea em quatro estados dos EUA, portanto vários grupos de fungos do gênero *Epulorhiza* poderão ser isolados de *E. secundum* se outros locais forem estudados, já que a distância mínima entre as regiões estudadas neste trabalho era de 15 m.

As diferenças morfológicas observadas entre os fungos isolados das diferentes populações de *E. secundum* (Quadro 2, Figuras 1, 2 e 3) sugerem que foram obtidas diferentes espécies de fungos *Epulorhiza* sp. As características do solo onde as populações estudadas cresciam (Quadro 1), tais como a composição

física e química do solo (Quadro 3), as populações de outras espécies de plantas e a umidade podem favorecer o crescimento de uma espécie de fungo em detrimento de outra, explicando a grande semelhança entre isolados de uma mesma região e diferenças entre isolados de diferentes regiões (Figuras 2 e 3). As técnicas de análises utilizadas ressaltaram as diferenças físicas e químicas dos diferentes locais de amostragem (Figura 4). Os solos dos campos de altitude são, geralmente, pobres em nutrientes, mantendo uma baixa fertilidade devido à lixiviação pela alta drenagem do solo e o baixo conteúdo nutricional do seu material de origem, que, no caso da Serra do Brigadeiro, é a migmatita (Benites et al., 2007). Isso é confirmado nos dados da análise química do solo (Quadro 3). Em solos pobres, a associação com fungos micorrízicos auxilia a planta na absorção de nutrientes, principalmente P e N, promovendo a mineralização e solubilização (Smith & Read, 1997). Esses fungos contribuem para a solubilização do fosfato pela acidificação de seu microambiente, via excreção de prótons e ácidos orgânicos e via formação de ácido carbônico pela liberação de CO₂, e diminuem o estado de saturação desse elemento absorvendo e acumulando cátions e exudando compostos orgânicos ligantes e polímeros extracelulares, para então absorver e transferir esse mineral para a planta associada (Smith & Read, 1997; Joner et al., 2000; Balogh-Brunstad et al., 2008). O agrupamento baseado na matriz de D² (Figura 4a) mostrou que os solos de onde se localizavam as populações I e II são os mais semelhantes entre si, sendo observado um D² de 3,9 entre eles. O solo da localidade da população III apresentou maior semelhança com os dois anteriores, 4,47 e 5,61, respectivamente, sendo o solo da localidade da população IV o mais distinto (D² > 6,36). A técnica de componentes principais gerou três componentes contendo mais de 99 % da variância total referentes às características físicas e químicas do solo. O componente C1 representou 62,65 %, por isso quanto mais semelhante o valor de C1 (Figura 4b), mais

semelhantes são as amostras de solo, mostrando que a população IV cresce em um solo bem distinto dos demais. Na região A, onde estão localizadas as populações I e II, dos indivíduos de *E. secundum* crescem em associação com gramíneas, o solo é mais raso e é mais próximo do afloramento rochoso. Na região B da população III, essa orquídea também cresce associada a gramíneas, mas, além de possuir solo mais profundo, está próximo ao escrube, formada por vegetação arbustiva ou arbórea com cerca de 1,8 m de altura, intercalada com vegetação herbácea densa e variada (Caiafa & Silva, 2005). Na região C, onde está a população IV, a orquídea cresce sobre uma pequena mancha de gramínea fixada em um afloramento rochoso íngreme submetido à intensa lavagem pela água que escorre do topo de uma elevação. Essas diferenças podem levar à formação de diferentes microambientes nos locais, restringindo a composição da comunidade de fungos rizoctonioides capazes de colonizar cada um dos diferentes locais. Ao longo da subserra Totem Deitado, pode ser observada uma grande variação na composição do solo e da vegetação (Caiafa & Silva, 2005), o que pode levar a uma grande diversidade de fungos rizoctonioides e de outros fungos endofíticos associados a esta espécie de orquídea. Por outro lado, a ampla distribuição de *E. secundum* em uma região tão heterogênea pode estar relacionada à sua capacidade de associar-se a esses diferentes fungos *Epulorhiza* spp., os quais estão largamente distribuídos nos ambientes naturais (Currah & Zelmer, 1992).

A diversidade de isolados de fungos *Epulorhiza* spp., somada à colonização de um mesmo seguimento de raiz por diferentes fungos, como observado na população II (Quadro 2), sugere que a infecção por diferentes fungos pode ocorrer em diferentes pontos ao longo da raiz em diferentes momentos. Desse modo, quando uma raiz cresce no solo e passa por microsítios colonizados por diferentes fungos deste gênero, a planta estabelece associação com esses fungos, obtendo parte

Quadro 3. Composição química e física do solo, na camada de 0-10 cm, nas regiões vegetadas pelas populações de *Epidendrum secundum*

Região/ população	pH H ₂ O	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al	SB	t	T	V	m	P-rem	MO	Areia		Silte	Argila
															Grossa	Fina		
		mg dm ⁻³			cmol _c dm ⁻³				%			mg L ⁻¹		dag kg ⁻¹				
A/I	4,78	1,4	38	0,39	0,17	1,52	8,6	0,66	2,18	9,26	7,1	69,7	42,1	11,73	60	18	13	9
A/II	4,82	1,6	49	0,56	0,18	1,52	10,01	0,87	2,39	10,97	7,9	63,6	39,1	9,8	54	24	13	9
B/III	4,61	1,4	46	0,52	0,19	1,33	6,4	0,83	2,16	7,23	11,5	61,6	41,6	15,27	40	18	25	17
C/IV	5,05	0,9	49	1,26	0,26	1,05	9,4	1,65	2,7	11,05	14,9	38,9	43,1	12,21	37	16	27	20

(¹) pH em água. P e K: extrator Mehlich-1. Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺: extrator KCl 1 mol L⁻¹. H + Al: extrator acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹, pH 7,0. SB: soma de bases. CTC (t): capacidade de troca catiônica efetiva. CTC (T): capacidade de troca catiônica a pH 7,0. V: índice de saturação de bases. m: índice de saturação de Al. MO: Mat. Org. = C.org x 1,724 – Walkley – Black. P-rem = Fósforo remanescente.

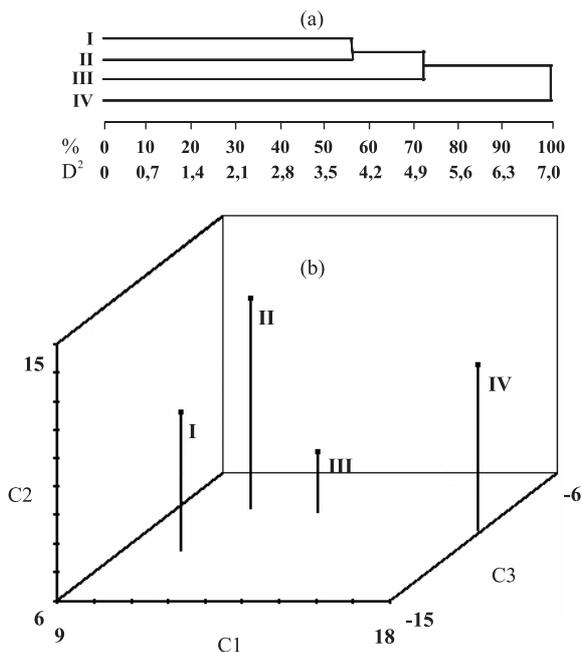


Figura 4. Análises das características químicas e físicas dos solos dos diferentes locais de amostragem do sistema radicular de *Epidendrum secundum* por técnicas multivariadas: (a) dispersão gráfica em 3D dos locais com base nos componentes principais C1, C2 e C3, e (b) dendrograma calculado pela técnica UPGMA a partir da matriz de distância euclidiana padronizada.

dos nutrientes por estes obtidos durante o processo de degradação da matéria orgânica do solo, já que estes fungos possuem atividade saprofítica (Currah & Zelmer, 1992; Peterson et al., 2004; Dearlaney, 2007).

O interesse pela diversidade e ecologia dos simbiontes fúngicos é justificado pela importância em se conhecer a complexidade dos organismos e das interações que eles estabelecem. Essas informações podem gerar uma base de conhecimento científico capaz de atender a necessidade crescente de propor estratégias de preservação da biodiversidade e auxiliar na produção de mudas de orquídeas de qualidade para reintrodução e para horticultura. Estudos objetivando avaliar a variabilidade genética entre os fungos micorrízicos associados às espécies de orquídeas brasileiras são necessários. Maior destaque deve ser dado aos fungos *Epulorhiza* spp., que, por apresentarem eficiência em promover germinação de sementes e desenvolvimento do embrião à plântula, serem estritamente saprófitas e não representarem risco de causarem doenças às mudas obtidas por germinação simbiótica (Zettler et al., 1998; Stewart & Zettler, 2002; Pereira, 2004; Garcia et al., 2006; Zettler et al., 2007). Já as espécies pertencentes aos gêneros *Ceratorhiza* e *Rhizoctonia* podem causar podridão em protocormios formados por germinação simbiótica (Zelmer et al., 1996; Wang et al., 2000; Pereira et al., 2005c) e, portanto, não são tão promissoras.

CONCLUSÕES

1. Há baixa diversidade de fungos micorrízicos rizoctonioides que colonizam o sistema radicular de plantas de *E. secundum* de uma mesma população e de populações próximas. Entretanto, a diversidade é maior quando se consideram populações de plantas em regiões diferentes.

2. Fungos morfologicamente distintos podem colonizar um mesmo segmento de raiz de *E. secundum*.

AGRADECIMENTOS

Ao IEF, pela autorização de coleta na área de conservação Serra do Brigadeiro – MG. Ao CNPq, pelo financiamento do projeto 470443/2006-5 e pelas bolsas de pesquisas.

LITERATURA CITADA

- ANDERSEN, T.F. & RASMUSSEN, H.N. The mycorrhizal species of *Rhizoctonia*. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S. & DIJST, G., eds. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1996. p.379-390.
- BALOGH-BRUNSTAD, Z.; KELLER, C.K.; DICKINSON, J.T.; STEVENS, F.; LI, C.Y. & BORMANN, B.T. Biotite weathering and nutrient uptake by ectomycorrhizal fungus, *Suillus tomentosus*, in liquid-culture experiments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 72:2601-2618, 2008.
- BENITES, V.M.; SCHAEFER, C.E.G.R.; SIMAS, F.N.B. & SANTOS, H.G. Soils associated with rock outcrops in the Brazilian mountain ranges Mantiqueira and Espinhaço. *R. Bras. Bot.*, 30:569-577, 2007.
- CAIAFA, A.N. & SILVA, A.F. Composição florística e espectro biológico de um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais – Brasil. *Rodriguésia*, 56:163-173, 2005.
- CAMPOS, A.N.R.; COSTA, M.D.; QUEIROZ, M.V. & BORGES, A.C. Basidiosporogênese no fungo ectomicorrízico *Pisolithus* sp. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 27., Bonito, 2006. Anais. Bonito, Embrapa, 2006. CD ROM.
- CRUZ, C.D. & REGAZZI, A.J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2.ed. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1997. 394p.
- CRUZ, C.D. Programa Genes: Diversidade genética. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2008. 278p.
- 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 Tottori Mycol. Inst.*, 30:43-59, 1992.

- CURRAH, R.S.; ZETTLER, L.W. & MCINNIS, T.M. *Epulorhiza inquilina* sp. nov. from *Platanthera* (Orchidaceae) and a key to *Epulorhiza* species. *Mycotaxon*, 61:338-342, 1997.
- DEARNALEY, J.D.W. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17:475-486, 2007.
- GARCÍA, V.G.; ONCO, M.A.P.; SUSAN, V.R. Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Span. J. Agric. Res.*, 4:55-79, 2006.
- JONER, E.J.; van AARLE, I.M. & VOSATKA, M. Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae: A review. *Plant Soil*, 226:199-210, 2000.
- LINHARES, D.O. Caracterização morfológica de micorrizas de *Epidendrum secundum* e *Zygopetalum mackaii* nativas do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2006. 36p. (Tese de Mestrado)
- MEINHARDT, L.W.; BELLATO, C.M. & TSAI, S.M. SYBR® Green I used to evaluate nuclei number of fungal mycelia. *Biotechniques*, 31:42-46, 2001.
- MOORE, R.T. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon*, 29:91-99, 1987.
- NOGUEIRA, R.E.; PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M.; LANNA, M.C. & MENDONÇA, M. Fungos micorrízicos associados e orquídeas em campos rupestres na Região do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil. *Acta Bot. Bras.*, 3:417-424, 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*, 44:153-155, 2003.
- PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M.; BORGES, A.C. & ARAÚJO, E.F. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Can. J. Bot.*, 83:54-65, 2005a.
- PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M.; ROLLEMBERG, C.L. & BORGES, G.M. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonioides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. *R. Bras. Ci. Solo*, 29:191-197, 2005b.
- PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M.; ROLLEMBERG, C.L. & BORGES, A.C. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonioides. *R. Bras. Ci. Solo*, 29:199-206, 2005c.
- PEREIRA, M.C. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonioides. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2004. 25p. (Monografia)
- PETERSON, R.L.; UETAKE, Y. & ZELMER, C. Fungal symbioses with orchid protocorms. *Symbiosis*, 25:29-55, 1998.
- PETERSON, R.L.; MASSICOTTE, H.B. & MELVILLE, L.H. *Mycorrhizas: Anatomy and cell biology*. Ottawa, NRC Research Press, 2004. 173p.
- RASMUSSEN, H.N. *Terrestrial orchid: From seed to mycotrophic plant*. Cambridge, Cambridge University Press, 1995. 444p.
- RASMUSSEN, H.N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil*, 244:149-163, 2002.
- ROBERTS, P. *Rhizoctonia*-forming fungi. Kew, Royal Botanic Gardens, 1999. 239p.
- SHAN, X.C.; LIEW, E.C.; WEATHERHEAD, M.A. & HODKISS, L.J. Characterization and taxonomy placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. *Mycologia*, 94:230-239, 2002.
- SMITH, S.E. & READ, D.J. *Mycorrhizal symbiosis*. 2.ed. San Diego, Academic Press, 1997. 605p.
- STALPERS, J.A. & ANDERSEN, T.F. A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia* S.L. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S. & DIJST, G., eds. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1996. p.49-63.
- STEWART, S.L. & ZETTLER, L.W. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquat. Bot.*, 72:25-35, 2002.
- TAYLOR, D.L. & BRUNS, T.D. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza macula* and *C. mertensiana*. *Molec. Ecol.*, 8:1719-1732, 1999.
- TAYLOR, D.L.; BRUNS, T.D.; LEAKE, D.J. & READ, D.J. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: van der HEIJDEN, M.G.A. & SANDERS, I. *Mycorrhizal ecology*. Berlin, Springer-Verlag, 2002. p.375-414.
- van den BERG, C.; HIGGINS, W.E.; DRESSLER, R.L.; WHITTEN, W.M.; ARENAS, M.A.S.; CULHAN, A. & CHASE, M.W. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacer (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana*, 15:96-114, 2000.
- van den BERG, C.; GOLDMAN, D.H.; FREUDENSTEIN, J.V.; PRIDGEON, A.M.; CAMERON, K.M. & CHASE, M.W. An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *Am. J. Bot.*, 92:613-624, 2005.
- WANG, C.L.; CHU, J.N.; CHEN, C.Y. & CHAO, Y.C. Influence of orchid mycorrhizal fungi *Rhizoctonia* spp. on the growth of *Oncidium Goldiana* X *Onc. Guiana* Gold seedlings. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RHIZOCTONIA, 3., Taichung, 2000. *Anais. Taiwan, International Society of Plant Pathology (Rhizoctonia Committee)*, 2000.

- ZELMER, C.D. & CURRAH, R.S. Evidence for a fungal liaison between *Corallorhiza trifida* (Orchidaceae) and *Pinus contorta* (Pinaceae). *Can. J. Bot.*, 73:862-866, 1995.
- ZELMER, C.D.; CUTHBERTSON, L. & CURRAH, R.S. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience*, 37:439-448, 1996.
- ZETTLER, L.W.; DELANEY, T.W. & SUNLEY, J.A. Seed propagation of epiphytic green-fly orchid, *Epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus. *Selbyana*, 19:249-253, 1998.
- ZETTLER, L.W.; POULTER, S.B.; McDONALD, K.I. & STEWART, S.L. Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a mycorrhizal fungus. *HortScience*, 42:135-139, 2007.