



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE  
PLANTAS

ALINE PEREIRA LUZINI

**Relações Filogenéticas Entre Isolados Fúngicos de  
*Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f., de *Epidendrum  
nocturnum* Jacq. (Orchidaceae) e de *Rhizoctonia* spp.  
Fitopatogênicas ao Arroz e ao Feijão**

GOIÂNIA, GO - Brasil

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE AGRONOMIA

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação       Tese

#### 2. Nome completo do autor

Aline Pereira Luzini

#### 3. Título do trabalho

"Relações Filogenéticas Entre Isolados Fúngicos de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f., de *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae) e de *Rhizoctonia* spp. Fitopatogênicas ao Arroz e ao Feijão".

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Aline Pereira Luzini, Usuário**



**Externo**, em 08/11/2021, às 10:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Leila Garces De Araujo, Professora do Magistério Superior**, em 22/11/2021, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2470748** e o código CRC **737C3DA0**.

---

**Referência:** Processo nº 23070.046461/2021-33

SEI nº 2470748

ALINE PEREIRA LUZINI

**Relações Filogenéticas Entre Isolados Fúngicos de  
*Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f., de *Epidendrum  
nocturnum* Jacq. (Orchidaceae) e de *Rhizoctonia* spp.  
Fitopatogênicas ao Arroz e ao Feijão**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal de Goiás, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Linha de pesquisa: Conservação e Melhoramento de Espécies Vegetais Nativas do Cerrado.

Orientador (a): Professora Doutora Leila Garcês de Araújo

Coorientador (a): Professora Doutora Rosane Garcia Collevatti

GOIÂNIA, GO - Brasil

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Luzini, Aline Pereira

Relações Filogenéticas Entre Isolados Fúngicos de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f., de *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae) e de *Rhizoctonia* spp. Fitopatogênicas ao Arroz e ao Feijão [manuscrito] / Aline Pereira Luzini. - 2013. LXV, 65 f.

Orientador: Profa. Dra. Leila Garcês de Araújo; co-orientadora Dra. Rosane Garcia Collevatti.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA), Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Goiânia, 2013.

Bibliografia.

Inclui siglas, mapas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Fungos micorrízicos. 2. Filogenia molecular. 3. Orquídeas. 4. Plantas. 5. Diversidade genética. I. Araújo, Leila Garcês de, orient. II. Título.

CDU 575



**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE ALINE PEREIRA LUZINI.** Aos vinte e um dias do mês de Março do ano de dois mil e treze (21.03.2013), às 08h30min, no Auditório PPGA da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leila Garçês – Presidente/Orientadora; Prof. Dr. Marlon Corrêa Pereira; Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Garcia Collevatti. Sob a presidência da orientadora, e em sessão pública, procedeu-se à avaliação da defesa de Dissertação intitulada: “**Relações Filogenéticas Entre Isolados Fúngicos de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f., de *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae) e de *Rhizoctonia* spp. Fitopatogênicas ao Arroz e ao Feijão**”, de autoria de **Aline Pereira Luzini**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, no nível de Mestrado, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leila Garçês de Araújo, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da Dissertação que, em 40 minutos, apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o mestrando, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Ao final, a banca reunida em separado procedeu a avaliação da defesa. De acordo com a Resolução nº 1053/2011, do CEPEC - Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura, que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, e desde que procedidas às correções recomendadas, a Dissertação será considerada aprovada pela Banca Examinadora, estando integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, pela Universidade Federal de Goiás. O mestrando deverá efetuar as modificações eventualmente sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar a versão definitiva da Dissertação à Secretaria do PGMP, no prazo máximo de trinta dias após a data da Defesa. A conclusão do Curso e a emissão do Diploma dar-se-ão após o cumprimento do Artigo 52 da Resolução CEPEC nº 1053/2011. A Banca Examinadora recomenda a publicação de artigo(s) científico(s), oriundo(s) dessa Dissertação, em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de procedidas as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades de pauta, às 12 h 30 min. A presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação e, para constar eu, Jéssica Almeida, secretária PGMP, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, em duas vias de igual teor.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leila Garçês de Araújo  
Presidente/Orientadora

Prof. Dr. Marlon Corrêa Pereira  
Membro Externo

Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho  
Membro Interno

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Garcia Collevatti  
Membro Interno

**Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu. Tudo fez formoso em seu tempo; também pôs o mundo no coração do homem, sem que este possa descobrir a obra que Deus fez desde o princípio até ao fim.**  
(Eclesiastes 3:1 e 11)

A Sra. Rosilene, minha mãe, pelo amor, muita paciência, dedicação e esforço que tem me apoiado até aqui, mesmo em meio a grandes dificuldades.

A Sra. Izaltina, minha avó, pelo amor, dedicação e toda simplicidade acreditando sempre que tudo ia dar certo.

## **DEDICO**

A minha irmã, Marcella que sempre com seu jeito irreverente me deu apoio.

Aos meus queridos, tia Neide, tia Ivonilda e tio Ailton pois sempre pude contar com vocês nos momentos de alegria e de dificuldades.

## **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Ao Deus todo poderoso criador dos céus e da terra, por me conceder os dons do Espírito (amor, alegria, paz, longanimidade, benignidade, bondade, fidelidade, mansidão, domínio próprio - Gal. 5: 22,23) no decorrer dessa jornada, e ter me ajudado a permanecer firme e inabalável até aqui. Por sempre estar comigo por onde quer que eu fosse me direcionando e abrindo os olhos do meu entendimento para sempre crer que Ele pode fazer infinitamente mais do que eu jamais poderia imaginar ou sonhar – Ef. 3:20. E por me fazer crer e sonhar os sonhos de Deus para mim.

A minha mãe por sempre estar ao meu lado me motivando mesmo quando diziam que eu não iria chegar até aqui. A minha irmã por sempre me fazer rir e acreditar que tudo vai melhorar “da nada não”. A minha avó Iza grande guerreira que sempre acreditou em mim mesmo antes de eu nascer. Aos meus tios Ivonilda, Ailton, Junio por seu grande apoio e auxílio, e em especial minha tia Neide minha mãe do coração que sempre se preocupa e cuida de mim.

E agora e não menos importante ao meu noivo que me ensinou que o amor é algo tão simples que é construído dia após dia, e é o suporte para todas as conquistas que sem ele as outras coisas perdem seu verdadeiro significado.

À minha professora e orientadora, Dra. Leila, por sua paciência e persistência em me auxiliar. Também a minha professora e coorientadora, Dra. Rosane, por me instruir nessa nova área de conhecimento.

Às companheiras de mestrado e de laboratório Kellen, por ter uma enorme paciência em me auxiliar nas atividades laboratoriais e pertinentes ao mestrado, e a Jacqueline companheira de “ralas” e de dias “intermináveis” no laboratório e nas aulas.

Quero agradecer aos companheiros de outros laboratórios que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, Andrei (Laboratório de Enzimologia), Thais por sua enorme paciência, cordialidade e dedicação em me auxiliar (Laboratório de Genética e Biologia Molecular). Advaldo e Suelen por me ajudarem nas análises filogenéticas, e em especial a Uiara (Universidade Federal de Feira de Santana) que mesmo longe sempre me acudiu quando apareciam dúvidas.

Quero agradecer ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Sou grata à UFG pelas instalações, e à CAPES (Reuni), por financiar meus estudos.

Por ultimo e não menos importante a turma do Laboratório de Genética de Microrganismos, Amanda, Carlos, Rodrigo, Eurípedes, Luana, Fernanda, Isabela, Maria Lucia, Denise, Alini, Camila pela companhia sempre “barulhenta”, mas que faz toda a diferença na nossa rotina diminuindo toda monotonia e amenizando os problemas diários nos levando a sorrir com suas conversas e quando eventualmente quebram algo.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	10
<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
2.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE .....	15
2.1.1 Espécies <i>Cyrtopodium saintlegerianum</i> Rchb. f. e <i>Epidendrum nocturnum</i> Jacq .....	16
2.2 FUNGOS MICORRÍZICOS E ENDOFÍTICOS DE ORQUÍDEAS .....	18
2.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE FUNGOS RIZOCTONIOIDÊS MICORRÍZICOS E FITOPATOGÊNICOS .....	21
2.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS RIZOCTONIOIDÊS MICORRÍZICOS E FITOPATOGÊNICOS.....	23
2.4.1 Região ITS .....	24
2.4.2 Filogenia molecular e diversidade genética de fungos micorrízicos..	26
2.4.3 Especificidade micorrízica por meio da filogenia molecular.....	27
2.4.4 Filogenia de fungos micorrízicos/endofíticos e fitopatogênicos .....	30
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
3.1 MATERIAL FÚNGICO .....	36
3.2 DADOS MORFOLÓGICOS .....	37
3.3 DADOS MOLECULARES .....	39
3.4 ANÁLISES MOLECULARES .....	45
3.4.1 Extração e quantificação do DNA genômico .....	45

<b>3.4.2</b>	<b>Sequenciamento das amostras .....</b>	<b>46</b>
<b>3.4.3</b>	<b>..... mento das sequências .....</b>	<b>48</b>
<b>3.5</b>	<b>..... GENÉTICAS .....</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Características morfológicas das espécies de orquídeas <i>C. saintlegerianum</i> e <i>E. nocturnum</i> . A: Planta de <i>C. saintlegerianum</i> sobre caule de palmeira do gênero <i>Acrocomia</i> sp.; B: Flor de <i>C. saintlegerianum</i> ; C: Planta de <i>E. nocturnum</i> sobre rocha em Cerrado Rupestre; e D: Flor de <i>E. nocturnum</i> . ....	17
<b>Figura 2</b>	Mapa de distribuição mundial do fungo <i>X. hypoxylon</i> , locais de ocorrência do fungo (pontos amarelos). ....	20
<b>Figura 3</b>	Unidades de repetição e subunidades gênicas da região ITS 1 e 2 (espaço interno transcrito) do gene nuclear ribossomal. ETS: Espaço externo transcrito, NTS: Espaço não transcrito, IGS: Espaçadores intergênicos. ....	25
<b>Figura 4</b>	Filogenia de <i>Ceratorhiza</i> com base na análise de Máxima Verossimilhança (ML) obtida a partir da análise da região ITS dos isolados de orquídeas epífitas e terrestres. As sequências de <i>Tulasnella</i> correspondem ao <i>outgroup</i> . ....	29
<b>Figura 5</b>	Filogenia de <i>Ceratorhiza</i> -like com base no método neighborjoining (NJ) obtida a partir da análise da região ITS. <b>A</b> : Isolados não derivados de orquídeas (fitopatogênicos); <b>B e C</b> : Isolados derivados de orquídeas (micorrízicos). ....	31
<b>Figura 6</b>	Análise filogenética da região ITS do rDNA por MV (Máxima Verossimilhança), os isolados de arroz e de soja formaram um único grupo filogenético com o grupo AG1-IA, com 98% de suporte estatístico por meio de análise de <i>bootstrap</i> . ....	33
<b>Figura 7</b>	Árvore filogenética ilustrando as relações entre haplótipos da região ITS-5.8S dos AGs de <i>R. solani</i> (AG-1 a AG-12 e AG-BI) e o grupo de isolados de <i>T. cucumeris</i> ( <i>R. solani</i> ) obtidos de <i>Hevea brasiliensis</i> e diversas outras espécies cultivadas ou nativas. ....	34
<b>Figura 8</b>	Árvore filogenética ilustrando as relações entre haplótipos da região ITS-5.8S dos AGs de <i>Ceratobasidium</i> sp. (AG-A a AG-U e CAG-1 a CAG-7) e o grupo de isolados obtido de <i>Mimosa</i> sp., espécie nativa da Amazônia brasileira. Esta árvore foi enraizada com a sequência da região ITS-5.8S de <i>T. cucumeris</i> ( <i>R. solani</i> AG-2-2 Hb da seringueira). ....	35
<b>Figura 9</b>	Diagrama ilustrativo dos iniciadores utilizados para amplificar as regiões nucleares entre o gene ribossomal 5.8S e os espaçadores ITS1 e ITS2. ....	47
<b>Figura 10</b>	Análise por gel de agarose 3% da PCR de fungos rizoctonioides	

	para teste de primers, utilizando marcador 1 Kb. En07 – <i>Rhizoctonia</i> sp., Cs21 - <i>Epulorhiza</i> sp., Ro93 e Ro88 - <i>R. oryzae</i> . .....	50
<b>Figura 11</b>	Árvore filogenética Bayesiana obtida a partir da análise dos fragmentos de restrição da região ITS1 e ITS2 de fungos micorrízicos e fitopatogênicos obtidos no presente trabalho e do <i>GenBank</i> . Clado I (Vermelho), Clado II (Azul) e Clado III (Laranjado). <i>Outgroup</i> : <i>Sebacina vermifera</i> . .....	53
<b>Figura 12</b>	Árvore filogenética Bayesiana obtida a partir da análise dos fragmentos de restrição da região ITS1 e ITS2 de fungos Xylarioides obtidos no presente trabalho e do <i>GenBank</i> em laranja nossos isolados outgroup <i>Trametes versicolor</i> . .....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Isolados fúngicos e sua classificação com base em caracteres morfológicos, código do isolado, gênero e planta de origem. ....	36
<b>Tabela 2</b>	Caracteres morfológicos como presença de micélio aéreo, formato da margem, aspecto e cor do micélio dos isolados rizoctonioides de <i>C. saintlegerianum</i> e <i>E. nocturnum</i> , e também dos isolados de <i>Xylaria</i> sp. obtidos de <i>C. saintlegerianum</i> e teste de Polifenol Oxidase obtidos por Sousa (2012) utilizados no presente trabalho. ....	38
<b>Tabela 3</b>	Espécies, número de acesso, fonte, origem e autor dos isolados rizoctonioides de <i>C. saintlegerianum</i> e <i>E. nocturnum</i> , bem como as obtidas do <i>GenBank</i> . ....	39
<b>Tabela 4</b>	Espécies, número de acesso, fonte, origem e autor dos isolados de <i>Xylaria</i> sp. obtidos de <i>C. saintlegerianum</i> , bem como as obtidas do <i>GenBank</i> . ....	44
<b>Tabela 5</b>	Reagentes e concentrações utilizados nas reações de PCR dos isolados rizoctonioides de <i>C. saintlegerianum</i> e <i>E. nocturnum</i> , e também dos isolados de <i>Xylaria</i> sp. obtidos de <i>C. saintlegerianum</i> . ....	46
<b>Tabela 6</b>	Lista de fungos identificados por sequenciamento da região ITS, incluindo código do isolado, gênero encontrado por características morfológicas, espécie mais próxima e código de adesão e correspondência. ....	51

## RESUMO

LUZINI, A. P. **Relações Filogenéticas Entre Isolados Fúngicos de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f., de *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae) e de *Rhizoctonia* spp. Fitopatogênicas ao Arroz e ao Feijão.** 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013. <sup>1</sup>

*Cyrtopodium saintlegerianum* (epífita) e *Epidendrum nocturnum* (rupícola) são orquídeas que ocorrem em áreas antropizadas de Cerrado e Cerrado Rupestre, respectivamente. *Rhizoctonia* sp. é um dos gêneros mais frequentes entre os fungos micorrízicos de orquídeas, embora seja patógeno de várias culturas. Estudos filogenéticos de fungos utilizando a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA são importantes devido sua extensão (500-800pb) e sua variabilidade entre espécies, para avaliar a especificidade entre fungo e planta, a história evolutiva das espécies e as interações entre patógeno e hospedeiro. O presente trabalho objetivou caracterizar molecularmente e estabelecer relações filogenéticas entre os fungos micorrízicos/endofíticos isolados de *C. saintlegerianum* e de *E. nocturnum* pertencentes aos gêneros *Rhizoctonia* sp., *Xylaria* sp. e isolados de *Rhizoctonia* spp. patogênicos ao arroz e ao feijão, e de alguns isolados obtidos do *Genbank*. O DNA genômico de um isolado micorrízico, dois de *Xylaria* sp. (endofíticos), e quatro fitopatogênicos ao arroz e ao feijão foi extraído e em seguida realizou-se o sequenciamento da região ITS1 e ITS2 do rDNA. As relações filogenéticas, inferidas por meio de análises Bayesianas entre os isolados rizoctonioides do presente trabalho e dos encontrados no *GenBank* mostraram três clados, e os isolados Xylarioides apresentaram um único grande clado. Os resultados moleculares de *Rhizoctonia* sp. micorrízica e Xylarioides corroboram os resultados morfológicos. Os isolados micorrízicos compõem um clado polifilético com os do *GenBank*. O isolado micorrízico de *Rhizoctonia* sp. obtido de *E. Nocturnum* formou uma linhagem diferente das *Rhizoctonias* spp. oriundas de outras espécies de orquídeas do *GenBank*. Os isolados Xylarioides obtidos no presente trabalho mostraram linhagens diferentes dos encontrados no *GenBank*.

**Palavras-chave:** Orquídea, rizoctonióide, endofítico, micorriza, filogenia molecular.

---

<sup>1</sup> Orientadora: Prof. Dra. Leila Garcês de Araújo, EA-UFG.

Co-orientadora: Prof. Dra. Rosane Garcia Collevatti, EA-UFG.

## ABSTRACT

LUZINI, A. P. **Phylogenetic relationships among fungi of orchids *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f., and *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae) and plant pathogenic *Rhizoctonia* spp.** 2013. 61f. Dissertation (Masters` in Genetics and Plant Breeding) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

The orchids *Cyrtopodium saintlegerianum* (epiphyte) and *Epidendrum nocturnum* (rupicola) occur in areas anthropized of cerrado and cerrado rupestre, respectively. Even though, *Rhizoctonia* sp. is pathogenic to various crops, it is one of the more frequent genera among the micorrhizal fungi. Studies on fungal phylogenetics utilizing the ITS (*Internal Transcribed Spacer*) region of rDNA are important for evaluating specificity between plant and fungus, the evolutionary history of species and host - pathogen interactions. The objective of the present study include molecular characterization and establishment of phylogenetic relationships among endophytic/micorrhizal fungi isolates of *C. saintlegerianum* and of *E. nocturnum* pertaining to genera *Rhizoctonia* sp., *Xylaria* sp. and isolates of *Rhizoctonia* spp. pathogenic to rice and common beans and of isolates obtained from *Genbank*. The genomic DNA of one micorrhizal isolate, two of *Xylaria* sp. (endophytic), and four of rice and bean pathogens were extracted, and soon after sequencing of ITS 1 and ITS2 of nrDNA was done. The phylogenetic relations, inferred by Bayesian analysis among the rhizoctonia-like isolates of the present study and found in *GenBank* showed three clusters, and Xylarioides showed one cluster. The molecular results of micorrhizal *Rhizoctonia* sp. and Xylarioides are in close agreement with the results on morphology. The micorrhizal isolates formed one poliphyletic clad with the isolates of the *GenBank*. The micorrhizal isolate of *Rhizoctonia* sp. obtained from *E. nocturnum* formed one lineage different from *Rhizoctonia* spp. originating from other orchid species of *GenBank*. The Xylarioides isolates obtained in the present study showed lineage different of the found in *GenBank*.

**Key-words:** Orchids, Rhizoctonia-like fungi, endophytic, mycorrhiza, molecular phylogenetics.

# 1 INTRODUÇÃO

As associações micorrízicas são um tipo de mutualismo, em que a planta e o fungo se beneficiam. Fungos micorrízicos infectam mais de 90% das plantas vasculares no mundo, incluindo diversas plantas cultivadas e silvestres, portanto é uma associação econômica e ecologicamente importante e significativa para a agricultura (Trigiano et al., 2010).

Os fungos micorrízicos comumente afetam a diversidade das comunidades de plantas e também sua distribuição. As orquídeas tendem a formar uma relação micorrízica com uma estreita amplitude filogenética de fungos em comparação com outros tipos de associações micorrízicas, caracterizando uma maior especificidade entre fungo e planta (Phillips et al., 2011).

Os principais fungos micorrízicos isolados de orquídeas no Brasil pertencem a quatro gêneros principais que são *Ceratorhiza*, *Epulorhiza*, *Opadorhiza* e *Rhizoctonia*, e são denominados de rizoctonioides (Pereira et al., 2009; Pessoa et al., 2012; Valadares et al., 2012). O gênero *Rhizoctonia* é um dos mais frequentes entre os fungos micorrízicos, embora seja um grupo polifilético, composto por espécies patogênicas, endofíticas e saprófitas (Trigiano et al., 2010). Este gênero inclui o fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (Kühn) e teleomorfo *Thanatoporus cucumeris* (Frank) Donk, que é o mais conhecido por ser um patógeno cosmopolita e de grande importância econômica, agrícola e florestal (Nakatani, 2006).

Endófitos possuem uma grande relevância ecológica e possui uma grande importância em estudos de controle biológico, degradação de compostos lignocelulolíticos e produção de metabólitos secundários para controle biológico de patógenos de plantas e de humanos (Castillo, 2012).

Os fungos rizoctonioides raramente produzem esporos sexuais em meio de cultura, dificultando sua identificação taxonômica e, por isso, são caracterizados morfológicamente pelas ramificações de suas hifas em ângulos de noventa graus, constrição e septos próximos ao ponto de ramificação e por grupos de anastomose (AG). Entretanto, vários trabalhos demonstraram que somente estes caracteres morfológicos citados são insuficientes para a identificação ao nível de espécie. Por isso, com os avanços

da biologia molecular, os fungos rizoctonioides são caracterizados geneticamente por meio de análise e sequenciamento da região ITS do gene nuclear ribossomal (nrDNA) (Otero et al., 2007; Valadares et al., 2012).

O estudo filogenético tem possibilitado a reconstrução filogenética de organismos com representantes de diferentes áreas geográficas, bem como a investigação da história evolutiva das espécies que estão em constantes interações simbióticas, ou em interações entre patógeno e hospedeiro, e de co-evolução (Schneider, 2003). Com o crescente desenvolvimento de técnicas moleculares como o sequenciamento, o uso de certos fragmentos de DNA tornou-se uma importante fonte de caracteres para a análise filogenética, e os espaçadores ITS são ideais e os mais utilizados para esses estudos (Miz, 2006; Calonje et al., 2009).

Estudos filogenéticos de fungos micorrízicos de orquídeas tropicais enfatizam a especificidade das suas relações, suas implicações e conservação em ambientes naturais (Suárez et al., 2006; Mosquera-Espinosa, 2010). Por esse motivo a utilização de estudos filogenéticos é bastante determinante em estudos de caracterização e especificidade micorrízicas, pois apresenta uma maior precisão quanto aos seus resultados se comparados com caracteres morfológicos que em muitas vezes são ambíguos e inespecíficos.

Alguns trabalhos foram realizados envolvendo caracterização e filogenia de fungos micorrízicos de orquídeas, utilizando o sequenciamento da região ITS, esses trabalhos foram realizados com orquídeas de vários ambientes não incluindo o Cerrado, notando-se a necessidade de estudos nesse bioma (Pereira, 2001; Valadares et al., 2012). Também foram feitos trabalhos que realizaram a filogenia de fungos endofíticos e fitopatogênicos obtidos de várias espécies de plantas (Peláez et al., 2008; Mosquera Espinosa, 2010).

O presente estudo tem como objetivo caracterizar molecularmente e estabelecer relações filogenéticas entre os fungos micorrízicos/endofíticos isolados de *C. saintlegerianum* rchb.f., de *E. nocturnum* jacq. pertencentes aos gêneros de *Rhizoctonia* sp., de *Xylaria* sp., de *Rhizoctonia* spp. patogênicos ao arroz e ao feijão e de alguns isolados obtidos do *Genbank*. Nossa hipótese de trabalho é que os isolados de fungos micorrízicos compõem linhagens diferentes daquelas fitopatogênicas do mesmo gênero.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE

A família Orchidaceae é uma das mais numerosas entre as famílias das plantas, são caracterizadas por apresentarem várias espécies de orquídeas com distribuição geográficas limitadas (Dearnaley, 2007; Campos, 2008). É a maior família de monocotiledôneas do mundo e uma das maiores dentre as Angiospermas, estima-se que tenha entre 17.000 e 35.000 espécies em 1000 gêneros (Dressler & Dodson, 1960; Dressler, 1993). As orquídeas pertencem à Ordem Asparagales, Classe Liliopsida, Divisão Magnoliophyta, ao Reino Plantae e ao Domínio Eukarya. Ocorrendo maior número de gêneros e espécies em regiões tropicais, predominantemente como epífitas e rupículas (Williams, 1974; Dressler, 1993; Pereira & Ribeiro, 2004).

No Brasil são encontrados aproximadamente 236 gêneros e 2.457 espécies dos quais 60 gêneros e 1.626 espécies são endêmicos (Barros et al. 2014). Dentre as mais de dez mil espécies vegetais do Cerrado, a Orchidaceae está entre as cinco famílias mais representativas, com aproximadamente 689 espécies (Mello, 2000; Barros et al. 2014; Batista et al., 2005). Os gêneros mais significativos são *Cattleya* Lindl., *Catasetum* Rich. Kunth., *Cleistes* Rich. Lindl., *Epidendrum* Lindl. e *Cyrtopodium* Rchb. (Menezes, 2000).

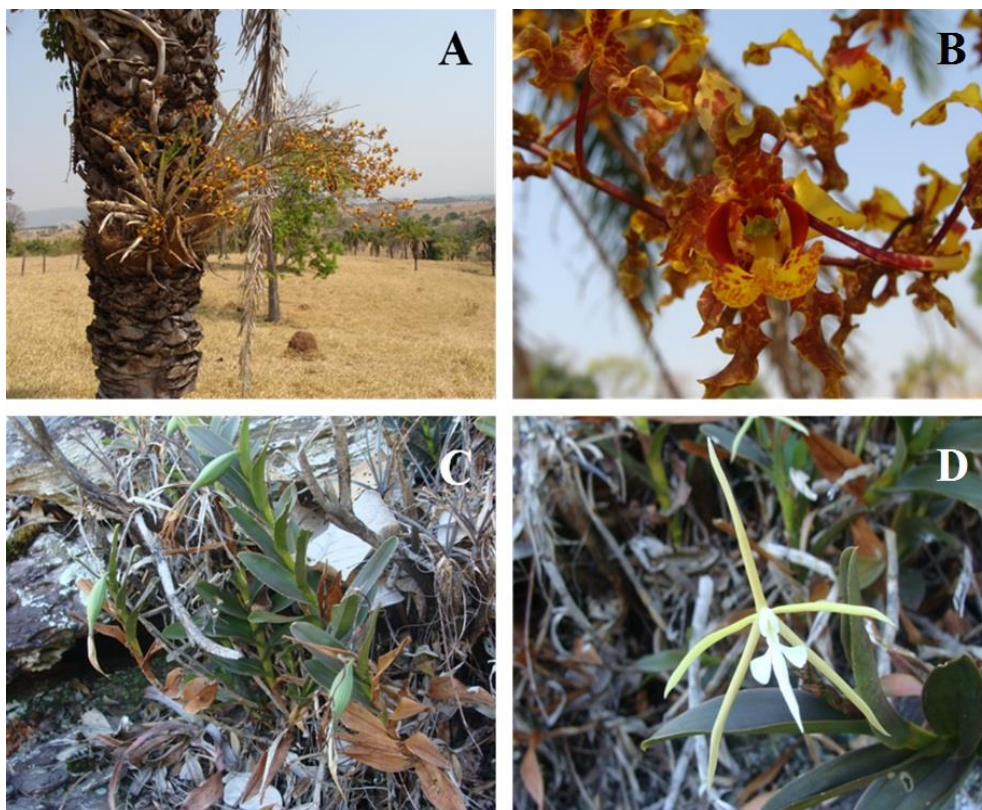
#### 2.1.1 Espécies *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. e *Epidendrum nocturnum* Jacq.

A espécie *C. saintlegerianum* Rchb. f. (Figura 1 A) pertence ao gênero *Cyrtopodium*, subtribo Cyrtopodiinae, tribo Cymbidieae, subfamília Epidendroideae, família Orchidaceae. Pode ser encontrada como epífita ou terrestre, e enquanto epífita crescendo sobre o tronco de palmeiras ou nas bainhas das palmas. Apresenta

pseudobulbos claviformes com aproximadamente 60 cm, recobertos por bainhas firmemente aderidas. Possui raízes bastante lignificadas com velame e raízes adventícias que formam uma rede em torno do caule da planta suporte e inflorescência apical, com flores amarelas e pontos em marrom (Figura 1B) e às vezes apresenta hastes secundárias (Suttleworth & Zim, 1995; Sousa, 2012).

O gênero *Cyrtopodium* foi proposto por Robert Brown, em 1813, o nome do gênero vem do grego *Cyrtos*, arqueado, e *podium*, pés, devido ao formato dos pseudobulbos e o epíteto específico "*saintlegerianum*" em homenagem ao pesquisador Francês Saint Léger (Campacci, 2000; Menezes, 2000). A espécie *C. saintlegerianum* não é endêmica do Brasil, mas pode ser encontrada nos estados do Pará, Tocantins, Piauí, Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso, Grosso do Sul, Distrito Federal e Goiás (Menezes, 2000; Batista et al., 2005; Barros et al., 2011). Na Floresta Amazônica ocorre como terrestre e epífita (Barros et al., 2003) e no Cerrado é observada crescendo sobre o caule de palmeiras (Figura 1 A) (Menezes, 2000).

A espécie *E. nocturnum* Jacq (Figura 1 C) pertence ao gênero *Epidendrum*, subtribo Laeliinae, tribo Epidendreae, subfamília Epidendroideae, família Orchidaceae. Pode ser encontrada como epífita, terrestre e rupícola. Possui caule ereto podendo variar entre 20 a 80 cm de altura, folhas coriáceas e finas de cor verde claro, espaçadas e alternadas. A flor apresenta coloração amarelo esverdeado, aparecendo no ápice dos caules, com pétalas e sépalas muito parecidas e finas (Figura 1 D) (Suttleworth & Zim, 1995; Sousa, 2012). As raízes possuem velame, são fasciculadas e filiformes, situando-se na base do caule (Bonates, 2007).



**Figura 1.** Características morfológicas das espécies de orquídeas *C. saintlegerianum* e *E. nocturnum*. A: Planta de *C. saintlegerianum* sobre caule de palmeira do gênero *Acrocomia* sp.; B: Flor de *C. saintlegerianum*; C: Planta de *E. nocturnum* sobre rocha em Cerrado Rupestre; e D: Flor de *E. nocturnum*.

A espécie *E. nocturnum* é conhecida como *night scented orchid* por apresentar um agradável aroma noturno. Por este motivo, possui grande apelo ornamental e comercial, como também conservacionista (Zettler et al., 2007). A espécie *E. nocturnum* não é endêmica do Brasil (Barros et al., 2014), mas podendo ocorrer em todas as regiões do país com ênfase para os estados do Amazonas, Pará, Mato Grosso do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Goiás (Batista & Bianchetti, 2003; Royal, 2006; Barbero, 2007; Bonates, 2007; Stancik et al., 2009; Medeiros & Jardim, 2011).

## 2.2 FUNGOS MICORRÍZICOS E ENDOFÍTICOS DE ORQUÍDEAS

As micorrizas surgiram a cerca de 430 milhões de anos, no Siluriano, durante a era Paleozóica, no período em que as plantas saíram do ambiente aquático e passaram a colonizar a terra. Estes registros fósseis mostram que as primeiras associações ocorreram entre os fungos Glomeromycota, que formam micorrizas do tipo arbuscular, e os representantes das plantas Marchantiophyta (clorófitas), que supostamente originaram as plantas vasculares (Esposito & Azevedo, 2010).

Os primeiros relatos sobre micorrizas datam de 1840, mas somente em 1885 o botânico Alemão Albert Bernard Frank propôs o termo micorrizas, caracterizando-as como associações simbióticas mutualistas e não patogênicas entre raízes de plantas e fungos específicos. A formação de micorrizas é a simbiose mais comum que ocorre entre fungos e plantas, sendo encontradas na maioria dos grupos vegetais. Vários mecanismos físicos, químicos e microbianos estão envolvidos concomitantemente na interação micorrízica (Siqueira, 1996; Boldrini et al.; Esposito & Azevedo, 2010).

As associações micorrízicas são um tipo de mutualismo, em que a planta e o fungo se beneficiam em termos de adaptabilidade. A espécie fúngica aumenta a eficiência da absorção de nutrientes pelo hospedeiro e, por outro lado, recebe carbono produzido durante a fotossíntese. Fungos micorrízicos infectam mais de 90% das plantas vasculares no mundo, incluindo diversas plantas cultivadas e nativas, portanto é uma associação econômica e ecologicamente importante e significativa para a agricultura (Trigiano et al., 2010).

Desde 1889 há registros, de que as orquídeas realizam simbiose com fungos micorrízicos e estes podem variar quanto à taxonomia, fisiologia e ecologia. As orquídeas apresentam sementes muito pequenas, com pouca reserva nutricional, estas sementes precisam ser colonizadas pelo fungo simbiote para que ocorra a germinação (Rasmussen, 1995; Pereira et al., 2003; Peterson et al., 2004).

Os fungos micorrízicos mais frequentes em orquídeas pertencem ao grupo dos rizoctonioides *Rhizoctonia*-like (Currah & Zelmer, 1992; Rasmussen, 2002; Pereira et al., 2005a; Dearnaley, 2007). Estes fungos pertencem a quatro gêneros principais que são, *Ceratorhiza*, *Epulorhiza*, *Opadorhiza* e *Rhizoctonia*. Os fungos rizoctonioides obtidos de orquídeas brasileiras promoveram a germinação da semente e o desenvolvimento do

embrião das mesmas em plântula (Pereira et al., 2003; Nogueira et al., 2005; Pereira et al., 2005a; Pereira et al., 2005b; Pereira et al., 2009; Pereira et al., 2011; Pessoa et al., 2012; Souza, 2012; Valadares et al., 2012).

A digestão dos *pelotons* formados após a colonização do embrião pelo fungo micorrízico fornece nutrientes para a germinação e desenvolvimento da plântula (Rasmussen, 1995). Após a germinação, o embrião da semente da orquídea desenvolve-se formando o protocormo, estrutura heterotrófica, que origina a plântula, da qual se desenvolve a planta adulta (Peterson et al., 2004).

Endófitos são microrganismos que se desenvolvem dentro do tecido vegetal sem causar danos ou sintomas de doença (Bayman & Otero, 2006). Pesquisas sobre fungos endofíticos e micorrízicos estão intimamente ligadas, e a discussão separada dessa associação se torna praticamente impossível (Castillo, 2012). Em alguns casos essas associações são consideradas simbióticas, mas em outros casos ao longo da história de vida do organismo pode se tornar comensalista, mutualista, parasita ou ambos (Bayman & Otero, 2006).

Os fungos endofíticos também podem beneficiar as plantas de forma indireta por meio da indução de metabólitos de defesa contra patógenos, produção de hormônios pela planta aumentando sua taxa de crescimento, aumento da mobilidade de nutrientes para a planta hospedeira e uma maior tolerância a stress (Castillo, 2012).

Um dos endófitos associados às orquídeas é o fungo *Xylaria* sp. pertencente à ordem Xylariales e à família Xylariaceae (Ascomycota). Essa família possui em torno de 40 gêneros, sendo descritas 431 espécies (Cafêu, 2007). Apresenta como forma perfeita *Hypoxylon* sp. e imperfeita *Nodulisporium* sp. (Castillo, 2012). *Xylaria* ocorre em regiões temperadas e tropicais, entretanto é mais frequente em plantas tropicais do que de clima temperado. O gênero *Xylaria*, é encontrado como saprófita, parasita e endófito. Espécies endofíticas de *Xylaria* foram relatadas em orquídeas, palmas e bromélias, entre outras (Cafêu, 2007; Sousa, 2012). Existem poucos trabalhos sobre esse fungo no Brasil, um exemplo é o trabalho de (Carvalho et al., 2012a), que discutiram sobre a diversidade e a atividade biológica de fungos endofíticos associados à *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão). O maior número de publicações e relatos sobre o fungo *Xylaria hypoxylon* (L.) Grev.(1824) estão localizadas na America do Norte, Europa e Oceania (Figura 2).



**Figura 2.** Mapa de distribuição mundial do fungo *X. hypoxylon*, locais de ocorrência do fungo (pontos amarelos). Fonte: <http://data.gbif.org>.

*Xylaria* sp. proporciona também a produção de metabólitos secundários com potencialidade antifúngica controladora de patógenos de plantas e de humanos. Assim a inoculação de organismos desse grupo pode não apenas favorecer a planta fornecendo uma maior disponibilidade de nutrientes, mas também a produção de enzimas e metabólitos secundários que podem atuar no biocontrole de patógenos, melhorando o desempenho das plantas em baixas condições de cultivo (Castillo, 2012).

Os fungos *Xylaria* sp. possuem um sistema enzimático eficiente que possibilita a degradação de materiais lignocelulolíticos da madeira, da agricultura e de florestas e possuem potencial para produção de biocombustíveis. Estes resíduos constituem fontes renováveis dos quais vários produtos biológicos e químicos podem ser produzidos (Sánchez, 2009). Mas, poucos são fungos que produzem um conjunto de enzimas capaz de degradar a celulose e a hemicelulose em unidades de glicose e xilose. As enzimas envolvidas na conversão da celulose em glicose são conhecidas como celulases e compreendem uma classe de enzimas que atuam sinergisticamente: endoglucanases, celobiohidrolases e as  $\beta$ -glicosidases que degradam as cadeias de oligossacarídeos à glicose. A hidrólise da xilana (uma hemicelulose de origem vegetal), ocorre devido à ação sinérgica de endoxilanases,  $\beta$ -xilosidases e exo-xilanases (Gomes, 2007). Além disso algumas destas enzimas também estão envolvidas no controle biológico de fitopatógenos.

*X. hypoxylon* é um desses fungos que produz enzimas lignocelulolíticas como lacase, xilanase, endoglucanase, glucosidase e esterase (Sánchez, 2009). Baldrian (2006) testou 20 isolados de fungos Xylariaceae para presença de genes que codificam a síntese da enzima oxidativa lacase, três dos isolados apresentaram genes para síntese dessa enzima, e foram descritos por isso como *Xylaria* sp.. De acordo com Gomes (2007) a produção da enzima lacase pelo fungo *X. hypoxylon* possui um grande potencial para estudos futuros pois é uma enzima que apresenta atividade lignolítica despolimerizando os polímeros de lignina, o que representa um grande potencial industrial. Xilanases são enzimas extracelulares, produzidas principalmente por fungos e bactérias, sendo os fungos seus maiores produtores, podem ser empregadas em indústrias como suplemento animal, para manufatura de pão, alimentos e bebidas, indústria de polpa de celulose e papel, têxtil e produção de xilitol (Gomes, 2007).

### 2.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE FUNGOS RIZOCTONIOIDES MICORRÍZICOS E FITOPATOGÊNICOS

Os fungos rizoctonioides apresentam as seguintes características morfológicas: (i) constrição da hifa na região do septo; (ii) ramificação da hifa logo após o septo e em ângulo reto; (iii) presença de cadeias de células intumescidas, as células monilioides, que são propágulos assexuais de resistência; (iv) formação de escleródios; (v) septo dolipórico complexo; (vi) ausência de esporos assexuais e (vii) ciclo sexual raro e de difícil observação (García et al., 2006). A identificação desses fungos micorrízicos pode ser realizada utilizando-se chaves taxonômicas baseadas em características culturais, morfológicas e fisiológicas (Currah & Zelmer, 1992; Currah et al., 1997). Entretanto, o processo de identificação baseada nessas características é trabalhoso, estimulando-se a utilização de técnicas moleculares (Taylor et al., 2002).

Grande parte dos fungos micorrízicos orquidoides pertencem ao gênero-forma *Rhizoctonia*, um grupo polifilético de patógenos, endofíticos, saprófitas e fungos micorrízicos que foi descrito em 1815 por De Candolle (Warcup, 1981; Otero et al., 2002; 2004; Bonnardeaux et al.; Otero et al., 2007; Valadares, 2009; Valadares et al., 2012). Este

gênero inclui o fitopatógeno anamorfo *Rhizoctonia solani* (Kühn) e teleomorfo *Thanatoporus cucumeris* (Frank) Donk, que é o mais conhecido por ser um patógeno cosmopolita e de grande importância econômica, agrícola e florestal. Este fungo causa doenças em várias culturas vegetais importantes no mundo, infectando sementes, raízes, hastes, frutos, folhas e colmo (Pereira, 2001; Nakatani, 2006; Valadares, 2009). *R. oryzae* causa podridão da raiz e nanismo em trigo, cevada, arroz e outros cereais, diminuindo drasticamente o rendimento desses cultivares, também considerado o agente causal de doenças na bainha do arroz (Paulitz et al., 2003). Também pode ser encontrado como micorriza de espécies de orquídeas como *E. nocturnum* (Sousa, 2012).

Os isolados de *Rhizoctonia* sp. podem ser caracterizados morfológicamente por meio de grupos de anastomose de hifas ou AG's com isolados de grupos padrões. Este método consiste no pareamento de isolados desconhecidos com isolados conhecidos ou padrões, observando-se a ocorrência da reação de anastomose nas hifas localizadas na região de confluência (Carling et al., 2002). Os isolados micorrízicos de *Ceratohiza* sp. (teleomorfo – *Ceratobasidium* spp.) binucleados foram agrupados em 21 AG's e os isolados fitopatogênicos de *R. solani* (teleomorfo *T. cucumeris*) em 12 AG's (Carling et al., 1999; Mosquera-Espinosa et al., 2012).

Além dos grupos de anastomose características microscópicas, como o formato das hifas, número de núcleos por célula e também testes enzimáticos são utilizados para a distinção dos gêneros rizoctonioides, micorrízicos dos fitopatogênicos. Dessa forma Sousa (2012) avaliou oito isolados fúngicos micorrízicos, cinco obtidos de *E. nocturnum* e três de *C. saintlegerianum*, três fitopatogênicos ao arroz e feijão e dois endofíticos (*Xylaria* sp.) de *C. saintlegerianum* quanto ao número de núcleos por célula (coradas com SYBR Green I), teste enzimático e capacidade de germinação simbiótica *in vitro*. Os isolados micorrízicos identificados como *Epulorhiza* foram binucleados, já os isolados de *Rhizoctonia* tanto micorrízicos quanto fitopatogênicos foram multinucleados, e a condição nuclear não foi observada nos isolados endofíticos.

No teste enzimático para produção de polifenol oxidase, os isolados obtidos de *C. saintlegerianum* não produziram o halo de cor âmbar, ou seja, não houve produção de polifenol oxidase. Por outro lado, dois isolados de *E. nocturnum* produziram polifenol

oxidase enquanto, os isolados fitopatogênicos não cresceram em meio contendo Ácido tânico. Os isolados de *Xylaria* sp. produziram halo de cor âmbar, ou seja, houve produção de polifenol oxidase, como também foi observado por Baldrian (2006) onde cepas de *Xylaria polymorpha* e *Xylaria hypoxylon* também produziram grandes quantidades de polifenol oxidases em meio de cultivo específico.

Em outro trabalho (Carvalho et al., 2012b) mostraram que este mesmo isolado micorrízico apresentou maior halo de inibição *in vitro* para *Magnaporthe oryzae* que causa a brusone do arroz, evidenciando assim um possível papel no controle biológico desse patógeno como antagonista. Portanto a identificação de metabólitos secundários desse isolado pode levar à produção de moléculas bioativas com potencial de aplicação no controle da brusone, reduzindo assim os custos de produção com agrotóxicos, proporcionando também uma agricultura mais sustentável.

Sousa (2012) também realizou dois experimentos de germinação simbiótica de sementes de *C. saintlegerianum*, ambos em fotoperíodo de 16/8 h (Luz/Escuro) a  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  com os mesmo isolados fúngicos. Testou-se três meios de cultivo, mas somente o meio ágar aveia padrão proporcionou a germinação. Verificou-se que o isolado *Rhizoctonia* sp. oriundo de *E. nocturnum* foi o melhor para germinar as sementes com 81,64 e 90,73% de germinação nos experimentos 1 e 2, respectivamente. Observou-se que um isolado inespecífico, dois isolados fitopatogênicos e um específico foram eficientes em germinar as sementes de *C. saintlegerianum*. Sendo assim, para a germinação simbiótica *in vitro* de *C. saintlegerianum* não ocorreu especificidade entre a orquídea e um único fungo rizoctonioide.

#### 2.4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS RIZOCTONIOIDES MICORRÍZICOS E FITOPATOGÊNICOS

A diversidade dos isolados micorrízicos de orquídeas é estudada pela análise da variabilidade existente entre os pertencentes a diferentes gêneros, a um mesmo gênero ou a uma mesma espécie (Horton & Bruns, 2001; Rasmussen, 2002; García et al., 2006). Para isso, utiliza-se a comparação entre características morfológicas e moleculares, e as

últimas foram avaliadas por meio de diferentes técnicas baseadas na composição do DNA total desses fungos (Rasmussen, 2002; Taylor et al., 2002; Pereira et al., 2009).

A análise da sequência da região ITS do gene nuclear ribossomal é uma técnica molecular utilizada para identificação de fungos micorrízicos de orquídeas (Taylor et al., 2002; Dearnaley, 2007) e para estudar a variabilidade inter e intraespecífica de fungos rizoctonioides (Sharon et al., 2008). Outra técnica molecular utilizada no estudo da diversidade destes fungos é a ITS-RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) (Lanfranco et al., 1998; Shefferson et al., 2007).

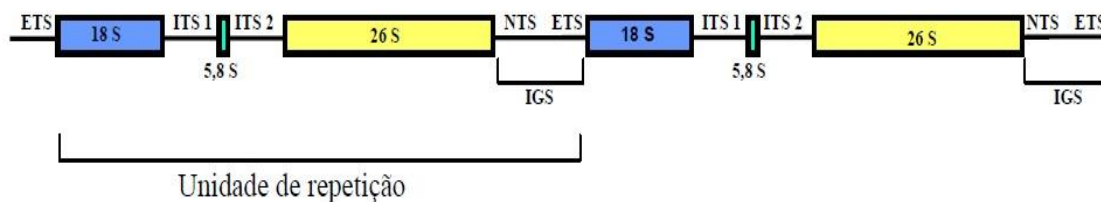
### 2.4.1. Região ITS

As sequências de DNA que codificam RNAs ribossomais foram amplamente usadas para estudar variações, relações taxonômicas e filogenéticas em fungos (Lanfranco et al., 1998). Dentre os sistemas de marcadores de DNA não codificantes o mais utilizado é o nuclear ITS. Esta região possui herança biparental e está presente em quase todos os organismos, exceto em vertebrados. Apresenta rápida evolução comparada com regiões como *rbcL* (grande subunidade da carboxilase ribulose-bifosfato) que possui uma evolução relativamente mais lenta, e é muito utilizado para solucionar questões entre espécies correlacionadas (Calonje et al., 2009).

As regiões não codificantes do genoma são mais utilizadas em estudos filogenéticos, por acumularem mutações, e por apresentarem diferentes taxas de mutações (Dutra, 2008). Uma região hipervariável, curta e intercalada entre as sequências que são conservadas dos genes servem de base para que *primers* de PCR possam ser confeccionados para parear com as regiões conservadas e amplificar o DNA interno mais variável. Regiões ITS são compostas por fragmentos curtos de DNA hipervariável localizados próximo às regiões ribossomais 5.8S denominadas pequenas subunidades ribossomais (SSU), 18S e 26S grandes subunidades ribossomais (LSU) (Trigiano et al., 2010).

O rDNA nuclear em fungos é organizado como uma unidade de rDNA, que é repetida em *tandem* e apresentam um alto número de cópias no genoma do fungo. (Edel; Lanfranco et al., 1998; Arruda, 2005). Uma unidade é composta por três subunidades gênicas, a pequena subunidade 18S, a 5.8S e a grande subunidade 26S. Nessas unidades os

genes são separados por espaços internos transcritos (ITS1 e ITS2) e espaçadores intergênicos (IGS) que estão representados na Figura 3 (Edel; Lanfranco et al., 1998; Salles & Souza, 1998).



**Figura 3.** Unidades de repetição e subunidades gênicas da região ITS1 e ITS2 (espaço interno transcrito) do gene nuclear ribossomal. ETS: Espaço externo transcrito, NTS: Espaço não transcrito, IGS: Espaçadores intergênicos. Fonte: (Dutra, 2008).

A subunidade 18S evolui de uma forma relativamente lenta e é bastante útil para comparar organismos distantemente relacionados. Já algumas regiões 26S são bastante variáveis dentro de espécies (Edel, 1998). As regiões ITS são geralmente constantes, ou apresentam pequena variação dentro de espécies, mas são bastante distintas entre espécies de um gênero (Lanfranco et al., 1998).

A região ITS é bastante útil em estudos de caracterização molecular de fungos micorrízicos e para outros fungos também por quatro motivos principais, como (i) a região ITS é relativamente curta (500-800pb), portanto pode ser facilmente amplificada por PCR, utilizando pares de *primers* universais únicos que são complementares a regiões conservadas dentro dos genes da subunidade do rRNA; (ii) a natureza multicópia da repetição de rDNA torna fácil a amplificação de regiões pequenas, diluídas ou amostras de DNA altamente degradadas (Lanfranco et al., 1998; Arruda, 2005); (iii) a região ITS pode ser altamente variável entre espécies morfológicamente distintas (Lee & Taylor, 1992; Arruda, 2005) e dados de restrição para ITS-RFLP gerados podem ser utilizados para estimar distâncias genéticas, fornecendo caracteres para análises sistemáticas e filogenéticas (Bruns et al., 1991); (iv) sondas ITS-PCR geradas espécie – específicas podem ser produzidas rapidamente sem a necessidade de se produzir uma biblioteca genômica. Muitos pesquisadores selecionaram sequências da região ITS para desenvolver

sondas espécie – específicas, porque as sequências ocorrem em múltiplas cópias (Lanfranco et al., 1998).

#### **2.4.2 Filogenia molecular e diversidade genética de fungos micorrízicos**

Filogenia pode ser conceituada como a junção da historia ancestral com as relações evolutivas, com base em caracteres morfológicos e evolutivos ao longo do tempo (Amorim, 2002; Valadares, 2009). As análises filogenéticas têm como objetivos a reconstrução de genealogias mais apropriadas para os organismos, e a inferência do tempo de diversificação entre os organismos e seus ancestrais. Também pode ser utilizada para inferir a historia comum dos genes por meio de suas relações (Lemey et al., 2009).

A identificação precisa de fungos micorrízicos de orquídeas empregando-se técnicas moleculares é muito importante para que se possa analisar qual é a amplitude filogenética de fungos compatíveis com orquídeas (Bonnardeaux et al., 2007). O conhecimento da identidade e da especificidade dos fungos que colonizam orquídeas é importante para determinar como as orquídeas são sensíveis às mudanças de habitat, e como consequência dessa mudança ocorrem também variações nos fungos que as colonizam. Por meio desse conhecimento é possível conservar as espécies de orquídeas ameaçadas de extinção (Bougoure et al., 2009).

A definição precisa de homologia de uma espécie por meio de estudos filogenéticos é arbitrária, mas se as sequências de rDNA apresentam similaridade variando em torno de 98-100% são consideradas pertencentes a indivíduos de mesma espécie. Similaridade abaixo desse valor principalmente em estudos das regiões ITS1 e ITS2 que apresentam uma rápida evolução, são mais prováveis de pertencerem a um mesmo gênero ou família do que a uma mesma espécie (Huynh et al., 2009).

Pereira (2001) utilizou o método de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA) para inferir distâncias genéticas entre sete isolados de orquídeas brasileiras, utilizando (PCR-RFLP) da região ITS1 e ITS2 do rDNA juntamente com dados morfológicos. A partir da análise das distâncias genéticas foi possível distinguir os isolados de *Epulorhiza* e *Ceratorhiza*, e inferir que os isolados de *Ceratorhiza*

provavelmente pertencem a espécies diferentes, pois são geneticamente distantes. Utilizando a mesma metodologia de agrupamento Valadares (2012), obtiveram três clados tanto por dados morfológicos quanto pelas análises moleculares por meio do sequenciamento da região ITS utilizando primers ITS1 e ITS4. Foi demonstrado que os clados do Brasil diferiram dos da Colômbia obtidos por Otero et al. (2004 e 2007), e um dos clados não encontrou similaridade no *GenBank* superior a 90%, sendo possivelmente um novo grupo dentro de *Ceratobasidium*. Verifica-se, portanto que estudos filogenéticos e de diversidade genética de fungos micorrízicos em orquídeas tem um papel importante na seleção de fungos específicos para a utilização em programas de micorrização controlada, reintrodução, manejo e conservação de orquídeas.

### **2.4.3 Especificidade micorrízica por meio da filogenia molecular**

Estudos moleculares filogenéticos facilitam a análise da especificidade entre orquídea e micorriza, nesse contexto podemos definir especificidade micorrízica como a amplitude filogenética das associações entre taxas distintos (Otero et al., 2007). Algumas espécies de orquídeas apresentam níveis variados de especificidade micorrízicas e amplitude filogenética de fungos micorrízicos revelando assim algumas características evolutivas destas (Otero et al., 2004; Shefferson et al., 2007; Yuan et al., 2010).

Para se discutir a especificidade entre orquídea e fungos micorrízicos é necessário que se compreenda as relações filogenéticas de ambos os grupos (Otero et al., 2004). Na relação específica uma orquídea interage com taxa de fungos contidos dentro de um único e restrito clado filogenético. Entretanto, antes acreditava-se que existia uma ampla gama de táxons fúngicos em interações micorrízicas com orquídeas, mas estudos recentes de filogenia molecular mostram que o número de táxons não é assim tão grande (Bougoure et al., 2005). Estudos mostraram que as relações entre orquídea e fungo micorrízico são consideradas as mais específicas, quando comparados a outros sistemas micorrízicos existentes em outras plantas que são generalistas, e portanto, exibem amplas associações micorrízicas (Otero et al., 2007; Shefferson et al., 2007).

Uma explicação para isso é o fato de que embora, as orquídeas possam apresentar filogeneticamente vários fungos micorrízicos, estes desempenham melhor suas

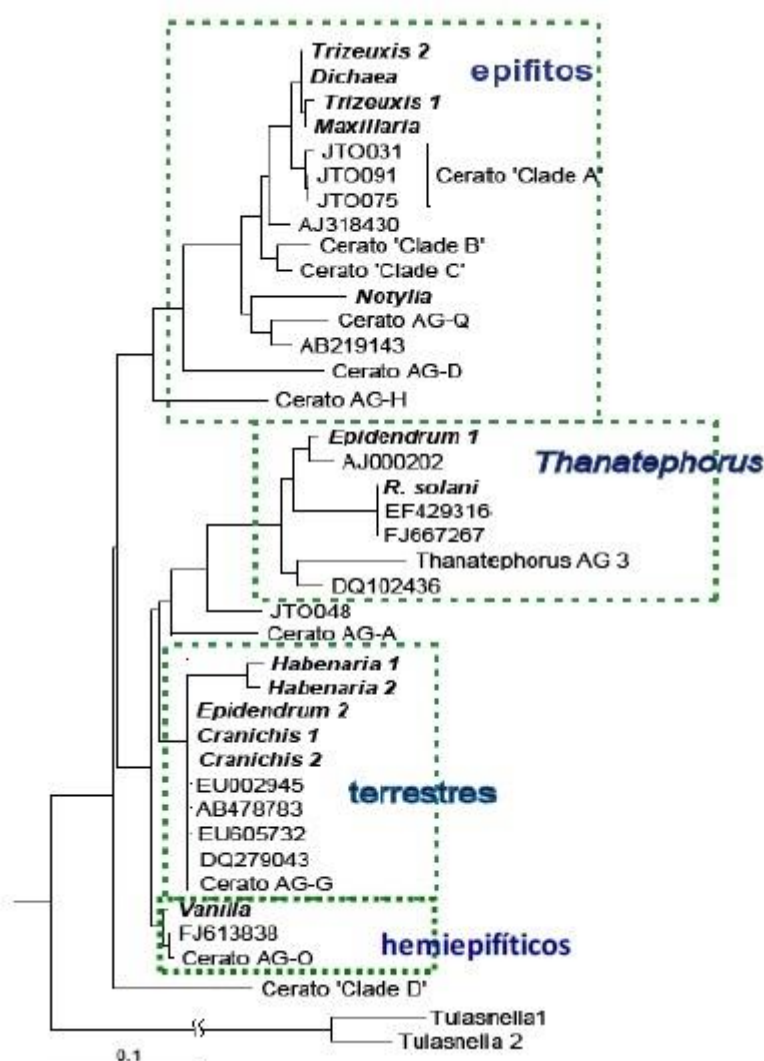
funções com associações específicas (Otero et al., 2007). Portanto verifica-se que em cada etapa da vida da orquídea esta é colonizada por subconjuntos específicos de fungos micorrízicos (Bidartondo & Read, 2008; Chen et al., 2012).

Acredita-se também que as plantas de orquídeas possuam a característica de escolha de seu parceiro fúngico, assim são mais específicos e isso se deve a ação da seleção natural (Bruns et al., 2002). Por isso, que durante a história evolutiva das orquídeas certas linhagens fúngicas foram abandonadas e outras foram favorecidas. Isso implica na existência de linhagens que são mais vantajosas para orquídeas do que outras, e assim elas tenham selecionado dentro da comunidade fúngica o melhor fungo que supra suas necessidades nutricionais (Rasmussen & Rasmussen, 2009).

Outra hipótese que influencia na especificidade micorrízica e na diversidade filogenética são os diferentes padrões de distribuição geográficos de fungo micorrízicos. Os fungos simbiotes apresentam uma estreita distribuição geográfica, dificultando sua associação com as orquídeas favorecendo a especificidade por não apresentar simbiotes alternativos. Uma possível justificativa para essa assimetria está no fato dos fungos micorrízicos de orquídeas não serem dependentes da orquídea para sua dispersão e reprodução, podendo sobreviver não apenas como simbiote, mas também como saprófitas ou parasitas. Portanto é pouco provável que os fungos evoluíram apenas em resposta às orquídeas, já que eles são muito menos limitados na sua escolha do hospedeiro, do que a orquídea que apresenta uma restrição filogenética na escolha de seu simbiote (Jacquemyn et al., 2011; Martos et al., 2012).

Os trabalhos demonstraram que alguns gêneros de orquídeas epífitas e terrestres são extremamente específicos, ou seja, apresentam estreita gama filogenética de fungos micorrízicos (Yuan et al., 2010). Martos et al. (2012) ainda sugerem que associações epífitas são mais conservadoras e podem coevoluir mais do que as terrestres. Essa especialização filogenética mais estreita foi provavelmente ocasionada pelas condições de vida bem mais estressantes em nichos de epífitas do que terrestres. Uma hipótese para isso está no fato de que os nichos de epífitas forçaram uma maior cooperação entre orquídeas e fungos, pois crescem em condições abióticas extremas de ambiente seco, alta luminosidade e baixa disponibilidade de nutrientes. Portanto, os fungos de orquídeas terrestres formam um clado diferente do de epífitas, essa associação entre filogenia e habitat já é esperada, pois muitos grupos de orquídeas mudam seus parceiros micorrízicos

de acordo com a mudança de habitat (Mosquera-Espinosa et al., 2012). Por exemplo, os fungos de raízes de *Vanilla poitaei* Rchb. f. obtidos de plantas que se encontravam no solo e na casca da árvore diferiram filogeneticamente de forma significativa entre si (Figura 4), em que isolados de *Ceratobasidium* spp. foram mais comuns em raízes obtidas do solo e *Tulasnella* spp. em raízes obtidas da casca de árvore (Porrás-Alfaro & Bayman, 2007; Mosquera-Espinosa et al., 2012). Evidenciando, portanto que de acordo com o habitat a diversidade filogenética de fungos que interagem com as orquídeas podem ser diferentes.

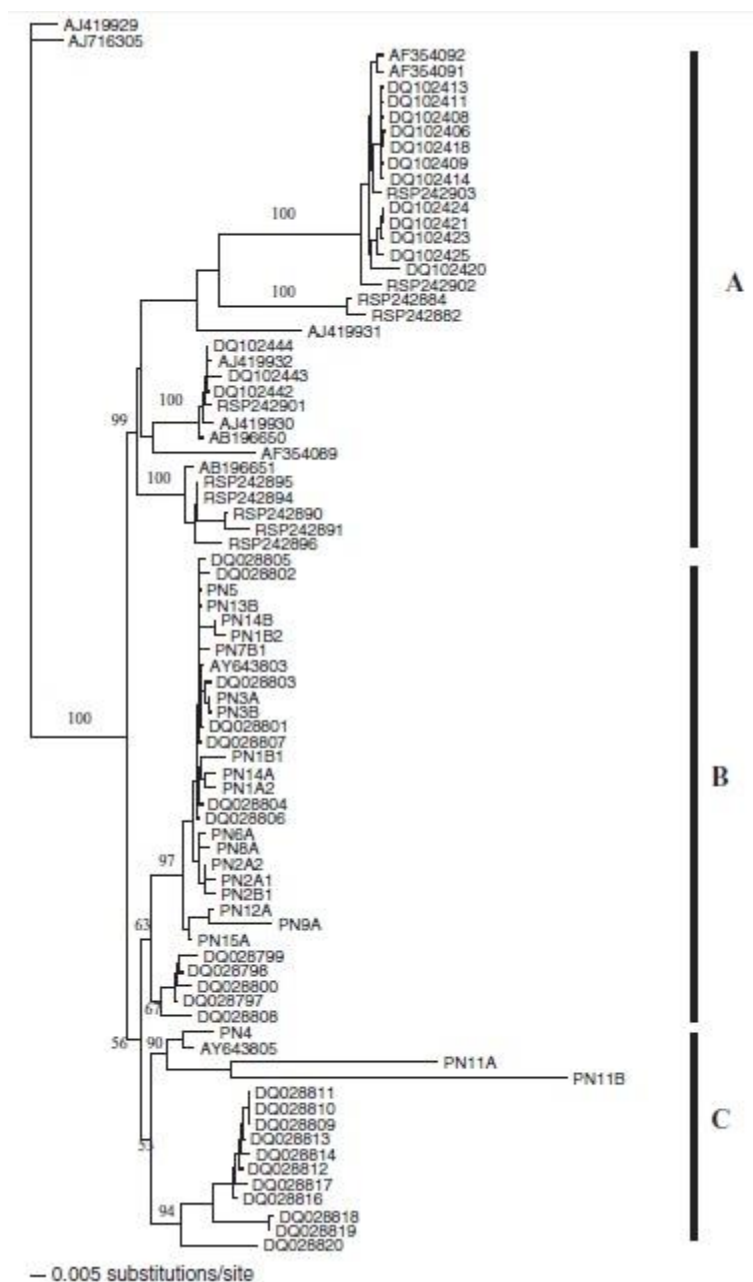


**Figura 4.** Filogenia de *Ceratobasidium* com base na análise de Máxima Verossimilhança (ML) obtida a partir da análise da região ITS dos isolados de orquídeas epífitas e terrestres. As sequencias de *Tulasnella* correspondem ao *outgroup* (Mosquera Espinosa, 2010).

Em outro trabalho, Yuan et al. (2010) observaram que os fungos diferem quanto à capacidade de se desenvolverem em diferentes condições ecológicas, resultando em mudanças na amplitude filogenética das suas associações micorrízicas para se adaptarem às alterações ambientais. A mudança de simbiontes pela orquídea em novos ambientes tem implicações na conservação *ex situ* destas que se encontram ameaçadas de extinção. A capacidade da planta em alternar sua associação entre fungos é uma forte adaptação a ambientes severos, demonstrando que as associações entre orquídea e fungo são sensíveis a estímulos ambientais favorecendo a sobrevivência dos simbiontes. A especificidade da orquídea pode limitar a distribuição das espécies e também a capacidade de sobrevivência das plantas transplantadas, no entanto a plasticidade e sua amplitude filogenética adaptável às condições de seu habitat faz com que a conservação *ex situ*, e a propagação por meio de micorrização sejam possíveis.

#### **2.4.4 Filogenia de Fungos Micorrízicos/Endofíticos e Fitopatogênicos**

Análises filogenéticas baseadas em regiões ITS1 e ITS2 separaram os táxons de fungos associados a orquídeas dos não associados a estas plantas. Irwin et al. (2007) sugerem que espécies de *Ceratobasidium* fitopatogênicas são muito diferentes das espécies micorrízicas, pois formaram clados distintos (Figura 5). O que demonstra que o tipo de interação entre fungo e planta pode variar de acordo com as condições ambientais e do hospedeiro, fazendo com que as linhagens fúngicas ancestrais se divergissem formando novas linhagens.



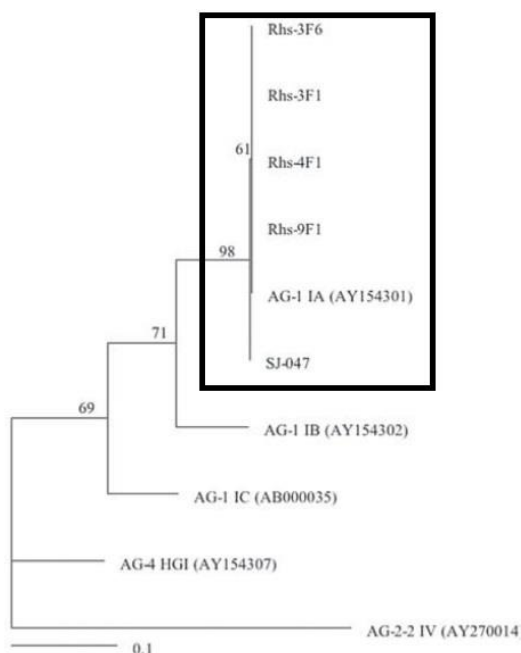
**Figura 5.** Filogenia de *Ceratobasidium*-like com base no método neighborjoining (NJ) obtida a partir da análise da região ITS. **A:** Isolados não derivados de orquídeas (fitopatogênicos); **B e C:** Isolados derivados de orquídeas (micorrízicos) (Irwin et al., 2007).

Peláez et al. (2008) inferiu as relações evolutivas de alguns gêneros endofíticos (*Xylariaceae*) por meio de estudos filogenéticos, com o objetivo de se obter uma visão precisa sobre as relações evolutivas dos gêneros dentro da família *Xylariaceae* utilizando quatro métodos diferentes de análises de sequência (Parcimônia, Neighbor-joining,

máxima verossimilhança e análise Bayesiana). As reconstruções filogenéticas mostraram um razoável grau de correlação entre os dados de sequência e as propostas de esquemas de classificação morfológica só para alguns gêneros dentro da família. Este estudo sugere a necessidade de uma nova revisão dos conceitos genéricos dentro do Xylariaceae.

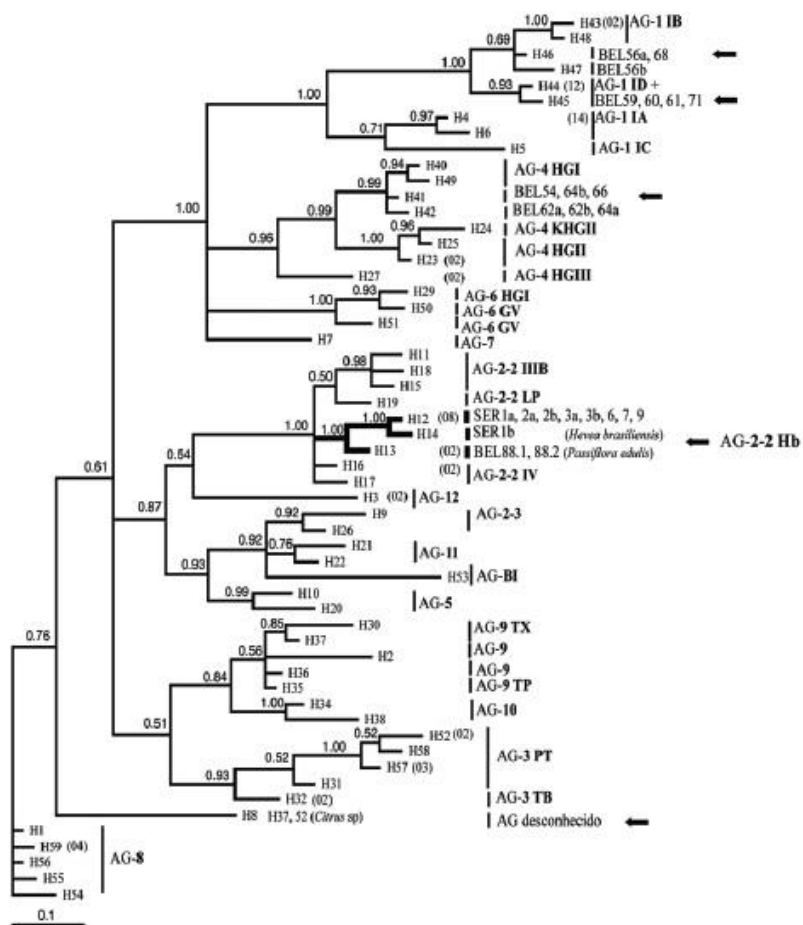
Mosquera-Espinosa et al. (2012) demonstraram por meio de análise filogenética das regiões ITS1 e ITS2 utilizando *primers* ITS1 e ITS4 que *Thanatheporus* sp. (fitopatígeno) formou um clado (Figura 4) dentro de *Ceratobasidium* corroborando a hipótese de que esse gênero é parafilético como relatado por Porras-Alfaro & Bayman (2007). Este clado é composto principalmente por fungos fitopatogênicos incluindo um importante patógeno do arroz da Colômbia, mas inclui também isolados micorrízicos da Colômbia e Porto Rico. Além disso alguns dos isolados micorrízicos de *Ceratobasidium* promoveram a germinação das sementes de orquídeas.

Souza et al. (2007) determinaram os grupos de anastomose (AGs) de isolados de *R. solani* associados ao arroz no estado do Tocantins, testando a hipótese de que os isolados pertencem ao grupo AG-1 IA, que é o causador da queima da bainha em arroz, e também da mela da soja. A análise filogenética feita a partir da região ITS do rDNA, mostrou a formação de um único grupo filogenético formado pelos isolados do arroz, da soja e do controle AG-1 IA (Figura 6). Sendo assim foi confirmada a hipótese de que os isolados de *R. solani* patogênicos ao arroz do Tocantins pertencem ao AG-1 IA, bem como indicou que esses isolados também podem ser os causadores da mela na soja (Sousa, 2012).

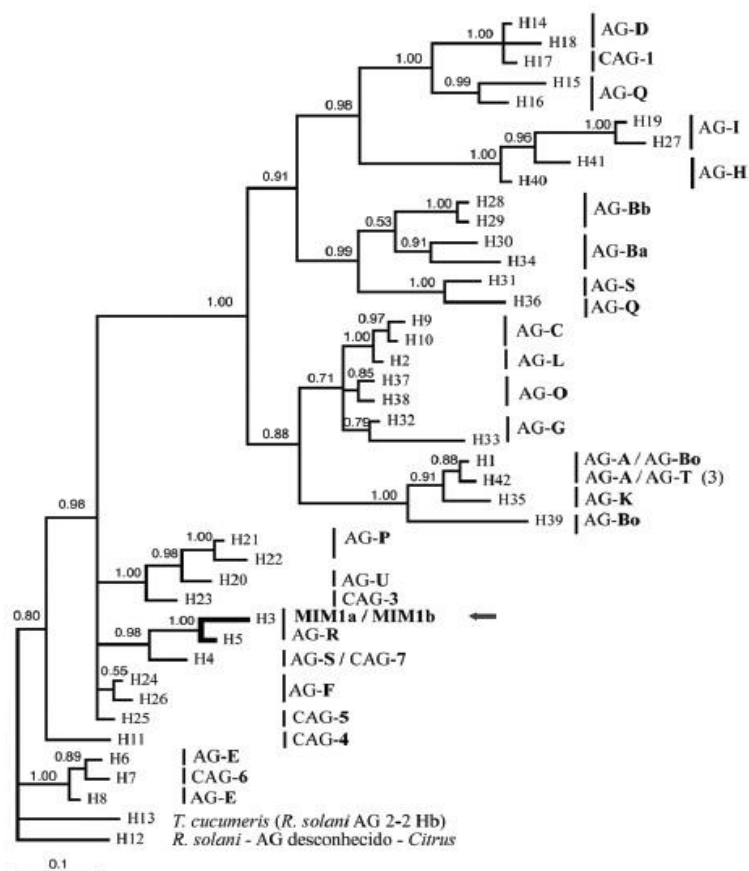


**Figura 6.** Análise filogenética da região ITS do rDNA por MV (Máxima Verossimilhança), os isolados de arroz e de soja formaram um único grupo filogenético com o grupo AG1-IA, com 98% de suporte estatístico por meio de análise de *bootstrap*. Adaptado de (Souza et al., 2007).

Gaino et al (2010) estudaram a filogenia de isolados de *T. cucumeris* fase anamórfica de *R. solani* e *Ceratobasidium* spp. que é o agente causal da mancha areolada em seringueira, obtidos de seringueira e de outras espécies nativas ou cultivadas que não incluem orquídeas. A determinação de AG foi efetuada com base em análise filogenética da região ITS-5.8S do rDNA com *primers* ITS4 e ITS5. A filogenia de *R. solani* e *Ceratobasidium* spp. pela região ITS foi considerada uma ferramenta confiável na distinção de AGs. Com este estudo obteve-se um novo grupo de *R. solani* (AG-2-2 Hb) (Figura 7), que distinguiu-se de outros grupos de anastomose (AG-1 IB e ID, AG-4 HGI) de *Ceratobasidium* sp. (AG-R) (Figura 8) que também infectaram a seringueira. Com a distinção dessa grande diversidade de AGs obtida por meio da caracterização filogenética foi possível perceber a necessidade de obtenção de clones resistentes a mais de um AG (Gaino et al., 2010).



**Figura 7.** Árvore filogenética ilustrando as relações entre haplótipos da região ITS-5.8S dos AGs de *R. solani* (AG-1 a AG-12 e AG-BI) e o grupo de isolados de *T. cucumeris* (*R. solani*) obtidos de *Hevea brasiliensis* e diversas outras espécies cultivadas ou nativas. Fonte: (Gaino et al., 2010).



**Figura 8.** Árvore filogenética ilustrando as relações entre haplótipos da região ITS-5.8S dos AGs de *Ceratobasidium* sp. (AG-A a AG-U e CAG-1 a CAG-7) e o grupo de isolados obtido de *Mimosa* sp., espécie nativa da Amazônia brasileira. Esta árvore foi enraizada com a sequência da região ITS-5.8S de *T. cucumeris* (*R. solani* AG-2-2 Hb da seringueira). Fonte: (Gaino et al., 2010).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL FÚNGICO

Os fungos utilizados no presente trabalho foram obtidos por Sousa (2012), sendo cinco de *C. saintlegerianum* e cinco de *E. nocturnum*. Também foram utilizados dois isolados de *Rhizoctonia* spp. fitopatogênicos ao arroz e dois ao feijão (Tabela 1), pertencentes à coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão.

**Tabela 1.** Isolados fúngicos e sua classificação com base em caracteres morfológicos, código do isolado, gênero e planta de origem.

<b>Código do isolado</b>	<b>Gênero</b>	<b>Planta de origem</b>
<b>En07</b>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>E. nocturnum</i>
<b>Cs16</b>	<i>Xylaria</i> sp.	<i>C. saintlegerianum</i>
<b>Cs18</b>	<i>Xylaria</i> sp.	<i>C. saintlegerianum</i>
<b>Rh21180</b>	<i>R. solani</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<b>RH24F1</b>	<i>R. solani</i>	<i>P. vulgaris</i>
<b>Ro88</b>	<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>
<b>Ro93</b>	<i>R. oryzae</i>	<i>O. sativa</i>

Os fungos foram mantidos em meio BDA (batata 200g, dextrose 20g e Agar 20g) até sua posterior repicagem para meio líquido BD (batata 200g, dextrose 20g), bem como para manutenção da micoteca para estudos posteriores.

No presente estudo levou-se em consideração a classificação taxonômica dos fungos alcançada realizada por meio dos dados morfológicos quantitativos e qualitativos das espécies de orquídeas *C. saintlegerianum* e *E. nocturnum* obtidos por Sousa (2012). Assim como a classificação das espécies fitopatogênicas feita na Embrapa Arroz e Feijão.

### 3.2 DADOS MORFOLÓGICOS

Os caracteres morfológicos obtidos por Sousa (2012) dos isolados fúngicos de *C. saintlegerianum* e *E. nocturnum* utilizados para comparação com os dados moleculares foram o micélio aéreo, margem, aspecto do micélio, cor do isolado e a condição nuclear. Também foram usados os dados de produção de polifenol oxidase dos isolados pela mesma autora (Tabela 2).

**Tabela 2.** Caracteres morfológicos como presença de micélio aéreo, formato da margem, aspecto e cor do micélio dos isolados rizoctonioides de *C. saintlegerianum* e *E. nocturnum*, e também dos isolados de *Xylaria* sp. obtidos de *C. saintlegerianum* e teste de Polifenol Oxidase obtidos por Sousa (2012) utilizados no presente trabalho.

<b>Código do isolado</b>	<b>Gênero/ Espécie</b>	<b>Micélio Aéreo</b>	<b>Margem</b>	<b>Aspecto do micélio</b>	<b>Cor do isolado</b>	<b>Condição nuclear</b>	<b>Teste de Polifenol Oxidase</b>
<b>En02</b>	<i>Epulorhiza</i> sp.	Abundante	Aérea	Grumoso	Creme	Binucleada	Sim
<b>En03</b>	<i>Epulorhiza</i> sp.	Abundante	Submersa	Floculento	Branco	Binucleada	Não
<b>En05</b>	<i>Epulorhiza</i> sp.	Escasso	Aérea	Grumoso	Creme	Binucleada	Sim
<b>En07</b>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	Escasso	Submersa	Mucoso	Creme	Multinucleada	Sim
<b>En24</b>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	Abundante	Aérea	Floculento	Creme	Multinucleada	Sim
<b>Cs02</b>	<i>Epulorhiza</i> sp.	Escasso	Submersa	Floculento	Branco	Binucleada	Não
<b>Cs10</b>	<i>Epulorhiza</i> sp.	Abundante	Aérea	Mucoso	Marrom	Binucleada	Não
<b>Cs16</b>	<i>Xylaria</i> sp.	Abundante	Aérea	Floculento	Branco e cinza	*	Sim
<b>Cs18</b>	<i>Xylaria</i> sp.	Escasso	Aérea	Grumoso	Branco e marrom	*	Sim
<b>Cs21</b>	<i>Epulorhiza</i> sp.	Escasso	Submersa	Floculento	Branco	Binucleada	Não
<b>Rh21180</b>	<i>R. solani</i>	Escasso	Aérea	Grumoso	Branco e marrom	Multinucleada	Não
<b>Rh24F1</b>	<i>R. solani</i>	Escasso	Aérea	Grumoso	Marrom	Multinucleada	Não
<b>Ro88</b>	<i>R. oryzae</i>	Abundante	Aérea	Cotonoso	Salmão	Multinucleada	Não
<b>Ro93</b>	<i>R. oryzae</i>	Abundante	Aérea	Cotonoso	Salmão	Multinucleada	Não

\* Caráter não avaliado

### 3.3 DADOS MOLECULARES

Foram utilizados além das sequências ITS de isolados rizoctonioides e de *Xylaria* obtidos no presente estudo algumas obtidas do *GenBank* que são próximas aos grupos estudados e algumas distantes, para ampliação do número de espécies favorecendo assim a análise comparativa e filogenética dos isolados (Tabela 3 e 4).

**Tabela 3.** Espécies, número de acesso, fonte, origem e autor dos isolados rizoctonioides de *C. saintlegerianum* e *E. nocturnum*, bem como as obtidas do *GenBank*.

Espécie	Número de Acesso NCBI/ <i>GenBa nk</i>	Fonte	Origem	Autor
<i>R. solani</i>	GU206548	<i>O. sativa</i>	Colombia	Mosquera, A. T. et al. (não publicado)
<i>Thanatephorus cucumeris</i> / anamorfo: <i>R. solani</i>	FJ667267	<i>O. sativa</i>	Japão	Aye, S. S. & Matsumoto, M. (não publicado)
<i>T. cucumeris</i>	FJ667262	<i>O. sativa</i>	Japão	Aye, S. S. & Matsumoto, M. (não publicado)
<i>R. solani</i> (Rh24F1)*	-	<i>O. sativa</i>	Embrapa Arroz e Feijão (Go) Brasil	Embrapa Arroz e Feijão (Go) Brasil
<i>R. solani</i> (Rh21180)*	-	<i>P. vulgaris</i>	Embrapa Arroz e Feijão (Go) Brasil	Embrapa Arroz e Feijão (Go) Brasil
<i>R. solani</i>	AF308623	<i>P. vulgaris</i>	USA	Godoy-Lutz,G. et al. (2008)
<i>Thanatephorus sp.</i>	DQ278950	<i>P. vulgaris</i>	Brasil	Nakatani, A. K et al. (2006) (tese)
<i>R. solani</i>	AF153793	<i>Glycine max</i>	Australia	Pope,E.J. and Carter,D.A. (2001)
<i>R. solani</i>	JQ911746	<i>Glycine max</i>	India	Baiswar,P. and Ngachan,S.V. (2012) (Não publicado)
<i>R. solani</i>	JQ616871	<i>Nicotiana tabacum</i>	Argentina	Mercado Cardenas,G.E. and Galvan,M.Z. (Não publicado)
<i>R. solani</i>	HQ241274	<i>Nicotiana tabacum</i>	USA	LaMondia,J.A. and Vossbrinck,C.R.
<i>R. solani</i>	KF892039	<i>Solanum</i>	Tunisia	Mrabet,M. (Não publicado)

		<i>tuberosum</i>		
<i>R. solani</i>	AB905380	<i>Solanum tuberosum</i>	Egito	Moussa, T.A. et al. (Não publicado)
<i>R. solani</i>	AY964637	<i>Zea mays</i>	India	Srinivas, P. et al. (2005)
<i>R. zaeae</i>	KC620577	<i>Zea mays</i>	Brasil	Gurkanli, C.T. et al. (2013)
<i>R. solani</i>	JQ616858	<i>Sorghum</i> sp.	Argentina	Mercado Cardenas, G.E. and Galvan, M.Z. (Não publicado)
<i>R. zaeae</i>	JQ350869	<i>Sorghum halepense</i>	Iran	Telmadarrehei, T. et al., (2012)
<i>R. oryzae (Ro88)*</i>	-	<i>O. sativa</i>	Embrapa Arroz e Feijão (Go) Brasil	Embrapa Arroz e Feijão (Go) Brasil
<i>R. oryzae (Ro93)*</i>	-	<i>O. sativa</i>	Embrapa Arroz e Feijão (Go) Brasil	Embrapa Arroz e Feijão (Go) Brasil
<i>R. oryzae</i>	FJ766521	<i>O. sativa</i> cv. <i>Sinthwelatt</i>	Japão	Aye, S. S. & Matsumoto, M. (não publicado)
<i>R. oryzae</i>	HE612882	<i>O. sativa</i>	Índia	Banerjee, S. et al. (não publicado)
<i>R. oryzae (teleomorfo Waitea circinata)</i>	DQ356417	<i>Hordeum vulgare</i>	USA	Okubara, P.A., et al., (2008)
<i>R. oryzae-sativae (Teleomorfo: Ceratorhiza oryza-sativae)</i>	FJ667257	<i>O. sativa</i>	Japão	Aye, S. S. et al. (2009)
<i>R. oryzae</i>	KC590601	<i>Triticum</i> sp.	Turquia	Unal, F. (2013) (Não publicado)
<i>R. oryzae</i>	JQ350872	<i>Bainha Zea mays</i>	Iran	Telmadarrehei, T. et al., (2012) (Não publicado)
<i>R. oryzae</i>	EU809420	<i>O. sativa</i>	AGRISUL (Argentina)	Barrera, V., et al., (2008) (Não publicado)
<i>Rhizoctonia</i> sp. ( <i>En07</i> )*	-	<i>E. nocturnum</i> ( <i>Orchidaceae</i> )	Brasil	Sousa (2012)
<i>Rhizoctonia</i> sp.	AJ318444	<i>Oncidium varimyce</i> ( <i>Orchidaceae</i> )	Singapura	Ma, M. (2001) (Tese)
<i>Rhizoctonia</i> sp.	AJ318430	<i>Aranda brite</i> Ng. ( <i>Orchidaceae</i> )	Singapura	Ma, M. (2001) (Tese)
<i>Rhizoctonia</i> sp.	AJ318431	<i>Arachnis</i>	Singapura	Ma, M. (2001) (Tese)

		<i>Maggie oei</i> ( <i>Orchidaceae</i> )		
<i>Rhizoctonia sp.</i>	AJ318423	<i>Phaleanosis</i> ( <i>Orchidaceae</i> )	Singapura	Ma, M. (2001) (Tese)
<i>Rhizoctonia sp.</i>	HQ713501	<i>Sacoila</i> <i>australis</i> ( <i>Orchidaceae</i> )	Argentina	Fernandez Di Pardo, A. et al. (não publicado)
<i>Rhizoctonia sp.</i>	HQ853687	<i>Dendrobium</i> <i>nobile</i> ( <i>Orchidaceae</i> )	China	Chen,J. and Guo,S. X., (2011) (não publicado)
<i>Rhizoctonia alliance</i> ( <i>teleomorfo:</i> <i>Ceratorhiza</i> )	EF160072	<i>Pterostylis</i> <i>recurva</i> ( <i>Orchidaceae</i> )	Australia	Bonnardeaux,Y., et al., (2006)
<i>Ceratorhiza oryza-</i> <i>sativae</i>	HE964993	<i>O. sativa</i>	India	Banerjee,S.B. et al., (2012) (Não publicado)
<i>Ceratorhiza hydrophila</i>	JQ359765	<i>O. sativa</i>	Iran	Amirmijani,A., et al. (2012) (Não publicado)
<i>Ceratorhiza sp.</i>	KF171076	<i>Solo</i>	Cuba	Gonzalez-Garcia,M. (2013) (Não publicado)
<i>Ceratorhiza sp.</i>	KF171075	<i>O. sativa</i>	Cuba	Gonzalez-Garcia,M. (2013) (Não publicado)
<i>Ceratorhiza sp.</i>	KF171070	<i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i>	Cuba	Gonzalez-Garcia,M. (2013) (Não publicado)
<i>Ceratorhiza sp.</i>	KF171069	<i>P. vulgaris</i>	Cuba	Gonzalez-Garcia,M. (2013) (Não publicado)
<i>Ceratorhiza sp.</i>	KF171068	<i>Begonia sp</i>	Cuba	Gonzalez-Garcia,M. (2013) (Não publicado)
<i>Ceratorhiza oryza-</i> <i>sativae</i>	KC428404	<i>Rizoma de</i> <i>Gengibre</i>	India	Devi,I.S. (2012) (Não publicado)
<i>Ceratorhiza sp.</i>	HQ127084	<i>Epipedrum</i>	Brasil	Pereira, M.C. and Kasuya, M.C.M. (2010) (Não publicado)
<i>Ceratorhiza sp.</i>	HM751797	<i>Bletilla</i> <i>ochracea</i> <i>Arthrochilus</i>	China	Tao,G., et al., (2010) (Não publicado)
<i>Tulasnella sp.</i>	KF476601	<i>oreophilus</i> ( <i>Orchidaceae</i> )	Australia	Linde,C.C., et al., (2013)
<i>Tulasnella sp.</i>	KF476577	<i>Drakaea</i> <i>glyptodon</i> ( <i>Orchidaceae</i> )	Australia	Linde,C.C., et al., (2013)

<i>Tulasnella</i> sp.	KF476558	<i>Chiloglottis</i> <i>valida</i> ( <i>Orchidaceae</i> )	Australia	Linde,C.C., et al., (2013)
<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DQ388048	<i>Thelymitra</i> <i>epipactoides</i> F. Muell. ( <i>Orchidaceae</i> )	Alemanha	Suarez,J.P., et al. (2006)
<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DQ388046	<i>Thelymitra</i> <i>luteocilium</i> Fitzg. <i>Thelymitra</i>	Alemanha	Suarez,J.P., et al. (2006)
<i>Tulasnella calospora</i>	DQ388043	<i>Thelymitra</i> <i>aristata</i> Ldl. ( <i>Orchidaceae</i> )	Alemanha	Suarez,J.P., et al. (2006)
<i>Tulasnella calospora</i>	DQ388042	<i>Diuris maculata</i> Sm. ( <i>Orchidaceae</i> )	Alemanha	Suarez,J.P., et al. (2006)
<i>Tulasnella calospora</i> (Anamorfo: <i>Epulorhiza</i> <i>repens</i> )	KC796464	<i>Dendrobium</i>	China	Sheng,C.L., et al. (2013) (Não publicado)
<i>Tulasnella calospora</i> (Anamorfo: <i>Epulorhiza</i> <i>repens</i> )	KC796463	<i>Dendrobium</i>	China	Sheng,C.L., et al. (2013) (Não publicado)
<i>Tulasnella calospora</i> (Anamorfo: <i>Epulorhiza</i> <i>repens</i> )	KF537655	<i>Liparis japonica</i> ( <i>Orchidaceae</i> )	China	Chen, X. (2013)
<i>Epulorhiza</i> sp.	FJ940903	<i>Pecteilis</i> <i>susannae</i> (L.) Rafin ( <i>Orchidaceae</i> )	Tailandia	Chutima,R., et al. (2009)
<i>Epulorhiza</i> sp.	KC291639	<i>Hoffmannseggel</i> <i>la caulescens</i> ( <i>Orchidaceae</i> )	Brasil	Bocayuva,M.F., et al., (2012) (Não publicado)
<i>Epulorhiza</i> sp.	JX456569	<i>Epidendrum</i> <i>secundum</i> ( <i>Orchidaceae</i> )	Brasil	Pereira,M.C., et al., (2012) (Não publicado)
<i>Epulorhiza</i> sp.	JX456568	<i>Epidendrum</i> <i>secundum</i> ( <i>Orchidaceae</i> )	Brasil	Pereira,M.C., et al., (2012) (Não publicado)
<i>Epulorhiza</i> sp.	HQ127088	<i>Epidendrum</i> <i>denticulatum</i>	Brasil	Pereira,M.C. & Kasuya,M.C.M. (2010) (Não

<i>Epulorhiza sp.</i>	HQ127089	(Orchidaceae) <i>Epidendrum</i> <i>denticulatum</i>	Brasil	publicado) Pereira,M.C. & Kasuya,M.C.M. (2010) (Não publicado)
<i>Epulorhiza sp.</i>	AJ313449	(Orchidaceae) <i>Oncidium</i> <i>varimyce</i>	Singapura	Ma, M. et al., (2001)
<i>Epulorhiza epiphytica</i>	KC154068	<i>Raiz de</i> Orchidaceae	Brasil	Nogueira,R.E., et al., (2012) (Não publicado)
<i>Epulorhiza epiphytica</i>	JF907598	<i>Raiz de</i> Orchidaceae	Brasil	Almeida,P.R.M., et al. (2011) (Não publicado)
<i>Sebacina vermifera</i>	AF202728	<i>Isolado</i> <i>micorrízico de</i> <i>orquidea obtido</i> <i>por Warcup J.</i> <i>H.</i>	USA	Taylor,D.L., et al. 1999 (Não publicado)

---

\* Novas sequências obtidas no presente trabalho.

**Tabela 4.** Espécies, número de acesso, fonte, origem e autor dos isolados de *Xylaria* sp. obtidos de *C. saintlegerianum*, bem como as obtidas do *GenBank*.

Espécie	Número de Acesso NCBI/GenBank	Fonte	Origem	Autor
<i>Xylaria</i> sp. (Cs16)*	-	<i>C.</i> <i>saintlegerianum</i>	Brasil	Sousa (2012)
<i>Xylaria</i> sp. (Cs18)*	-	<i>C.</i> <i>saintlegerianum</i>	Brasil	Sousa (2012)
<i>Xylaria hypoxylon</i> (L.) Grev.	AY327477	Desconhecido	Desconhecido	Platas, G. et al. (2004)
<i>Xylaria hypoxylon</i>	AY909010	Tronco de Angiosperma	Holanda	Pelaez, F. et al. (2008)
<i>Xylaria hypoxylon</i>	AY909011	<i>Fagus sylvatica</i>	Holanda	Pelaez, F. et al. (2008)
<i>Xylaria hypoxylon</i>	AY909012	<i>Picea abies</i>	Holanda	Pelaez, F. et al. (2008)
<i>Xylaria longipes</i>	AY909015	Desconhecido	Espanha	Pelaez, F. et al. (2008)
<i>Xylaria hypoxylon</i>	JX427059	Tapetes microbianos hipersalinos	Porto Rico	Cantrell,S.A. et al. (2013)
<i>Xylaria persicaria</i>	AY909022	Desconhecido	Espanha	Platas,G. et al. (2008)
<i>Xylaria hypoxylon</i>	JN159673	<i>Stryphnodendron</i> <i>adstringens</i>	Brasil	Carvalho,C.R. et al. (2011)
<i>Xylaria multiplex</i> (Kunze) Fr.	AY909018	Madeira	Porto Rico	Pelaez, F. et al. (2008)
<i>Xylaria multiplex</i>	JQ814313	<i>Hevea</i> <i>brasiliensis</i>	Brasil	Deon,M. et al. (2012)
Cepa de Fungo Endofítico	JX155875	<i>Hevea</i> sp.	USA	Gazis,R.O. e Chaverri,P. (2012) Não publicado
<i>Xylaria mellissii</i>	AB376773	Folha de palmeira	Japão	Okane,I. et al. (2008)
<i>Xylaria</i> <i>ochraceostroma</i>	EU179869	Chão do pomar de manga	Taiwan	Ju,Y.-M. et al. (2007)
<i>Xylaria intraflava</i>	EU179866	Terra de plantação de Bambu	Taiwan	Ju,Y.-M. and Hsieh,H.-M. (2007)
<i>Xylaria</i> sp.	KF926669	<i>Bauhinia</i> <i>variegata</i>	China	Tang,A.M.C. et al.(2013) Não publicado
<i>Xylaria discolor</i>	JQ087411	<i>Ocotea foetens</i>	Taiwan	Ju,Y.-M. et al.(2011)
<i>Xylaria berteri</i>	KC473562	Casca	Taiwan	Fu,C.-H. et al. (2013) não publicado
<i>Xylaria feejeensis</i>	JX256824	Madeira podre	China	Ma,H., et al. (2012) Não publicado
<i>Xylaria hypoxylon</i>	AY327476	Não determinado	Espanha	Platas,G. et al. (2004)
<i>Xylaria hypoxylon</i>	AY327478	Não determinado	Espanha	Platas,G. et al. (2004)
<i>Hypoxylon</i> sp.	EU714405	<i>Annella</i> sp.	Tailândia	Preedanon,S. et al (2008) Não publicado
<i>Hypoxylon</i> sp.	KJ774042	Solo da praia	Malásia	Teh,L. Y. and Latiffah,Z. (2014) Não publicado
<i>Nodulisporium</i> sp.	KC894854	<i>Everniastrum</i> sp.	China	Sun,X. et al. (2013) Não publicado
<i>Nodulisporium</i> sp.	JQ968613	<i>Thelypteris</i> <i>angustifolia</i>	Índia	Riyaz-Ul-Hassan,S. et al. (2013)
<i>Trametes</i> <i>versicolor</i>	AY354226	<i>Betula pendula</i>	Suécia	Lygis,V. et al. (2004)

\* Novas sequências obtidas no presente trabalho

### 3.4. ANÁLISES MOLECULARES

Para os estudos filogenéticos, o DNA genômico foi extraído utilizando-se a metodologia adaptada de Zolan & Pukkila (1986). Foi realizada a amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento da região ITS1 e ITS2 (Desfeux & Lejeune, 1996) do gene nuclear ribossomal (nrDNA) dos isolados em estudo.

#### 3.4.1 Extração e quantificação do DNA genômico

O procedimento para obtenção da massa micelial consistiu em crescer os fungos em erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL meio líquido BD por cinco dias, sob agitação (180 r.p.m.) e temperatura de 28°C. Após seu crescimento os micélios foram filtrados a vácuo, e posteriormente macerados em almofariz de porcelana na presença nitrogênio líquido até formar um pó fino.

O macerado foi transferido para tubo Eppendorf de 2 mL e posteriormente ressuspendido em 800 µL de tampão de extração (1 M Tris-HCl pH 7,5; 1,4 M NaCl; 5 mM EDTA), 16 µL de β-Mercaptoethanol e 10 µL de RNase A (20 mg/ml). A mistura foi homogeneizada em vortex e incubado em banho-maria a 65°C por 10 minutos. As amostras foram retiradas do banho-maria e colocadas em gelo para esfriar, com a posterior adição de 400 µL da mistura fenol e tampão (somente a fase inferior) e 400 µL de CIA (Clorofórmio: álcool isoamil 49:1), foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 r.p.m. e 4°C. O sobrenadante foi transferido para Eppendorf novo contendo CIA, as amostras foram novamente homogeneizadas em vortex e colocadas em centrífuga por 10 minutos a 12.000 r.p.m. Transferiu-se o novo sobrenadante para Eppendorf contendo 800 µL de Isopropanol (para precipitar os ácidos nucleicos), realizou-se uma homogeneização suave para não romper o DNA, as amostras foram encubadas em gelo por 5 minutos.

Após as amostras serem retiradas do gelo foram centrifugadas por 10 minutos a 20.000 r.p.m. a 4°C. O sobrenadante foi descartado restando apenas o pellet de DNA que foi lavado com 300 µL de etanol 70% e centrifugado por 1 minuto a 8.000 r.p.m. a 4°C, seco a vácuo em Concentrador plus por 30 minutos. O DNA obtido foi

ressuspendido em 100  $\mu$ L de TE (Tris-HCl 10 mM [pH8] EDTA 1 mM) + RNase A (20 mg/mL) a 37°C por duas horas em banho-maria. A integridade e a quantificação das amostras de DNA foi testada em gel de agarose 1% com brometo de etídeo (EtB) 10 mg/ml em tampão TBE 1X, utilizando-se marcador *Low DNA Mass Ladder*. O gel foi visualizado após a corrida em transiluminador UV L-Pix HE (Loccus Biotecnologia). As amostras de DNA obtidas foram mantidas em -20°C até a realização da reação de PCR.

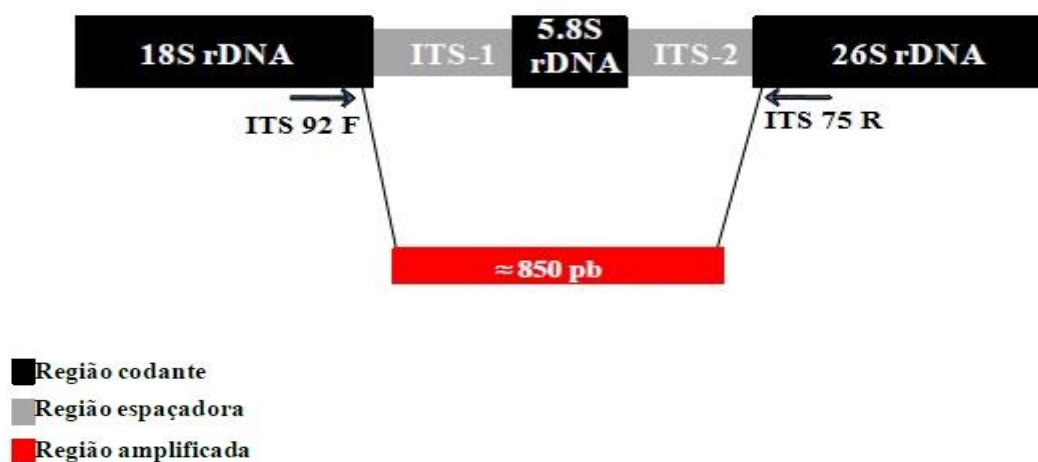
### 3.4.2 Sequenciamento das amostras

Para a amplificação da região ITS1 e ITS2 do rDNA dos isolados foram utilizados os *primers forward* (F) 92 (5' - AAG GTT TCC GTA GGT GAA C - 3') e *reverse* (R) 75 (5' - TAT GCT TAA ACT CAG CGG G - 3') (Figura 9) (Desfeux & Lejeune, 1996). A reação de PCR foi realizada utilizando-se a metodologia adaptada de Valadares (2009), preparando-se um mix contendo todos os reagentes com um volume final de 15  $\mu$ L (Tabela 5).

**Tabela 5.** Reagentes e concentrações utilizados nas reações de PCR dos isolados rizoctonioides de *C. saintlegerianum* e *E. nocturnum*, e também dos isolados de *Xylaria* sp. obtidos de *C. saintlegerianum*.

Reagentes	Concentração de Cada Reagente	Volume ( $\mu$ L)	Concentração Final
Água Milli-Q	-	5,77	-
DNA	2,5 ng/ $\mu$ L	2,25	5,625 ng
<i>Primer Forward</i>	1 $\mu$ M	1,125	1,125 pMol
<i>Primer Reverse</i>	1 $\mu$ M	1,125	1,125 pMol
BSA	2,5 mg/ $\mu$ L	1,5	3,75 mg
Tampão	10x	1,5	-
dNTPs	2,5 $\mu$ M	1,5	3,75 pMol
<i>Taq</i> Polimerase	5 U/ $\mu$ L	0,23	1,15 U
<b>Total</b>		15	

A amplificação foi realizada em termociclador *Veriti 96-well Thermal Cycler* - *Applied Biosystems* (ABI). A amplificação seguiu o seguinte parâmetro: desnaturação inicial de 94°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C e 1 minuto e meio a 72°C, e uma extensão final de 72°C por 10 min.



**Figura 9.** Diagrama ilustrativo dos iniciadores utilizados para amplificar as regiões nucleares entre o gene ribossomal 5.8S e os espaçadores ITS1 e ITS2. Adaptado de Marouelli (2009).

Após a amplificação os fragmentos foram testados quanto a qualidade, a partir de eletroforese em gel de agarose 3% acrescidos de brometo de etídio (EtB) a 10 mg/mL, em tampão TBE 1X para visualização dos fragmentos amplificados em luz ultravioleta.

O produto da reação de PCR foi purificado com as enzimas Exonuclease I de *E. coli* (10 U/ $\mu$ L) + SAP = Fosfatase Alcalina (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) (1 U/ $\mu$ L), utilizando-se a metodologia “EXO-SAP” sendo a proporção de 1 de Exonuclease I para 9 de Fosfatase Alcalina. O processo foi realizado em termociclador por 90 min a 37°C e a atividade enzimática foi neutralizada a 80°C por 20 min.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando 1  $\mu$ L de produto de PCR, 1  $\mu$ L de Pré - *Mix Dyenamic*, 2  $\mu$ L de tampão *Save Money* (Tris-HCl 1M pH: 9,0 + MgCl<sub>2</sub> 50 mM), 2,5  $\mu$ L (1  $\mu$ M) de *primer forward* 92 ou *reverse* 75, 3,5  $\mu$ L de água Milli-Q, com um volume final de 10  $\mu$ L. O processo foi realizado em termociclador em 25 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 min a 60°C.

Para a purificação do produto da reação de sequenciamento adicionou-se 40 µL de Isopropanol (65%) por amostra na placa de sequenciamento e posteriormente vortexada por 30 s, a placa foi deixada a temperatura ambiente por 20 min e centrifugada por 45 min a 2000 rcf (força centrífuga relativa), o sobrenadante foi descartado e a placa foi centrifugada invertida por 1 min a 300 rpm. Posteriormente foram adicionados 250 µL de Etanol (60%) por poço, centrifugada por 10 min a 2000 rcf, o sobrenadante foi descartado e a placa foi centrifugada invertida por 1 min a 400 rpm. Em seguida adicionou-se 100 µL de Etanol (60%) por poço, centrifugada por 10 min a 2000 rcf, o sobrenadante foi descartado, a placa foi centrifugada invertida por 1 min a 500 rpm e colocada para secar em termociclador por 1 min a 95°C. As amostras foram preparadas para ir ao sequenciador adicionando-se 10 µL de Formamida Hi-Di por poço, deixada a temperatura ambiente por 5 min, vortexadas por 1 min e colocadas em sequenciador automático de DNA 3100 (*Applied Biosystems*).

### 3.4.3 Análises e Alinhamento das Sequências

Foram testados três pares de *primers* (ITS92/ITS75, ITS5/ITS4 e ITS101/ITS102) em ambas as direções na realização da reação de PCR. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências do *Genbank*, no banco de dados do NCBI pelo software online BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). A qualidade das sequências obtidas foram analisadas no programa *SeqScape*® (*Applied Biosystems*, CA). As sequências foram alinhadas primeiramente por grupos de isolados utilizando-se o algoritmo *ClustalW*® (Thompson et al., 1997). E em seguida foi feito um alinhamento múltiplo entre os grupos também com o auxílio do algoritmo *ClustalW*®. O software *BioEdit* (Hall, 1999) foi utilizado para fazer ajustes manuais nos alinhamentos quando necessário.

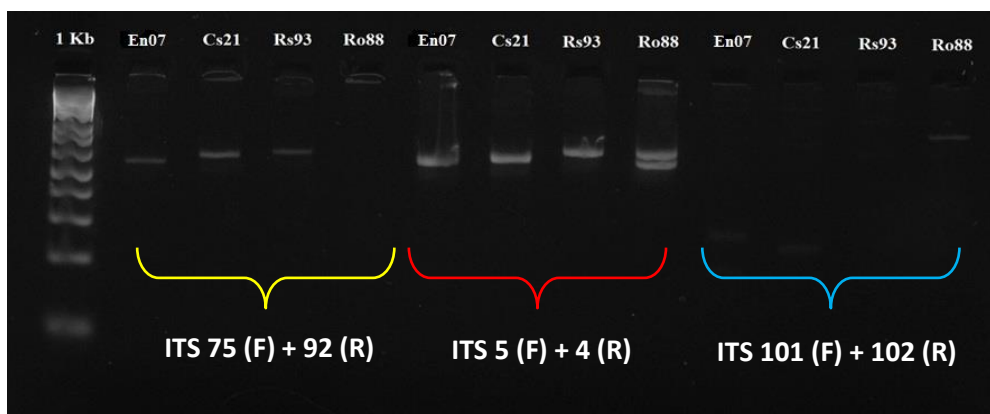
## 3.5 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Para as análises foram construídas duas árvores filogenéticas sendo uma de isolados rizoctonioides e uma de *Xylaria*, utilizando-se a metodologia Bayesiana, e para

os isolados rizoctonioides foi empregado como outgroup o fungo *Sebacina vermifera* e já para *Xylaria* foi utilizado como outgroup *Trametes versicolor*. As árvores foram construídas por meio do *software* MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al., 2001) utilizando para a procura das topologias a metodologia de Markov pelo método de Monte Carlo (MCMC). O melhor modelo evolutivo das sequências dos isolados rizoctonioides e de *Xylaria*, foi escolhido utilizado como informação *a priori* para construção das árvores, por meio da metodologia de máxima verossimilhança seguida pelo critério mínimo de informação teórica (“*Minimum Theoretical Information Criterion*”, AIC), implementado pelo *software* jModelTest (Posada, 2008) que realiza a seleção estatística de modelos de substituição de nucleotídeos que melhor se ajustam a um determinado conjunto de dados. O modelo escolhido pra isolados rizoctonioides foi o GTR+I+G (Tavaré, 1986), já para os isolados de *Xylaria* foi o TIM2ef+G (Posada, 2008). Foram utilizados um milhão de passos em quatro cadeias diferentes, sendo três quentes e uma fria, com uma topologia inicial aleatória, de modo que as topologias seriam amostradas a cada quinhentos passos da cadeia de Markov. Foram descartados os 250 mil passos iniciais como *burnin* e as demais topologias foram utilizadas para obter a árvore consenso com as topologias de maior probabilidade posterior, segundo a metodologia Bayesiana. As árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas no *software* FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testados três pares de *primers* em ambas as direções na realização da reação de PCR; ITS92 (F) e ITS75 (R), ITS5 (F) e ITS4 (R) e ITS101 (F) e ITS102(R). O par de *primers* que foi mais eficiente na amplificação foi o par ITS92 (F) e ITS75 (R) (Figura 10) que foram utilizados no presente estudo.



**Figura 10.** Análise por gel de agarose 3% da PCR de fungos rizoctonioides para teste de primers, utilizando marcador 1 Kb. En07 - *Rhizoctonia* sp., Cs21 - *Epulorhiza* sp., Ro93 e Ro88 - *R. oryzae*.

O estudo de caracterização molecular dos isolados do presente trabalho (*R. solani* – Rh21180 e Rh24F1, *R. oryzae* – Ro88 e Ro93 e *Rhizoctonia* sp. – En07) vem a corroborar e complementar os dados obtidos a nível de gênero por meio da análise morfológica feita anteriormente por Sousa (2012), pois suas sequências apresentaram em torno de 98-100% de similaridade com o banco de dados (Tabela 6) podendo ser considerados pertencentes a mesma espécie, similaridade a baixo desse valor principalmente em estudos das regiões ITS1 e ITS2 que apresentam uma rápida taxa de evolução, são mais prováveis de pertencerem a um mesmo gênero ou família do que a uma mesma espécie (Huynh et al., 2009).

**Tabela 6.** Lista de fungos identificados por sequenciamento da região ITS, incluindo código do isolado, gênero encontrado por características morfológicas, espécie mais próxima e código de adesão e correspondência (%).

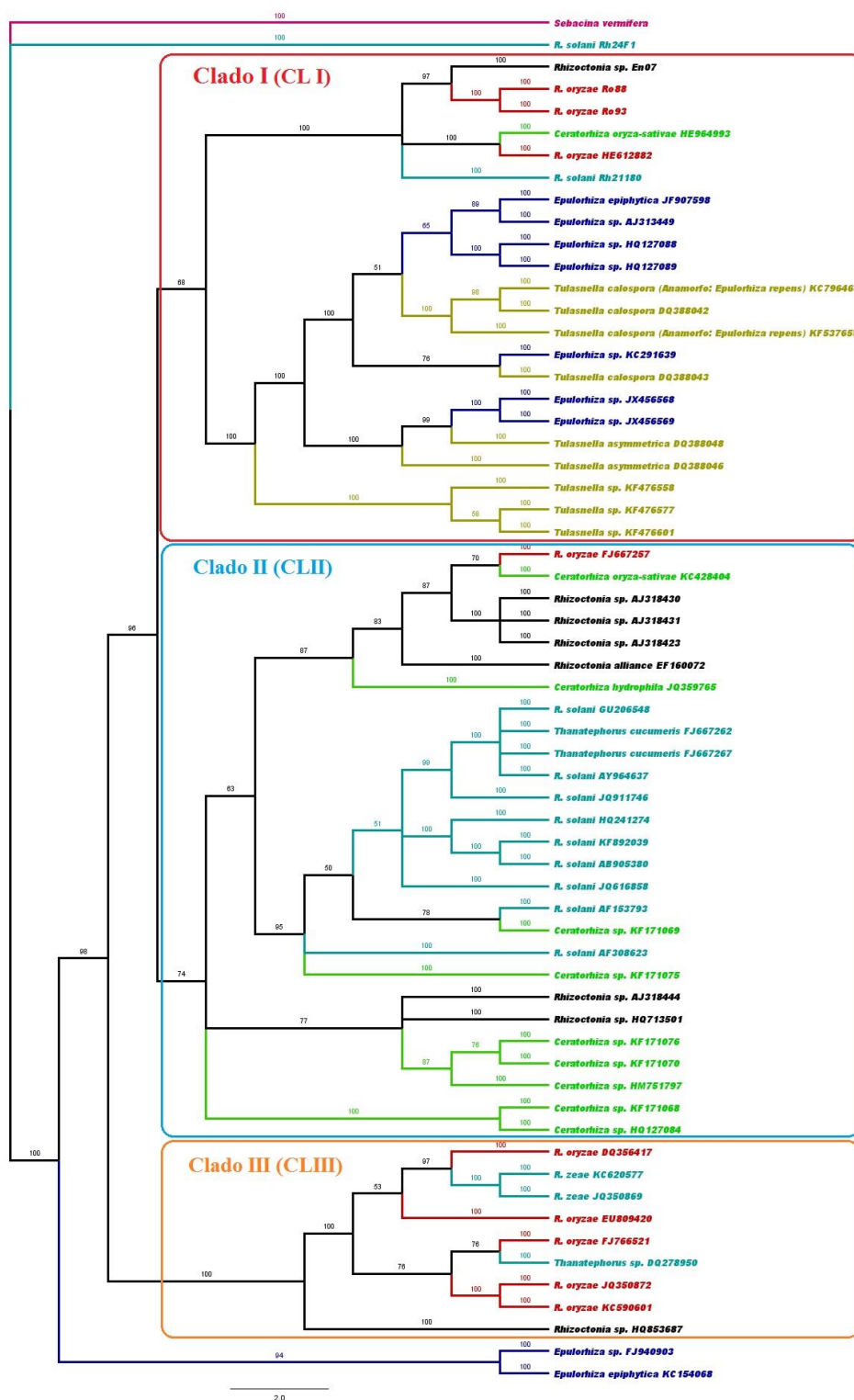
<b>Código do isolado</b>	<b>Gênero (Morfológico) Encontrado</b>	<b>Espécie mais próxima e código de adesão</b>	<b>Correspondência (%)</b>
<b>En07</b>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp. (AY586176)	500/510 (89%)
<b>Cs16</b>	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Xylaria hypoxylon</i> (JX427059)	383/386 (99%)
<b>Cs18</b>	<i>Xylaria</i> sp.	Cepa de Fungo Endofítico (JX155875)	369/369 (100%)
<b>Rh21180</b>	<i>R. solani</i>	<i>R. solani</i> (DQ278950)	520/530 (98%)
<b>Rh24F1</b>	<i>R. solani</i>	<i>R. solani</i> (KF907708)	501/503 (99%)
<b>Ro88</b>	<i>R. oryzae</i>	<i>R. oryzae</i> (FJ896475)	440/450 (98%)
<b>Ro93</b>	<i>R. oryzae</i>	<i>R. oryzae</i> (FJ896474)	540/550 (98%)

As relações filogenéticas, baseadas em análises Bayesianas entre os isolados do presente trabalho, e dos obtidos do *GenBank* mostraram três clados. O clado I (CL1) apresentou dois sub-clados (CL1.1 e CL1.2) bem suportados. O CL1.1 foi composto predominantemente por isolados patogênicos ao arroz (*R. oryzae* – Ro88 e *R. oryzae* – Ro93), e um micorrízico *Rhizoctonia* sp. (En07) obtidos no presente trabalho. Além disso, neste sub-clado estão um isolado de *R. oryzae* (HE612882) e um de *Ceratorhiza oryza-sativae* HE964993 do *GenBank* patogênicos ao arroz. O CL1.2 é representado exclusivamente por fungos rizoctonioides micorrízicos da família Tulasnellaceae, nas duas formas *Epulorhiza* (anamórfica) e *Tulasnella* (teleomórfica). O clado 2 embora tenha apresentado baixo suporte e seja mal resolvido possui isolados somente do *GenBank*, e foi constituído por micorrizas (*Rhizoctonia* sp. e *Ceratorhiza* sp.) e fitopatógenos (*R. oryzae*; *R. solani* e *T. cucumeris*). Os isolados citados são patogênicos ao arroz, milho, soja, tabaco, batata, sorgo e feijão pertencentes a família

Ceratobasidiaceae, nas duas formas *R. solani* (anamórfica) e *T. cucumeris* (teleomórfica). Além disso, este clado foi composto por *Ceratorhiza oryza-sativae* – KC428404 que é um isolado micorrízico obtido do arroz e patogênico ao arroz. O clado III foi bem suportado apresentando predominantemente isolados do GenBank patogênicos ao arroz e ao milho, e somente um isolado micorrízico *Rhizoctonia* sp. (HQ853687). Os acessos de *Epulorhiza* sp. – FJ940903 e *Epulorhiza epiphytica* – KC154068 ficaram mais basais com alto suporte não agrupando no clado 1.2 onde estão as demais espécies de *Epulorhiza*.

Podemos observar que os isolados de *R. oryzae* patogênicos ao arroz (Ro88 e Ro93) estudados no presente trabalho pertencem ao mesmo clado, já o isolado RH24F1 (*R. solani*) também patogênico ao arroz está localizado fora de qualquer clado diferindo-se do outro isolado RH21180 (*R. solani*) patogênico ao feijão que está ocupando o mesmo subclado CL1.1 dos isolados Ro88 e Ro93. O isolado micorrízico En07 de *Rhizoctonia* sp. obtido no presente trabalho também pertence ao mesmo subclado CL1.1, diferindo-se dos demais isolados micorrízicos do *GenBank* que estão presentes nos demais cladados.

Desta forma, nossos resultados demonstram que *Rhizoctonia* sp. é um grupo polifilético, composto por espécies patogênicas e micorrízicas o que corroboram os resultados obtidos por Valadares (2009). Em estudos anteriores a caracterização morfológica baseada em características sexuais originaram a classificação de vários grupos polifiléticos (Gonzalez, 2006; Valadares, 2009), sendo assim nossas análises complementam e corroboram esses estudos morfológicos. A *Rhizoctonia* micorrízica possivelmente evoluiu várias vezes de forma independente de linhagens diferentes de *Rhizoctonia*, o que observamos pelo fato da ausência de um clado bem definido de micorrízicos ou de fitopatogênicos.



**Figura 11.** Árvore filogenética Bayesiana obtida a partir da análise dos fragmentos de restrição da região ITS1 e ITS2 de fungos micorrízicos e fitopatogênicos obtidos no presente trabalho e do *GenBank*. Clado I (Vermelho), Clado II (Azul) e Clado III (Laranjado). *Outgroup*: *Sebacina vermifera*.

As relações filogenéticas, baseadas em análises Bayesianas entre os isolados do presente trabalho, e dos obtidos do *GenBank* evidenciaram para os isolados Xylarioides a não relação entre os nossos isolados e os isolados pertencentes ao *GenBank*, como pode ser observado na árvore filogenética da Figura. 12, onde os isolados Xylarioides do presente trabalho se encontram fora do grande clado formado pelos isolados obtidos do *GenBank*. Essa grande divergência pode ser explicada pelo fato do gênero *Xylaria* ser encontrado como saprófita, parasita, endófito e mais recentemente identificado com poder de degradação de enzimas lignocelulolíticas (Cafêu, 2007; Sánchez, 2009). Sua capacidade de colonizar diversos grupos de plantas dentre elas orquídeas, palmas e bromélias também favorece a distinção dentro deste gênero (Sánchez, 2009), como observado em nossos isolados Cs16 e Cs18 obtidos da orquídea *C. saintlegerianum* divergiram dos isolados do *GenBank* que foram obtidos de outras plantas e substratos, corroborando assim a grande diversidade genética e de espécies dentro desse gênero.

Portanto os resultados do presente trabalho de caracterização molecular dos fungos rizoctonioides e xylarioides vieram a complementar e corroborar a caracterização morfológica e também contribuirão para outros estudos nas áreas de micorrização, conservação, controle biológico e degradação de materiais lignocelulolíticos.



## 5 CONCLUSÕES

- Os resultados filogenéticos moleculares de *Rhizoctonia* sp. micorrízica corroboram os resultados morfológicos.
- Os isolados micorrízicos/endofíticos de *Rhizoctonia* spp. formaram linhagens distintas dos fitopatogênicos.
- Os isolados micorrízicos/endofíticos compõem um clado polifilético com os micorrízicos/endofíticos do *GenBank*.
- O isolado micorrízico de *Rhizoctonia* sp. obtido de *E. Nocturnum* formou uma linhagem diferente das *Rhizoctonias* spp. oriundas de outras espécies de orquídeas do *GenBank*.
- Os isolados Xylarioides obtidos no presente trabalho não apresentaram relação com os isolados pertencentes ao *GenBank*.

## 6 REFERÊNCIAS

- AMORIM, D. S. **Fundamentos de Sistemática Filogenética**. Ribeirão Preto: Holos, 2002, 156 p.
- ARRUDA, W. **Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus***. 2005. 144 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Rio Grande do Sul, 2005.
- BARBERO, A. P. P. **Flora da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil): Orchidaceae – subtribo Laeliinae**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2007.
- BARROS, F. DE; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. *Orchidaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 18 Ago. 2014
- BATISTA, J. A. N.; BIANCHETTI, L. B. Lista atualizada das Orchidaceae do Distrito Federal. **Acta botanica brasílica**, v. 17, n. 2, p. 183-201, 2003.
- BATISTA, J. A. N.; BIANCHETTI, L. B.; PELLIZZARO, K. F. Orchidaceae of the Reserva Ecológica do Guará, Distrito Federal, Brazil. **Acta botanica brasílica**, v. 19, n. 2, p. 221-232, 2005.
- BAYMAN, P.; OTERO, J. T. Microbial endophytes of orchid roots. In: SCHULZ, P. D. B. J. E.; BOYLE, D. C. J. C.; SIEBER, D. T. N. (Ed.). **Microbial root endophytes**. Springer, 2006. 153-177 p.
- BIDARTONDO, M. I.; READ, D. J. Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 16, p. 3707-3716, 2008.
- BOLDRINI, R. F.; SANTOS, W. O.; CRUZ, Z. M. A.; RAMOS, A. C. Bases da associação micorrízica orquídeide. **Natureza on line**, v. 8, n. 3, p. 140-150, 2010.

BONATES, L. C. M. **Anatomia ecológica da folha e da raiz e aspectos ecofisiológicos de Orchidaceae epífitas de uma campina da Amazônia Central.** 2007. 130 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical Recursos Naturais) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

BONNARDEAUX, Y.; BRUNDRETT, M.; 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**, v. 111, n. 1, p. 51-61, 2007.

BOUGOURE, J.; LUDWIG, M.; BRUNDRETT, M.; GRIERSON, P. Identity and specificity of the fungi forming mycorrhizas with the rare mycoheterotrophic orchid *Rhizanthella gardneri*. **Mycological Research**, v. 113, n. 10, p. 1097-1106, 2009.

BOUGOURE, J. J.; BOUGOURE, D. S.; CAIRNEY, J. W. G.; DEARNALEY, J. D. W. ITS-RFLP and sequence analysis of endophytes from *Acianthus*, *Caladenia* and *Pterostylis* (Orchidaceae) in southeastern Queensland. **Mycological Research**, v. 109, n. 4, p. 452-460, 2005.

BRUNS, T. D.; BIDARTONDO, M. I.; TAYLOR, D. L. Host specificity in ectomycorrhizal communities: what do the exceptions tell us? **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 2, p. 352-359, 2002.

BRUNS, T. D.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 22, p. 525-564, 1991.

CAFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae).** 2007. 255 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2007.

CALONJE, M.; MARTÍN-BRAVO, S.; DOBEŠ, C.; GONG, W.; JORDON-THADEN, I.; KIEFER, C.; KIEFER, M.; PAULE, J.; SCHMICKL, R.; KOCH, M. A. Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction. **Plant Systematics and Evolution**, v. 282, n. 3, p. 257-280, 2009.

CAMPACCI, M. A. **Orquideas.** CD 1 Flora Brasileira, 2000.

CAMPOS, F. A. D. B. Considerações sobre a Família Orquidacea: taxonomia, antropismo, valor econômico e tecnologia:[revisão]. **Mundo saúde (Impr.)(1995)**, v. 32, n. 3, p. 383-392, 2008.

CARLING, D.; KUNINAGA, S.; BRAINARD, K. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. **Phytopathology**, v. 92, n. 1, p. 43-50, 2002.

- CARLING, D.; POPE, E.; BRAINARD, K.; CARTER, D. Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis group. **Phytopathology**, v. 89, n. 10, p. 942-946, 1999.
- CARVALHO, C. R.; GONÇALVES, V. N.; PEREIRA, C. B.; JOHANN, S.; GALLIZA, I. V.; ALVES, T. M.; RABELLO, A.; SOBRAL, M. E.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. **Symbiosis**, p. 1-13, 2012a.
- CARVALHO, J. C. B.; ARAÚJO, L. G.; KATO, L.; SOUSA, A. D.; NOVAIS, C.; CANDINE, D.; LUZINI, A. P.; SOUSA, K. C. I.; FILIPPI, M. C. C. **Bioprospecção de metabólitos secundários do antagonista *Rhizoctonia* sp. de *Epidendrum nocturnum* para *Magnaporthe oryzae***. In: Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG – Conpeex IX. 2012b, Goiânia, Go.
- CASTILLO, N. F. O. **Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo *Rhizoctonia* y otros endófitos cultivables sobre el desarrollo de plantas de *Vanilla planifolia* Jacks**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, 2012.
- CHEN, J.; WANG, H.; GUO, S. X. Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae). **Mycorrhiza**, v. 22, n. 4, p. 297-307, 2012.
- CURRAH, R.; ZELMER, C. A key and notes for the genera of fungi mycorrhizal with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. **Reports of the Tottori Mycological Institute**, v. 30, p. 43-59, 1992.
- DEARNALEY, J. D. W. Further advances in orchid mycorrhizal research. **Mycorrhiza**, v. 17, n. 6, p. 475-486, 2007.
- DESFEUX, C.; LEJEUNE, B. Systematics of *Euromediterranean Silene* (Caryophyllaceae): evidence from a phylogenetic analysis using ITS sequences. **Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie**, v. 319, n. 4, p. 351, 1996.
- DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. 1 ed. Melbourne - Australia: Cambridge University Press, 1993.
- DRESSLER, R. L.; DODSON, C. H. Classification and Phylogeny in the Orchidacea. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 25-68, 1960.
- DUTRA, C. G. **Filogeografia de *Passiflora ovalis***. 2008. 46 f. Monografia (Curso de Ciências Biológicas: Ênfase Molecular, Celular e Funcional: Bacharelado) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

EDEL, V. Polymerase chain reaction in mycology: an overview. **Applications of PCR in Mycology**. CAB International, New York, USA, 1998. 1-20 p.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed.: Caxias do Sul: Educs, 2010, 638 p.

GAINO, A. P. S. C.; BASSETO, M. A.; GASPAROTTO, L.; POLTRONIERI, L. S.; CERESINI, P. C. Inferência filogenética revela a complexa etiologia das manchas areolada e foliar em seringueira e em outras espécies cultivadas na Amazônia. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 385-395, 2010.

GARCÍA, V. G.; ONCO, M. A. P.; SUSAN, V. R. Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Span. J. Agric. Res**, v. 4, p. 55-79, 2006.

GOMES, D. N. F. **Diversidade e Potencial Biotecnológico de Fungos Filamentosos Isolados do Mangezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco**. 2007. 114 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Miologia, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2007.

HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. 1999. p. 95-98.

HORTON, T. R.; BRUNS, T. D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black box. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 8, p. 1855-1871, 2001.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754-755, 2001.

HUYNH, T. T.; THOMSON, R.; MCLEAN, C. B.; LAWRIE, A. C. Functional and genetic diversity of mycorrhizal fungi from single plants of *Caladenia formosa* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 104, n. 4, p. 757-765, 2009.

IRWIN, M. J.; BOUGOURE, J. J.; DEARNALEY, J. D. W. *Pterostylis nutans* (Orchidaceae) has a specific association with two *Ceratobasidium* root-associated fungi across its range in eastern Australia. **Mycoscience**, v. 48, n. 4, p. 231-239, 2007.

JACQUEMYN, H.; MERCKX, V.; BRYNS, R.; TYTECA, D.; CAMMUE, B.; HONNAY, O.; LIEVENS, B. Analysis of network architecture reveals phylogenetic constraints on mycorrhizal specificity in the genus *Orchis* (Orchidaceae). **New Phytologist**, v. 192, n. 2, p. 518-528, 2011.

LANFRANCO, L.; PEROTTO, S.; LONGATO, S.; MELLO, A.; COMETTI, V.; BONFANTE, P. Molecular approaches to investigate biodiversity in mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza manual**. Berlin: Springer, p. 353-372, 1998.

LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Phylogeny of five fungus-like protoctistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 636-653, 1992.

LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A. M. **The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing**. Cambridge University Press Cambridge, 2009.

MARTOS, F.; MUNOZ, F.; PAILLER, T.; KOTTKE, I.; GONNEAU, C.; SELOSSE, M. A. The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. **Molecular Ecology**, v. 20, p. 5098-5109, 2012.

MEDEIROS, T. D. S.; JARDIM, M. A. G. Distribuição vertical de orquídeas epífitas na Área de Proteção Ambiental (APA) Ilha do Combu, Belém, Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 1, 2011.

MELLO, C. **Conservação de sementes de orquídeas do Cerrado. 2000, 48 p.** 2000. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2000.[Links], 2000.

MENEZES, L. C. **Orquídeas genus *Cyrtopodium*: espécies brasileiras.** Brasília: IBAMA, 2000, 208 p.

MIZ, R. B. **Estudo filogenético das espécies da seção Torva do gênero *Solanum* L.(Solanaceae) na região sul do Brasil.** 2006. 168 f. Dissertação (Mestrado Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências, 2006.

MOSQUERA-ESPINOSA, A. T.; BAYMAN, P.; PRADO, G. A.; GOMEZ-CARABALI, A.; OTERO, J. T. The double life of *Ceratobasidium*: orchid mycorrhizal fungi and their potential for biocontrol of *Rhizoctonia solani* sheath blight of rice. **Mycologia**, 2012.

MOSQUERA ESPINOSA, A. T. **Evaluación del efecto biocontrolador de *Rhizoctonia* de orquídeas sobre *Rhizoctonia solani* kühn patógeno del suelo en arroz (*Oryza sativa* L.).** 2010. 140 f. Tesis (Doctor Ciencias Agropecuarias Línea de Investigación Manejo de Suelos y Aguas) - Universidade Nacional de Colombia, Palmira, 2010.

NAKATANI, A. K. **Diversidade genética de *Rhizoctonia* spp. e análise de seqüências multilocos.** 2006. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronomicas Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2006.

NOGUEIRA, R. E.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; LANNA, M. C. S.; MENDONÇA, M. P. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres

na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. **Acta botânica brasílica**, v. 19, n. 3, p. 417- 424, 2005.

OTERO, J. T.; ACKERMAN, J. D.; BAYMAN, P. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 11, p. 1852-1858, 2002.

OTERO, J. T.; ACKERMAN, J. D.; BAYMAN, P. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 8, p. 2393-2404, 2004.

OTERO, J. T.; FLANAGAN, N. S.; HERRE, E. A.; ACKERMAN, J. D.; BAYMAN, P. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 94, n. 12, p. 1944-1950, 2007.

PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses**. Hildesheim - Germany: Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, 1975.

PAULITZ, T.; ZHANG, H.; COOK, R. Spatial distribution of *Rhizoctonia oryzae* and *Rhizoctonia* root rot in direct-seeded cereals. **Canadian journal of plant pathology**, v. 25, n. 3, p. 295-303, 2003.

PELÁEZ, F.; GONZÁLEZ, V.; PLATAS, G.; SÁNCHEZ BALLESTEROS, J.; RUBIO, V. Molecular phylogenetic studies within the Xylariaceae based on ribosomal DNA sequences. 2008.

PEREIRA, M. C.; PEREIRA, O. L.; COSTA, M. D.; ROCHA, R. B.; KASUYA, M. C. M. Diversidade de fungos micorrízicos *Epulorhiza* spp. isolados de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, 2009.

PEREIRA, M. C.; TORRES, D. P.; GUIMARÃES, F. A. R.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M. Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq.(Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*. **Acta botânica brasílica**, v. 25, n. 3, p. 534-541, 2011.

PEREIRA, O. L. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécies de orquídeas neotropicais**. 2001. 48 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação 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 *Oncidium flexuosum* (orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 199-206, 2005a.

PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; ROLLEMBERG, C. L.; CHAER, G. M. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizoctonióides associados a três

espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 2, p. 191-197, 2005b.

PEREIRA, O. L.; ROLLEMBERG, C. L.; BORGES, A. C.; MATSUOKA, K.; KASUYA, M. C. M. *Epulorhiza* epiphytica sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. **Mycoscience**, v. 44, n. 2, p. 153-155, 2003.

PEREIRA, U. Z.; RIBEIRO, L. F. Caracterização de comunidades de Orchidaceae em fragmentos de Floresta Ombrófila Densa Montana, em diferentes estágios de regeneração em Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**, v. 2, n. 2, p. 52-60, 2004.

PESSOA, H. P.; TEIXEIRA, A. F. S.; MIRANDA, L.; PEREIRA, M. C. Caracterização micorrízica de "*Oeceoclades maculata*" (LINDL.) LINDL. e utilização de seus simbiontes fúngicos na germinação e produção de mudas de orquídeas nativas da região do Alto Paranaíba-MG. DOI: 10.7902/ecb. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, v. 3, n. 1, p. 6-13, 2012.

PETERSON, R. L.; MASSICOTTE, H. B.; MELVILLE, L. H. **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. Cabi Publishing: Wallingford, 2004, 173 p.

PHILLIPS, R. D.; BARRETT, M. D.; DIXON, K. W.; HOPPER, S. D. Do mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids? **Journal of Ecology**, v. 99, n. 3, p. 858-869, 2011.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. **Mycologia**, v. 99, n. 4, p. 510-525, 2007.

POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, 2008.

RASMUSSEN, H. N. **Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant**. Cambridge University Press, Cambridge, U.K, 1995, 433 p.

RASMUSSEN, H. N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. **Plant and Soil**, v. 244, n. 1, p. 149-163, 2002.

RASMUSSEN, H. N.; RASMUSSEN, F. N. Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. **Oikos**, v. 118, n. 3, p. 334-345, 2009.

ROYAL, B. P. **Análise Florística e Estrutural da Vegetação Xerofítica e das Savanas Metalófilas na Floresta Nacional de Carajás: Subsídios à Conservação**. 2006. 74 f. Dissertação (Mestrado em Botânica Tropical) - Instituto de Botânica, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2006.

- SALLES, J. F.; SOUZA, F. A. D. **Revisões em micorriza I: técnicas moleculares aplicadas ao estudo dos fungos micorrízicos arbusculares**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998, 24 p.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.
- SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética: um guia prático**. Holos, 2003.
- SHARON, M.; KUNINAGA, S.; HYAKUMACHI, M.; NAITO, S.; SNEH, B. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, v. 49, n. 2, p. 93-114, 2008.
- SHEFFERSON, R. P.; TAYLOR, D. L.; WEIß, M.; GARNICA, S.; MCCORMICK, M. K.; ADAMS, S.; GRAY, H. M.; MCFARLAND, J. W.; KULL, T.; TALI, K. The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. **Evolution**, v. 61, n. 6, p. 1380-1390, 2007.
- SIQUEIRA, J. O. Micorrizas e Micorrizologia. In: SIQUEIRA, J. O. (Ed.). **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras - Minas Gerais: Lavras: Universidade Federal de Lavras/DCS e DCF, 1996. 1-4 p.
- SOUSA, K. C. I. **Caracterização morfológica de fungos rizoctonioides e endofíticos para a germinação *in vitro* de sementes de *Cyrtopodium saintlegerianum* rchb. F. E *Epidendrum nocturnum* jacq. (orchidaceae)**. 2012. 125 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- SOUZA, E. C.; KURAMAE, E. E.; NAKATANI, A. K.; BASSETO, M. A.; PRABHU, A. S.; CERESINI, P. C. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 129-136, 2007.
- STANCIK, J. F.; GOLDENBERG, R.; BARROS, F. The genus *Epidendrum* L.(Orchidaceae) in Paraná State, Brazil. **Acta botanica brasílica**, v. 23, n. 3, p. 864-880, 2009.
- SUÁREZ, J. P.; WEIß, M.; ABELE, A.; GARNICA, S.; OBERWINKLER, F.; KOTTKE, I. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. **Mycological Research**, v. 110, n. 11, p. 1257-1270, 2006.
- SUTTLEWORTH, F. S.; ZIM, H. S. **Orquídeas - Guia dos Orquidófilos**. 5 ed. São Paulo - Brasil: Expressão e Cultura 1995, 158 p.
- TAYLOR, D.; BRUNS, T.; LEAKE, J.; READ, D. Mycorrhizal Specificity and Function in Myco-heterotrophic Plants. **Mycorrhizal ecology**, v. 157, p. 375, 2002.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. **Fitopatologia: Conceitos e exercícios de laboratório**. Porto Alegre: Artmed, 2010, 576 p.

VALADARES, R. B.; PEREIRA, M. C.; OTERO, J. T.; CARDOSO, E. J. Narrow fungal mycorrhizal diversity in a population of the orchid *Coppensia doniana*. **BIOTROPICA**, v. 44, n. 1, p. 114-122, 2012.

VALADARES, R. B. S. **Diversidade micorrízica em *Coppensia doniana* (Orchidaceae) e filogenia de fungos micorrízicos associados à subtribo Oncidiinae**. 2009. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Área de concentração: Microbiologia Agrícola, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

WARCUP, J. The mycorrhizal relationships of Australian orchids. **New Phytologist**, v. 87, n. 2, p. 371-381, 1981.

WILLIAMS, N. H. Taxonomy of the genus *Aspasia Lindley* (Orchidaceae: Oncidieae). **Brittonia**, v. 26, n. 4, p. 333-346, 1974.

YUAN, L.; YANG, Z. L.; LI, S. Y.; HU, H.; HUANG, J. L. Mycorrhizal specificity, preference, and plasticity of six slipper orchids from South Western China. **Mycorrhiza**, v. 20, n. 8, p. 559-568, 2010.

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**, v. 42, n. 1, p. 135-139, 2007.

ZOLAN, M.; PUKKILA, P. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 6, n. 1, p. 195-200, 1986.