

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS RIZOCTONIÓIDES ASSOCIADOS A TRÊS ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS EPÍFITAS NEOTROPICAIS NO BRASIL⁽¹⁾

Olinto Liparini Pereira⁽²⁾, Maria Catarina Megumi Kasuya⁽³⁾,
Christtiano de Lima Rollemberg⁽⁴⁾ & Guilherme Montandon Chaer⁽⁵⁾

RESUMO

Distúrbios causados pelo homem têm resultado no aumento do risco de extinção de diversos táxons de orquídeas nativas da Mata Atlântica no Brasil. Na natureza, orquídeas utilizam obrigatoriamente fungos endomicorrízicos para a germinação de sementes e desenvolvimento da plântula, ao menos nos primeiros estádios do seu ciclo de vida. Assim, fungos micorrízicos associados ao sistema radicular de orquídeas nativas vêm sendo isolados, caracterizados e armazenados para uso em futuros programas de conservação de espécies de orquídeas, por meio da germinação simbiótica. Três isolados de fungos micorrízicos rizoctonióides foram obtidos do sistema radicular de três espécies de orquídeas neotropicais, *Gomesa crispa*, *Campylocentrum organense* e *Bulbophyllum* sp., de três diferentes fragmentos de Mata Atlântica no Brasil. Estudos taxonômicos, baseados na condição nuclear, morfologia da hifa vegetativa e ultra-estrutura do septo dolipórico, revelaram que os isolados pertencem aos gêneros *Ceratorhiza* e *Rhizoctonia*. Esse é o primeiro relato do isolamento de fungos micorrízicos associados ao sistema radicular dessas espécies de orquídeas neotropicais. Aspectos relativos à taxonomia e ao uso desses isolados no contexto de um programa de conservação de orquídeas nativas são discutidos.

Termos de indexação: biodiversidade, ecologia microbiana, micologia, endomicorrizas, *Ceratorhiza*, *Rhizoctonia*.

⁽¹⁾ Trabalho desenvolvido no Laboratório de Associações Micorrízicas, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, BIOAGRO, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa – UFV. Recebido para publicação em março de 2004 e aprovado em dezembro de 2004.

⁽²⁾ Mestre em Microbiologia Agrícola, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa – UFV. Departamento de Microbiologia, CEP 36570-000 Viçosa (MG). Bolsista CNPq. E-mail: liparini@bol.com.br

⁽³⁾ Professora Adjunta do Departamento de Microbiologia, UFV. Bolsista CNPq. E-mail: mkasuya@ufv.br

⁽⁴⁾ Bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq. E-mail: christthroll@yahoo.com

⁽⁵⁾ Pesquisador da Embrapa-Agrobiologia. Caixa Postal 74505, CEP 23851-970 Seropédica (RJ). E-mail: gchaer@cnpab.embrapa.br

SUMMARY: ISOLATION AND IDENTIFICATION OF RHIZOCTONIA-LIKE MYCORRHIZAL FUNGI ASSOCIATED TO THREE NEOTROPICAL EPIPHYTIC ORCHID SPECIES IN BRAZIL

*Anthropogenic disturbances have resulted in an increased threat of extinction of many native orchid taxa in Brazil's Atlantic rain forest. In nature, orchids utilize mycorrhizal fungi to initiate seed germination and seedling development, at least in the early stages of their life cycle. Mycorrhizal fungi associated with the roots of orchids have thus been isolated, characterized and stored as important resources for a future conservation program of orchid species through symbiotic seed germination. Three mycorrhizal Rhizoctonia-like fungi were isolated from roots of three neotropical orchid species *Gomesa crispa*, *Campylocentrum organense* and *Bulbophyllum* sp. from three different Atlantic rain forest fragments in Brazil. Taxonomic studies based on the nuclear condition, vegetative hyphal morphology and septal pore ultrastructure revealed that the isolates belong to the genera *Ceratorhiza* and *Rhizoctonia*. This is the first report on the isolation of mycorrhizal fungal species associated to the referred neotropical orchid species. Aspects concerning their taxonomy and use in the context of a native orchid conservation programs are discussed.*

Index terms: biodiversity, microbial ecology, mycology, endomycorrhizae, *Ceratorhiza*, *Rhizoctonia*.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma das maiores e mais diversificadas do reino vegetal, com várias espécies registradas no mundo inteiro, dentre terrestres, epífitas e rupícolas (Cronquist, 1981; Dressler, 1993). O Brasil dispõe de grande biodiversidade dessas espécies, principalmente das epífitas. No entanto, o desbravamento de áreas, como as do cerrado, e a derrubada de matas, como a mata atlântica e a floresta amazônica, têm ameaçado e levado à extinção algumas dessas espécies (Rushi, 1986; Miller & Warren, 1996; Costa et al., 1998). Muitas espécies, raramente observadas na natureza, encontram-se em diversas listas de prioridade máxima de conservação, por apresentarem baixo sucesso reprodutivo ou habitat restrito (Mendonça & Lins, 2000) e mesmo espécies ainda não listadas encontram-se ameaçadas, justificando trabalhos que visem à sua conservação e reintrodução em habitat nativo. Entretanto, a organização eficiente de programas de reintrodução, conservação e manejo de orquídeas na natureza requer um conhecimento detalhado das estratégias reprodutivas dessas espécies em seu habitat natural (Clements et al., 1986; Pereira et al., 2003b).

Na natureza, as orquídeas necessitam se associar, obrigatoriamente, a fungos micorrízicos para a germinação da semente e nutrição, sendo esses de fundamental importância para que a espécie possa completar o seu ciclo de vida (Leake, 1994; Smith & Read, 1997; Peterson et al., 1998; Rasmussen, 2002; Pereira et al., 2003b). Especula-se, também, o importante papel de determinadas bactérias associadas ao sistema radicular de orquídeas

(Wilkinson et al., 1994; Rasmussen, 2002), havendo, inclusive, relato da ocorrência de fixadores de N₂ no substrato de crescimento e na ecto e endorrizosfera de várias espécies de orquídeas coletadas no Brasil (Lange & Moreira, 2002).

Diante do exposto, o conhecimento dos fungos micorrízicos associados ao sistema radicular, bem como o seu uso em programas de propagação simbiótica de orquídeas, é de grande importância para a reintrodução, conservação e manejo dessas espécies vegetais (Zettler, 1997a,b; Pereira et al., 2003b).

Os trabalhos sobre micorrizas em orquídeas têm-se concentrado em espécies terrestres de ambientes temperados e poucos trabalhos com espécies epífitas ou de ambiente tropical existem na literatura (Peterson et al., 1998; Pereira et al., 2003a; Kasuya et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de fungos micorrízicos em três espécies de orquídeas neotropicais, identificando-os e isolando-os em cultura pura para depósito no banco de germoplasma de fungos micorrízicos de orquídeas do Laboratório de Associações Micorrízicas/BIOAGRO/UFV, com vistas em futura utilização em programas de germinação simbiótica de sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

Raízes saudáveis de *Campylocentrum organensis* (RchB. f.) Rolfe, *Bulbophyllum* sp. e *Gomesa crispa* (Lindl.) Klotzsch ex RchB. f. foram amostradas de plantas selvagens em ambiente natural. As espécies

foram selecionadas, considerando a elevada concentração de plântulas em germinação próximo ao seu sistema radicular, indicando a possível presença de fungos micorrízicos em níveis elevados. Dessas amostras, parte foi seccionada transversalmente em criomicrotomo (LEICA CM 1850), na espessura de 30 μm , para exame em microscópio ótico, quanto à presença de *pelotons* nas células corticais, e para registro fotográfico. Os fungos micorrízicos foram isolados diretamente de *pelotons* não degradados (Pereira, 2001), assegurando, assim, o isolamento somente dos fungos formadores dessas estruturas. Todo micélio característico de fungo rizoctonióide foi transferido para meios de cultura e subcultivados repetidamente até à obtenção de culturas puras (Sneh et al., 1991). Somente isolados reconhecidamente pertencentes ao grupo de fungos rizoctonióides, capazes de formar células monilióides (Roberts, 1999), foram selecionados para a identificação. A indução da formação de células monilióides foi feita em meio fubá (Pereira, 2001), assim como a indução de fase sexuada (Currah, 1986). Para indução da fase sexuada, os fungos cultivados em placas que continham meio fubá foram incubados no escuro por 48h a 25 °C e, posteriormente, submetidos à alternância de 12 h de luz próximo ao ultravioleta / 12 h escuro (Leach, 1962) a 25 °C.

A identificação dos isolados foi feita em cultura, com base na condição nuclear e ultra-estrutura do septo dolipórico (Moore, 1987; Andersen, 1996; Andersen & Rasmussen, 1996). Para a coloração de núcleos, microculturas dos isolados foram preparadas entre lâmina e lamínula (Hawksworth, 1974) e, após incubação por 7 d a 25 °C, as lamínulas foram montadas com 50 μL de uma solução corante que continha 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ 10.000 x SYBR® Green I em KH_2PO_4 10 mmol L^{-1} e glicerol a 18 % (Meinhardt et al., 2001). Após 5 min em câmara escura, as lâminas foram observadas em microscópio ótico Nikon E600 acoplado de epifluorescência Y-FL operando na faixa de comprimento de onda de 450–520 nm de excitação.

Para a observação da ultra-estrutura do septo dolipórico, discos com micélio dos isolados fúngicos, cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA) a 28 °C, por sete dias, foram fixados em solução de glutaraldeído 3 % preparado em tampão cacodilato 0,05 mol L^{-1} , pH 7,2, durante 2 h, à temperatura ambiente. Após a fixação, o material foi submetido a seis lavagens de 10 min cada com tampão cacodilato. Foi realizada uma pós-fixação com solução de tetraóxido de ósmio 1 % no mesmo tampão, por 2 h, à temperatura ambiente. A seguir, o material foi lavado em tampão cacodilato e desidratado em série alcoólica que continha concentrações de 30, 50, 70, 80 e 95 % de álcool, pela imersão, durante 10 min, em cada uma das soluções, e mais duas vezes em álcool absoluto, por 20 min. O material foi embebido em resina Spurr adicionando resina às amostras. As amostras foram imersas em álcool absoluto, na proporção de álcool:resina de 1:1

e 1:3 com intervalo de 30 min entre cada troca e, a seguir, em resina pura, por 5 h, na primeira troca, e, para 12 h, na segunda troca. O material foi montado em formas, enquanto a resina foi polimerizada em estufa a 70 °C por 24 h.

A obtenção de cortes semifinos foi realizada em ultramicrotomo Sorvall, utilizando navalha de vidro sendo os cortes tratados com azul de toluidina para localização de regiões do micélio do fungo que possibilitavam a visualização dos septos. Os cortes ultrafinos foram feitos com o mesmo equipamento, sendo eles montados em grades de Cu previamente recobertas com Formvar preparado em solução 0,3 % em clorofórmio. A contrastação do material foi efetuada pela imersão em solução de acetato de uranila, por 30 min, seguida de citrato de Pb, por 15 min. Finalmente, os cortes foram levados à observação em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109), operando a 80 kV, e as regiões onde era possível a distinção do septo dolipórico foram fotografadas, utilizando-se filme de 35 mm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observados *pelotons* nos cortes transversais das raízes de *G. crispa*, *C. organense* e *Bulbophyllum* sp., apresentando o sistema radicular de *G. crispa* mais de 90 % das células do córtex colonizadas (Figura 1A), enquanto as demais espécies apresentavam cerca de 50 % de colonização (Figura 1B), como observado em outras espécies de orquídeas epífitas tropicais (Pereira, 2001). Os *pelotons* apresentavam-se bem distribuídos por todo o córtex da raiz e em todos os estádios de desenvolvimento, aparentemente intactos ou degradados (Figura 1C). Em *G. crispa* e *Campylocentrum* sp., foi observada a presença de hifas fora da região do córtex da raiz, na extensão da superfície externa do velame. Esse tipo de distribuição não é comum, mas tem sido observado em fungos rizoctonióides encontrados associados às espécies de orquídeas epífitas tropicais (Richardson et al., 1993; Pereira, 2001).

O padrão de colonização mais comumente observado nos cortes das raízes amostradas consistia na presença de *pelotons* não degradados, circundando toda a região mais externa do córtex, próximo à superfície interna do velame e de novelos de hifas digeridas na região mediana e mais interna do córtex (Figura 1C). A presença de *pelotons* intactos circundando a região mais externa do córtex da raiz talvez sirva como uma importante fonte de inóculo para a manutenção de hifas na superfície externa do velame de orquídeas epífitas, promovendo a infecção de sementes depositadas junto ao sistema radicular de plantas adultas na natureza (Pereira et al., 2005). O padrão de colonização com sincronismo de *pelotons* intactos e degradados em toda região do córtex, como comumente observado

em orquídeas terrestres de clima temperado (Zelmer et al., 1996), não foi constatado. Os fungos isolados diretamente dos *pelotons* eram todos rizoctonióides, pertencentes aos gêneros: *Rhizoctonia* ou *Ceratorhiza* (Quadro 1).

Os três isolados obtidos de *pelotons* intactos mostravam ramificação de hifas em ângulo reto e constrição da hifa na altura do septo (Figura 1D e E), características marcantes do micélio vegetativo de rizoctonias (Sneh et al., 1991). Em BDA, os isolados M8 e M10 apresentavam micélio aéreo abundante, inicialmente creme, tornando-se amarronzado em poucos dias, enquanto o isolado M9 mostrava micélio branco. Todos os isolados apresentavam micélio vegetativo consistindo de hifas septadas, sem grampo de conexão, diâmetro superior a 4,0 µm, parede lisa e pouco espessa. Todos os isolados formaram células monilióides em meio fubá (Figura 1D), após quatro semanas de incubação, as quais se apresentavam cilíndricas ou na forma de barril e sem espessamento de parede. A formação de células monilióides caracteriza os fungos pertencentes ao grupo dos fungos rizoctonióides (Roberts, 1999). O isolado M10 destaca-se pela produção de células monilióides em grande quantidade, arranjadas à semelhança de microescleródios (Figura 1F) e de coloração róseo-alaranjada quando expostas à iluminação. Nenhum himênio pertencente à fase sexuada foi observado em meio fubá, caracterizando a não-indução de fase sexuada pelo método utilizado. O insucesso na indução de fase sexuada em cultura é comumente relatado para diversos isolados de fungos micorrízicos de orquídeas (Zelmer et al., 1996; Pereira, 2001; Shan et al., 2002).

Richardson et al. (1993) relataram o isolamento de *Ceratorhiza goodyerae-repentis* do sistema radicular de *Campylocentrum micranthum* (Lindl.) Rolfe, enquanto Otero et al. (2002), em estudo filogenético, relataram o isolamento de *Ceratorhiza* do sistema radicular de *Campylocentrum fasciola* (Lindl.) Cogn. e *Campylocentrum filiforme* (Sw.) Cogn. O gênero de fungo rizoctonióide *Ceratorhiza* parece estar associado ao gênero *Campylocentrum*. Para o isolado de *Ceratorhiza* M9 obtido de *C. organense* neste trabalho, bem como para outros isolados de *Ceratorhiza* (M2, M3, M4, M7 e M8) previamente isolados de orquídeas epífitas

neotropicais (Pereira, 2001), não foi identificada a espécie, uma vez que a taxonomia da espécie para *Ceratorhiza* e *Rhizoctonia*, baseada em caracteres morfológicos específicos, é extremamente difícil, pois o fungo raramente apresenta uma característica peculiar da espécie que não mostre variação com o tipo de meio de cultivo utilizado (Andersen, 1990). O trabalho de Richardson et al. (1993) constitui o primeiro relato de *Ceratorhiza* associado ao gênero *Campylocentrum*; entretanto, *C. goodyerae-repentis* é considerado táxon inválido (Andersen, 1990). Portanto, a comparação do isolado M9 com as características morfológicas relatadas para *C. goodyerae-repentis* não permite afirmar tratar-se da mesma espécie ou de espécies diferentes de *Ceratorhiza* associadas ao gênero *Campylocentrum*. Para esses casos, o uso de ferramentas moleculares pode auxiliar a elucidar a existência de identidade genética entre diferentes isolados de fungos micorrízicos rizoctonióides (Pereira, 2001; Otero et al., 2002; Selosse et al., 2002; Shan et al., 2002).

Dentre as espécies conhecidas de *Campylocentrum*, *C. organense* é considerada altamente vulnerável, com alto risco de extinção (Miller & Warren, 1996). O isolado M9 pode ser de grande valia em futuros programas de reintrodução de *Campylocentrum* na natureza, por meio do cultivo simbiótico de sementes. A mesma perspectiva pode ser sugerida em relação ao uso dos isolados M8 e M10 em futuros programas de reintrodução de espécies de orquídeas ameaçadas de extinção em seu habitat natural. Em ambos os casos, é fundamental o estudo prévio da compatibilidade dos isolados em relação às espécies de orquídeas a serem micorrizadas, a exemplo da seleção de isolados de fungos ectomicorrízicos compatíveis, previamente ao estabelecimento de programas de micorrização controlada em espécies florestais (Costa et al., 2003).

A condição multinucleada do isolado M8 de *G. crista* (Figura 1G) asseguraria sua classificação como pertencente ao gênero *Moniliopsis* (Moore, 1987). Moore propõe o gênero *Moniliopsis* para acomodar anamorfos com teleomorfos em *Thanatephorus* e *Waitea* (ambos com células multinucleadas); entretanto, embora a proposta esteja de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, o nome *Rhizoctonia* foi mantido por conservação (nomina conservanda) em

Quadro 1. Código, hospedeiro, condição nuclear, tipo de parenteossoma e gênero dos três isolados de fungos micorrízicos das orquídeas estudadas

Código do solado	Hospedeiro	Condição nuclear	Parenteossoma	Gênero
M8	<i>Gomesa crista</i>	multinucleado	perfurado	<i>Rhizoctonia</i>
M9	<i>Campylocentrum organense</i>	binucleado	perfurado	<i>Ceratorhiza</i>
M10	<i>Bulbophyllum</i> sp.	binucleado	perfurado	<i>Ceratorhiza</i>

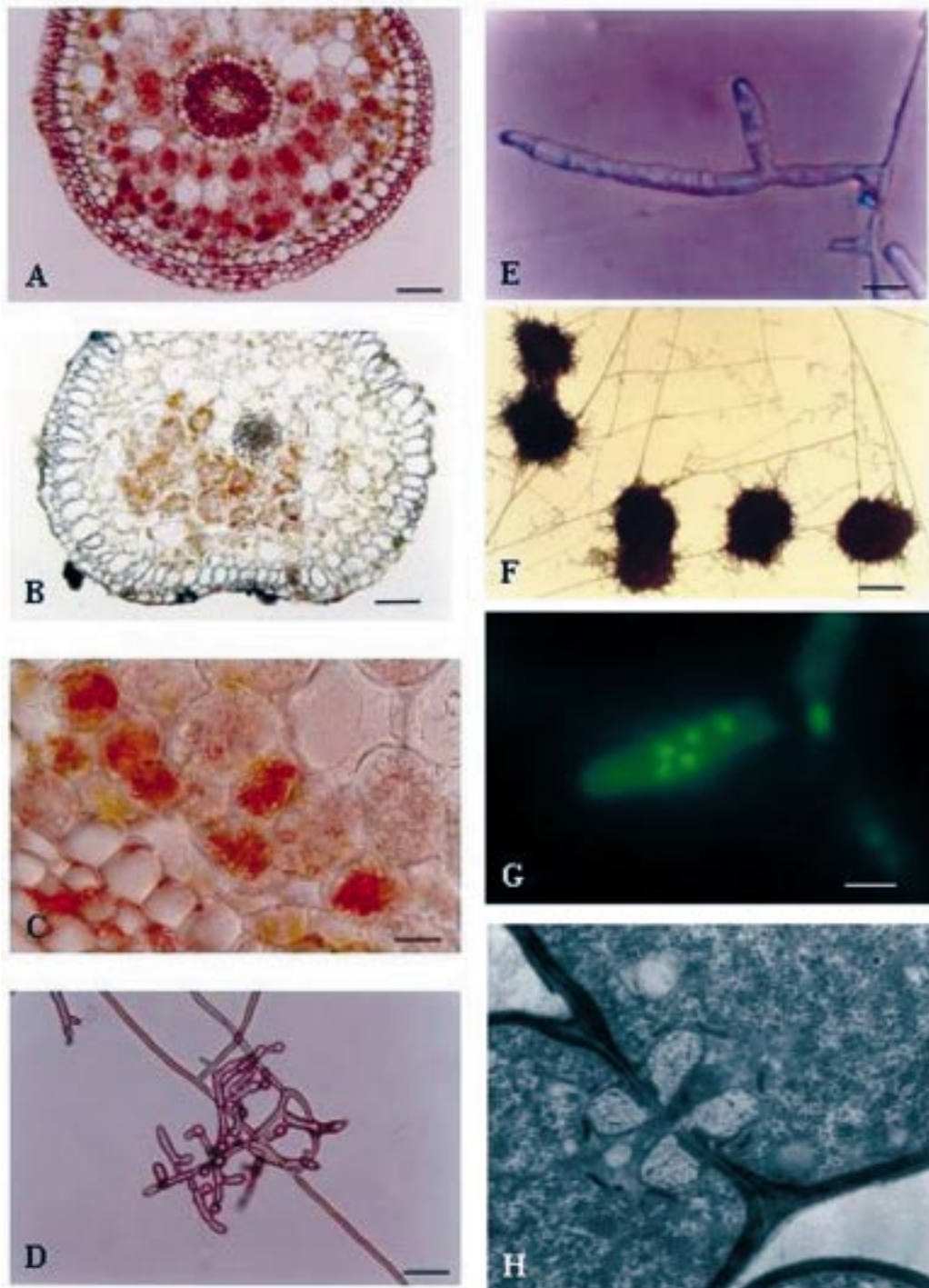


Figura 1. (A) Corte transversal de raiz de *Gomesa crispera* e de (B) *Campylocentrum organense*, notando-se a colonização das células do córtex; (C) detalhe da visualização de pelotons intactos, notando-se a presença de hifas amarronzadas, septadas e individualizadas e pelotons digeridos, notando-se a presença de massa fúngica sem hifas individualizadas; (D) Células monilióides de *Rhizoctonia* isolada do sistema radicular de *G. crispera* formadas após incubação por quatro semanas em ágar fubá; (E) Hifa vegetativa gutulada de *Ceratorhiza*, isolado M9, com ramificação em ângulo reto e constricção da hifa na altura do septo; (F) Microescleródios de *Ceratorhiza*, isolado M10, formados após incubação por cinco semanas em ágar fubá; (G) Célula multinucleada de *Rhizoctonia*, isolado M8, corada com SYBRâ Green I e (H) Microscopia eletrônica de transmissão da secção longitudinal da hifa vegetativa de *Ceratorhiza*, isolado M9, mostrando a ultra-estrutura do septo dolipórico, as setas indicam o parenteossomo do tipo perfurado. Barras: (A) e (B) = 10 µm; (C) e (E) = 20 µm; (D) = 40 µm; (F) = 100 µm; (G) = 4,0 µm e (H) aumento de 25.000X.

razão da importância econômica desse táxon e do número de trabalhos já publicados, utilizando o nome *Rhizoctonia* (Stalpers et al., 1998). O gênero *Rhizoctonia* foi descrito por DeCandole em 1815, sendo *R. solani* a mais conhecida espécie deste gênero por tratar-se de um fungo de ampla distribuição geográfica, de grande importância econômica, fitopatogênico de diversas espécies vegetais (Ogoshi, 1996). Além de reconhecido fitopatogênico, *Rhizoctonia* é também relatado em associações micorrízicas (Andersen & Rasmussen, 1996) e endofíticas (Bayman et al., 1997) com orquídeas.

No Brasil, os primeiros estudos taxonômicos de fungos micorrízicos em orquídeas nativas relatam o isolamento de *Ceratohiza* spp. a partir de raízes de *Isochilus lineares* (Jacq.) R. Br., *Maxillaria marginata* Fenzl., *Oncidium flexuosum* (Kunth) Lindl. e *Oncidium varicosum* Lindl. & Paxton (Pereira, 2001); *Epulorhiza repens* de *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. (Pereira et al., 2001), e *Epulorhiza epiphytica* Pereira, Rollemberg et Kasuya de *Epidendrum rigidum* Jacq. e *Polystachya concreta* (Jacq.) Garay & Sweet (Pereira et al., 2003a). Nenhum fungo micorrízico pertencente ao gênero *Rhizoctonia* foi previamente relatado em orquídea brasileira.

Os três isolados de fungos micorrízicos apresentaram ultra-estrutura do septo como sendo do tipo dolipórico, com parenteossoma do tipo perfurado (descontínuo). *Ceratohiza* e *Rhizoctonia* possuem, respectivamente, teleomorfos em *Ceratobasidium* e *Thanatephorus*, ambos pertencentes à família Ceratobasidiaceae (Basidiomycetes). À exceção dos Ustilaginales, que apresentam septo simples, todos os outros basidiomicetos apresentam elaborado aparato do poro do septo, denominado estrutura doliporo/parenteossoma (D/P) (Moore & McAlear, 1962). Os três isolados dispunham de estrutura D/P com quatro largas perfurações (Figura 1H), como já observado em *Ceratohiza* e *Rhizoctonia* isoladas ou micorrízicas de orquídeas terrestres de ambiente temperado (Andersen, 1996; Currah & Sherburne, 1992).

Os isolados foram armazenados em discos de BDA contendo micélio fúngico imersos em água destilada esterilizada a 4 °C em câmara fria (Sneh & Adams, 1996), como parte da micoteca do Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia/UFV, com o código de registro (Quadro 1).

CONCLUSÕES

1. Fungos micorrízicos rizoctonióides mostraram-se associados ao sistema radicular de *Campylocentrum organense*, *Bulbophyllum* sp. e *Gomesa crispa*.

2. O fungo associado a *Campylocentrum organense* e *Bulbophyllum* sp. foi identificado como *Ceratohiza* e à *Gomesa crispa* como *Rhizoctonia*.

3. Este foi o primeiro relato de *Rhizoctonia* micorrízica isolada de orquídea epífita no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Estadual de Florestas (IEF), pela concessão de registro para coleta de orquídeas e sementes em áreas de conservação biológica do estado de Minas Gerais. Este trabalho é parte integrante do estudo da biodiversidade de fungos micorrízicos associados ao sistema radicular de orquídeas brasileiras financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), registro 708/02. Ao CNPq, pela concessão de bolsas de pesquisa; ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV; ao Prof. Kiyoshi Matsuoka, pela orientação em microscopia eletrônica de transmissão; à Sociedade Brasileira de Orquidófilos, e ao Ph.D. Larry Peterson, University of Guelph (Canadá), pelo constante apoio e incentivo.

LITERATURA CITADA

- ANDERSEN, T.F. & RASMUSSEN, H.N. The mycorrhizal species of *Rhizoctonia*. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S. & DIJST, G., eds. *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1996. p.379-390.
- ANDERSEN, T.F. A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia sensu lato* employing morphological, ultrastructural and molecular methods. *Mycol. Res.*, 100:1117-1128, 1996.
- ANDERSEN, T.F. A study of hyphal morphology in the form genus *Rhizoctonia*. *Mycotaxon*, 37:25-46, 1990.
- BAYMAN, P.; LEBRÓN, L.; TREMBLAY, R.L. & LODGE, D.J. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytol.*, 135:143-149, 1997.
- CLEMENTS, M.A.; MUIR, H. & CRIBB, P.J. A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew Bull.*, 41:437-445, 1986.
- COSTA, C.M.R.; HERMANN, G.; MARTINS, C.S.; LINS, L.V. & LAMAS, I.R. Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, 1998. 94p.
- COSTA, M.D.; PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M. & BORGES, A.C. Ectomicorrizas: A face oculta das florestas – aplicações biotecnológicas das ectomicorrizas na produção florestal. *Biotec. Ci. Desenvol.*, 29:38-46, 2003.
- CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York, Columbia University Press, 1981. 1262p.
- CURRAH, R.S. & SHERBURNE, R. Septal ultrastructure of some fungal endophytes from boreal orchid mycorrhizas. *Mycol. Res.*, 96:583-587, 1992.

- CURRAH, R.S. *Thanatephorus pennatus* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of *Calypso bulbosa* (Orchidaceae) from Alberta. *Can. J. Bot.*, 65:1957-1960, 1986.
- DRESSLER, R.L. *Phylogeny and classification of the Orchid Family*. Cambridge, Cambridge University Press, 1993. 314p.
- HAWKSWORTH, D.L. *Mycologist's handbook*. Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1974. 231p.
- KASUYA, M.C.M.; PEREIRA, O.L.; ROLLEMBERG, C.L.; BORGES, A.C. & ARAÚJO, E.F. Mycorrhizal fungi from neotropical Brazilian orchids. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MYCORRHIZAE (ICOM), 4., Montreal, 2003. *Anais. Montreal, Canadian Society of Soil Science and Canadian Society of Agronomy*, 2003. p.414.
- LANGE, A. & MOREIRA, F.M.S. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. *R. Bras. Ci. Solo*, 26:529-533, 2002.
- LEACH, C.M. Sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation. *Can. J. Bot.*, 40:151-161, 1962.
- LEAKE, J. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol.*, 127:171-216, 1994.
- MEINHARDT, L.W.; BELLATO, C.M. & TSAI, S.M. SYBR® Green I used to evaluate nuclei number of fungal mycelia. *Biotechniques*, 31:42-46, 2001.
- MENDONÇA, M.P. & LINS, L.V. Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas & Fundação Zôo-Botânica de Belo Horizonte, 2000. 157p.
- MILLER, D. & WARREN, R. Orquídeas do Alto da Serra – da mata atlântica pluvial do sudeste do Brasil. Rio de Janeiro, Salamandra, 1996. 256p.
- MOORE, R.T. & McALEAR, J.H. Fine structure of mycota. 7. Observations on septa of ascomycetes and basidiomycetes. *Am. J. Bot.*, 49:86-94, 1962.
- MOORE, R.T. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon*, 29:91-99, 1987.
- OGOSHI, A. Introduction – The Genus *Rhizoctonia*. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S. & DIJST, G., eds. *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1996. p.1-9.
- OTERO, J. T.; ACKERMAN, J. D. & BAYMAN, P. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *Am. J. Bot.*, 89:1852-1858, 2002.
- PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M.; BORGES, A.C. & ARAÚJO, E.F. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Can. J. Bot.*, 83:54-65, 2005.
- PEREIRA, O.L. Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécies de orquídeas neotropicais. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2001. 48p. (Tese de Mestrado)
- PEREIRA, O.L.; ROLLEMBERG, C.L.; BORGES, A.C.; MATSUOKA, K. & KASUYA, M.C.M. *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. *Mycoscience*, 44:153-155, 2003a.
- PEREIRA, O.L.; ROLLEMBERG, C.L. & KASUYA, M.C.M. Association des mycorrhizies dans les orchidees – perspectives d'utilisation dans les programmes de propagation symbiotique. *Orchidees*, 55:24-27, 2003b.
- PEREIRA, O.L.; ROLLEMBERG, C.L.; PEIXOTO, H.T.M.; ARAÚJO, E.F.; BORGES, A.C. & KASUYA, M.C.M. *Epulorhiza repens*: a orchid mycorrhizal fungus of *Oeceoclades maculata*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., Foz do Iguaçu, 2001. *Anais. Foz do Iguaçu, Sociedade Brasileira de Microbiologia*, 2001. p.259.
- PETERSON, R. L.; UETAKE, Y. & ZELMER, C. Fungal symbiosis with orchid protocorms. *Symbiosis*, 25:29-55, 1998.
- RASMUSSEN, H.N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil*, 244:149-163, 2002.
- RICHARDSON, K.A.; CURRAH, R.S. & HAMBLETON, S. Basidiomycetous endophytes from the roots of neotropical epiphytic orchidaceae. *Lindleyana*, 8:127-137, 1993.
- ROBERTS, P. *Rhizoctonia*-forming fungi. Kew, Whitstable Litho Printers, 1999. 239p.
- RUSCHI, A. Orquídeas do estado do Espírito Santo. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura, 1986. 278p.
- SELOSSE, M.A.; WEIã, M.; JANY, J.L. & TILLIER, A. Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.M.C. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Mol. Ecol.*, 11:1831-1844, 2002.
- SHAN, X.C.; LIEW, E.C.Y.; WEATHERHEAD, M.A. & HODGKISS, I.J. Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. *Mycologia*, 94:230-239, 2002.
- SMITH, S.E. & READ, D.J. *Mycorrhizal symbiosis* 2.ed. San Diego, Academic Press, 1997. 605p.
- SNEH, B. & ADAMS, G.C. Culture preservation methods for maintaining the genetic integrity of *Rhizoctonia* spp. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S. & DIJST, G., eds. *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1996. p.13-35.
- SNEH, B.; BURPEE, L. & OGOSHI, A. Identification of *Rhizoctonia* species. Minnesota, APS Press, 1991. 133p.
- STALPERS, J.A.; ANDERSEN, T.F. & GAMS, W. Two proposals to conserve the names *Rhizoctonia* and *R. solani* (Hyphomycetes). *Taxon*, 47:725-726, 1998.
- WILKINSON, K.G.; DIXON, K.W.; SIVASITHAMPARAM, K. & GHISALBERTI, E.L. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant Soil*, 159:291-295, 1994.
- ZELMER, C.D.; CUTHBERTSON, L. & CURRAH, R.S. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience*, 37:439-448, 1996.
- ZETTLER, L.W. Orchid-fungal symbiosis and its value in conservation. *McIvainea*, 13:40-45, 1997a.
- ZETTLER, L.W. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. *Sebyana*, 18:188-194, 1997b.

