AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INFECÇÃO MICORRÍZICA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-CITOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Pisolithus tinctorius*

LILIANA KEÍKO MITSUNAGA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1991

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INFECÇÃO MICORRÍZICA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-CITOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Pisolithus tinctorius*

LILIANA KEIKO MITSUNAGA
Bióloga

Orientador: Profa. Dra. ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Mitsunaga, Liliana Keiko
M684a Avaliação do potencial de infecção micorrízica e caracterização genético-citológica de isolados de Pisolithus tinctorius. Piracicaba, 1991.
143p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Fungo - Citologia 2. Fungo - Genética 3. Micorriza - Potencial infeccioso 4. Micorriza - Protoplasto I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.2

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INFECÇÃO MICORRÍZICA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-CITOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Pisolithus tinctorius*

Liliana Keiko Mitsunaga

Aprovada em: 12.12.1991

Comissão julgadora:

Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner	ESALQ/USP
Profa. Dra. Maria Helena P. Fungaro	UEL/PR
Dr. Itamar Soares de Melo	EMBRAPA

Aline A. Pizzirani-Kleiner

Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner

Orientadora

Ao

Henrique N. Yamauchi

com carinho.

Aos meus pais

Sigeo Mitsunaga e

Mitiko Mitsunaga,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

. À Profa. Aline A. Pizzirani-Kleiner, pela orientação, confiança e incentivo;

. Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pelas sugestões, apoio e amizade;

. Ao Prof. Dr. Cyro Grossi ("in memorian") por ter me iniciado na pesquisa;

. À pesquisadora Maria Eunice Assis Castro pela valiosa colaboração, dedicação, amizade e estímulo;

. Ao Dr. Ming Tien Lin pela concessão dos isolados de *Eucalyptus* e por colocar à disposição o laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Bioplanta Tecnologia de Plantas Ltda. para realização deste trabalho;

. Ao Prof. Tasso Léo Krügner pela concessão dos isolados de *Pinus* utilizados neste trabalho;

. Ao Prof. Dr. Yoshitaka Tanaka, pelo empenho na realização dos estudos citológicos;

. Aos professores do Departamento de Genética da ESALQ pelos ensinamentos e contribuição à minha formação profissional;

. Ao amigo Edérson Akio Kido pelo auxílio nas análises estatísticas;

. À amiga Benedita Aparecida da Silva, pelo constante incentivo e amizade;

. Aos colegas do laboratório de Genética de Microrganismos, pela amizade e convivência;

. A Rosmary dos Santos, pelo auxílio na listagem bibliográfica;

. Aos funcionários do Laboratório de Genética de Microrganismos, Sandra R. Campos, Carlos A. Nolasco e em especial ao Sr. Antonio Rocha Campos, pela colaboração cotidiana;

. Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Bioplanta Tecnologia de Plantas Ltda. pela amizade, colaboração e convivência;

. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida;

. À todos que manifestaram colaboração, apoio, incentivo ou crítica, no sentido de motivar a realização desse trabalho.

ÍNDICE

Página

LISTA DE TABELAS xiv
LISTA DE FIGURAS xvii
RESUMO xviii
SUMMARY xxi

1. INTRODUÇÃO 01

2. REVISÃO DE LITERATURA 04
   2.1. Aspectos citogenéticos em fungos 04
      2.1.1. Componentes do núcleo 04
      2.1.2. Divisão somática 06
   2.2. Protoplastos de fungos basidiomicetos 12
   2.3. Fatores que influenciam a infecção ectomicorrízica 18
      2.3.1. Influência de metais pesados na infecção micorrízica 20

3. MATERIAL E MÉTODOS 23
   3.1. Isolados utilizados 23
   3.2. Manutenção dos isolados 24
   3.3. Esterilização e incubação 25
   3.4. Meios de cultura utilizados 25
      3.4.1. Meio MNM (Melin Norkrans - modificado), de acordo com MARX, 1969 25
      3.4.2. Meio BDA 26
      3.4.3. Meio BDA-D 26
      3.4.4. Meio BDMT 27
      3.4.5. Meio MNMB 27

Página

3.4.6. Meio MNM líquido (Melin Norkrans modificado) MARX, 1969 27
3.4.7. Meio BDA líquido 27
3.4.8. Meio BDA-D líquido 28
3.4.9. Meio BDMT líquido 28
3.4.10. Meio MNMB líquido 28
3.4.11. Meio MNM+M semi sólido para regeneração de protoplastos 28
3.4.12. Meio MNM+M líquido 28
3.5. Soluções utilizadas 29
3.5.1. Solução de $FeCl_3$ 1% 29
3.5.2. Solução de Albumina 50% 29
3.5.3. Solução de Giemsa 29
3.5.4. Tampão fosfato 0,07M pH 7,0 30
3.5.5. Tampão fosfato 0,02M pH 5,8 30
3.5.6. Solução estoque de acrilamida 31
3.5.7. Tampão do gel separador 31
3.5.8. Tampão do gel empilhador 31
3.5.9. Tampão do tanque 31
3.5.10. Tampão da amostra 32
3.5.11. Gel separador a 10% 32
3.5.12. Gel empilhador a 4% 32
3.5.13. Solução de persulfato de amônia (AP) 33
3.5.14. Solução Tris-HCl 0,5M 33
3.5.15. Solução α,β-naftil acetato 1% 33
3.5.16. Solução para revelação de esterases. 33
3.5.17. Solução de NaOH 5N 33
3.5.18. Solução manitol 0,6M 34
3.5.19. Solução de enzima para produção de protoplastos 34
3.5.20. Solução de complexo lítico I para produção de protoplastos 34
3.5.21. Solução de complexo lítico II para produção de protoplastos 34

Página

3.5.22. Solução estoque 1 da solução nutritiva 35
3.5.23. Solução estoque 2 da solução nutritiva 35
3.5.24. Solução estoque 3 da solução nutritiva 35
3.5.25. Solução estoque 4 da solução nutritiva 35
3.5.26. Solução estoque 5 da solução nutritiva 36
3.5.27. Solução estoque 6 da solução nutritiva 36
3.5.28. Solução nutritiva (Furlani, 1984) .. 36
3.5.29. Solução nutritiva 5 ppm de alumínio. 37
3.5.30. Solução nutritiva 10 ppm de alumínio 37
3.5.31. Solução nutritiva 15 ppm de alumínio 37
3.5.32. Solução nutritiva 20 ppm de alumínio 37
3.5.33. Solução estoque de alumínio 38
3.5.34. Solução nutritiva para fertilização de plantas de *Eucalyptus* de acordo com RUEHLE & WELLS (1984) 38
3.5.35. Solução de KOH 10% 38
3.5.36. Solução de HCl 1% 39
3.5.37. Solução descorante 39
3.5.38. Solução corante trypan-blue 39
3.6. Substratos utilizados 39
3.6.1. Substrato turfa-vermiculita - Meio MNM para produção de inoculante 39
3.6.2. Substrato Turfa-Vermiculita - Meio BDA para produção de inoculante 40
3.6.3. Substrato Turfa-Vermiculuta - Meio BDA-D para produção de inoculante .. 40

Página

3.6.4. Substrato Turfa-Vermiculuta - Meio BDMT para produção de inoculante ... 40
3.6.5. Substrato Turfa-Vermiculita - Meio MNMB para prrodução de inoculante .. 40
3.6.6. Substrato Turfa - Vermiculita para produção de mudas 41
3.7. Sementes utilizadas 41
3.8. Caracterização do crescimento dos isolados de *Pisolithus tinctorius* em diferentes meios de cultura 41
3.9. Produção de biomassa dos isolados de *Pisolithus tinctorius* em diferentes meios de cultura 43
3.10. Técnica para coloração de núcleos (TANAKA et alii, 1979) 44
3.10.1. Determinação do número de núcleos por célula somática micelial 45
3.10.2. Medida do tamanho de núcleos 45
3.10.3. Observações da divisão nuclear em células somáticas do micélio 46
3.11. Caracterização eletroforética (PACCOLA-MEIRELLES et alii, 1988) 46
3.11.1. Preparação das amostras 46
3.11.2. Placa de gel de acrilamida 47
3.11.3. Aplicação das amostras e corrida da eletroforese 47
3.11.4. Revelação das esterases 48
3.12. Obtenção de protoplastos 48
3.12.1. Avaliação da idade do micélio na liberação de protoplastos 49
3.12.2. Comparação de diferentes enzimas na liberação de protoplastos 49

Página

3.12.3. Determinação do número de protoplastos 50
3.12.4. Medida do tamanho dos protoplastos. 50
3.12.5. Regeneração de protoplastos 50
3.12.6. Coloração de núcleos dos protoplastos (BORGES, 1987) 51
3.13. Síntese de ectomicorriza em *Eucalyptus* com isolados de *Pisolithus tinctorius* em diferentes níveis de alumínio em casa de vegeção 52
3.13.1. Produção de inoculante 52
3.13.2. Inoculação do substrato 52
3.13.3. Recipiente 53
3.13.4. Semeadura 53
3.13.5. Local da instalação do experimento. 53
3.13.6. Delineamento estatístico 53
3.13.7. Desbaste 54
3.13.8. Adubação e aplicação do alumínio no substrato 54
3.13.9. Avaliação visual de colonização ... 55
3.13.10. Coloração de raízes para avaliação de colonização 55
3.13.11. Análise química do substrato 55
3.14. Coleta e isolamento de *Pisolithus tinctorius* 56
3.15. Seleção de isolados de *Pisolithus tinctorius* para três espécies de *Eucaliptus* quanto à eficiência para formação de micorrizas 56
3.15.1. Produção de inoculante 56
3.15.2. Inoculação do substrato 57
3.15.3. Recipiente 57
3.15.4. Semeadura 57

Página

3.15.5. Local de instalação do experimento. 58
3.15.6. Delineamento estatístico 58
3.15.7. Desbaste 58
3.15.8. Adubação 58
3.15.9. Avaliação 59
3.16. Avaliação do grau de micorrização de mudas de *Eucalyptus urophylla* proveniente de semeio direto e plântulas, inoculadas com isolados de *Pisolithus tinctorius* 59
3.16.1. Produção de inoculante 59
3.16.2. Inoculação do substrato 59
3.16.3. Recipiente 60
3.16.4. Semeadura 60
3.16.5. Transplante de plântulas 60
3.16.6. Local de instalação do experimento. 61
3.16.7. Delineamento estatístico 61
3.16.8. Desbaste 62
3.16.9. Adubação 62
3.16.10. Avaliação 62
3.17. Produção de inoculante de um isolado de *Pisolithus tinctorius* em diferentes substratos 63
3.17.1. Preparo do substrato 63
3.17.2. Produção de inoculante 63
3.17.3. Delineamento estatístico 63
3.17.4. Avaliação 64

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 65
4.1. Caracterização do crescimento dos isolados de *Pisolithus tinctorius* em diferentes meios de cultura 65

Página

4.2. Produção de biomassa dos isolados de *Pisolithus tinctorius* em diferentes meios de cultura 70
4.3. Caracterização citológica 77
4.4. Padrão eletroforético de esterases 83
4.5. Obtenção de protoplastos 85
4.6. Avaliação da formação de ectomicorriza em *Eucalyptus* com isolados de *Pisolithus tinctorius* em diferentes concentrações de alumínio 90
4.7. Coleta e isolamento de *Pisolithus tinctorius* 96
4.8. Avaliação da seleção de isolados de *Pisolithus tinctorius* para três espécies de *Eucalyptus* quanto a eficiência para formação de micorriza 97
4.9. Avaliação do grau de micorrização de mudas de *Eucalyptus urophylla* provenientes de semeio direto e plântulas, inoculadas com isolados de *Pisolithus tinctorius* 97
4.10. Avaliação da produção de inoculante de um isolado de *Pisolithus tinctorius* em diferentes substratos 106

5. CONCLUSÕES 109

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 111

APÊNDICE 124

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
01	Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados das medidas dos diâmetros das colônias em placas contendo diferentes meios de cultura .	66
02	Comparação das médias (diâmetros de colônias) de isolados pelo teste de Tukey	67
03	Comparação das médias (diâmetros de colônias) de meios pelo teste de Tukey	67
04	Comparação das médias de diâmetros das colônias dos isolados em função da idade (dias) pelo teste de Tukey	68
05	Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados das medidas de pesos secos de micélio de diferentes isolados em diferentes meios de cultura	71
06	Comparação das médias (peso seco de micélio) de isolados inoculados em diferentes meios de cultura pelo teste de Tukey	72
07	Comparação das médias (peso seco de micélio) dos isolados dentro de cada meio	73
08	Comparação das médias (peso seco de micélio) de meios pelo teste de Tukey	74

TABELA Nº Página

09 Comparação das médias de meios (peso seco de micélio) dentro de cada isolado 75

10 Liberação de protoplastos de *Pisolithus tinctorius* usando diferentes preparações enzimáticas 86

11 Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados da avaliação da síntese de ectomicorriza em *Eucalyptus* em diferentes níveis de alumínio através de coloração de raízes 93

12 Resultado da análise química do substrato utilizado para o experimento da síntese de ectomicorriza em *Eucalyptus* em diferentes concentrações de alumínio 94

13 Dosagem de alumínio nos substratos no final do experimento 94

14 Concentração final da solução nutritiva .. 94

15 Avaliação do grau de micorrização de três espécies de *Eucalyptus*, inoculados com nove isolados de *Pisolithus tinctorius* 98

16 Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados do grau de micorrização de mudas de *Eucalyptus* provenientes do semeio direto e plântulas com isolados de *P. tinctorius* 100

TABELA Nº Página

17 Comparação das médias (grau de micorrização) de isolados de *Pisolithus tinctorius* pelo teste de Tukey 101

18 Comparação das médias (grau de micorrização) de isolados dentro de sementes e plântulas do fator fases de inoculação ... 101

19 Comparação das médias (grau de micorrização) de fases de inoculação pelo teste de Tukey 102

20 Comparação das médias (grau de micorrização) de sementes e plântulas do fator fases de inoculação dentro de cada isolado . 102

21 Crescimento do isolado PI 314 em diferentes substratos 107

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		Página
01	a - d) Desenvolvimento de hifas de *Pisolithus tinctorius*. Presença de dois núcleos por célula micelial	78
02	Fases da divisão mitótica em célula somática de micélio de *Pisolithius tinctorius*	82
03	Padrão eletroforético de esterases de diferentes isolados de *Pisolithus tinctorius*	84
04	Influência da idade do micélio na liberação de protoplastos do isolado FEP3 de *Pisolithus tinctorius* em diferentes tempos de incubação com Novozyme 234	87
05	1) Corpos de frutificação do fungo *Pisolithus tinctorius*; 2) Fase inicial da síntese de ectomicorriza em *Eucalyptus urophylla*; 3) Ectomicorriza *em Eucalyptus urophylla*	92

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INFECÇÃO MICORRÍZICA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-CITOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Pisolithus tinctorius*

Autor: Liliana Keiko Mitsunaga
Orientadora: Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com a finalidade de estudar alguns isolados de *Pisolithus tinctorius* quanto aos aspectos básicos de crescimento, características citológicas, padrão de esterases e obtenção de protoplastos e quanto ao potencial de infecção desses isolados em espécies de *Eucalyptus*.

A caracterização do crescimento em diferentes meios de cultura mostrou que os isolados AC 12, PI 314 e PI 203 apresentaram um bom crescimento em todos os meios testados, enquanto que os outros isolados mostraram modificações no hábito de crescimento micelial, e não apresentaram diferenças quanto a produção de biomassa nos diferentes meios. Na análise citológica, verificou-se que as hifas apresentam espessuras diferentes, cada célula micelial possui dois núcleos com diâmetro médio de 2,439 μm e a presença de pontes de conexão entre as células. O estudo do comportamento do núcleo durante a divisão de células somáticas demonstrou que a mitose é similar a que ocorre em

outros fungos com agregação dos cromossomos formando duas barras paralelas. O número de cromossomos não pode ser determinado. Os isolados de *P. tinctorius* obtidos de *Pinus* apresentaram um padrão eletroforético de esterases com quatro bandas. Para esses isolados foram padronizados a idade da cultura, a metodologia para extração das enzimas e a concentração das amostras. Para os isolados de *Eucalyptus*, não se obteve resultado satisfatório para esterases. Quanto a obtenção de protoplastos, fez-se a avaliação de algumas condições para o isolamento dos mesmos obtendo-se maior produção com a utilização de micélio com quatro dias de idade, Novozym 234 e manitol como estabilizador osmótico.

Quanto aos aspectos mais práticos, fez-se a avaliação de alguns isolados para a síntese de micorriza em espécies de *Eucalyptus* em diferentes concentrações de alumínio. Os resultados obtidos não foram satisfatórios devido a grande falha na micorrização das plantas. Novos isolados foram obtidos e entre esses, selecionou-se o AT 501 e o AT 502 para *Eucalyptus urophylla* e *E. paniculata* e o AT 502 e AT 508 para *E. torelliana*. Para os outros isolados, mais de 50% das plantas não apresentaram micorrizas. Para superar a não infecção observada, fez-se a inoculação de plântulas ao invés de sementes como havia sendo feito anteriormente. Com essa alteração, o problema da falha de micorrização foi eliminado porque provavelmente as partículas de vermiculita

utilizadas para a produção de inóculo, estivessem mais externamente tomadas pelas hifas do fungo as quais não sobreviveram no período entre a inoculação e o desenvolvimento de raízes curtas das plantas.

POTENTIAL OF MYCORRHIZAL INFECTION, GENETIC AND CYTOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ISOLATES OF *Pisolithus tinctorius*

Author: Liliana Keiko Mitsunaga
Adviser: Prof. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner

SUMMARY

The present research was carried out in order to study basic aspects of growth, cytological characteristics, patterns of esterases and protoplast isolation of some isolates of *Pisolithus tinctorius* as well as their potential of mycorrhizal infection in *Eucalyptus*.

Growth characteristics in different media has shown that the isolates AC 12, PI 314 and PI 203 had good growth in all of them, while the other ones showed changes in mycelium growth and didn't show a difference in the biomass production. Cytological analysis of these isolates indicated that the hyphae had different widths, each mycelial cell had two nuclei with a diameter of 2.439 μm and the presence of clamp connexion between the cells. The study of the nuclei during the division of somatic cells showed that the mitosis is similar to that which occurs in other fungi, with the chromossomes forming two parallel bars. The cromossome number could not be determinated. *Pisolithus tinctorius* isolated from *Pinus* showed an eletro-

phoretic pattern of esterase with four bands. For the *Eucalyptus* isolates, there were no satisfactory results. An evaluation of different conditions was made for the isolation of protoplasts. Optimal yield were obtained with four day old mycelia, Novozym 234 and the osmotic stabilizer, mannitol.

For practical aspects, some strains were evaluated for their potential in mycorrhizal infection on *Eucalyptus* species in different concentrations of iron. The results were not satisfactory because of the failure to obtain infection of the plants. New strains were isolated and among them AT 501 and AT 502 were selected for *Eucalyptus urophylla* and *E. paniculata* and AT 502 and AT 508 for *E. torelliana*. The other strains did not infect more than 50% of the plants. In order to try to overcome this problem the inoculation of a few plants, instead of inoculation of seeds, was made. With this alteration, the problem of non infection was solved, probably because the fungi grown on particles of vermiculite were not able to survive during the period of root formation, when inoculated on seeds.

1. INTRODUÇÃO

As micorrizas, associações simbióticas entre raiz e fungo do solo, vêm despertando grande interesse dos cientistas devido aos benefícios que elas podem oferecer às plantas. Estas associações simbióticas permitem uma melhoria na absorção de água e nutrientes pela planta, aumentando sua capacidade de sobrevivência e tolerância a condições adversas (seca, extremos de temperatura, etc.) e agentes patogênicos. Existem dois tipos de fungos entre as micorrizas mais disseminadas: aqueles que se desenvolvem intercelularmente na raiz da planta, formando a rede de Hartig e crescem extensivamente fora a raiz, formando um manto; a esta associação denomina-se ectomicorriza , e, àquela com desenvolvimento predominante no interior das células da raiz, denomina-se endomicorriza.

Nas plantas de interesse florestal, as ecto e as endomicorrizas são freqüentes, sendo que em condições naturais um ou outro tipo predomina de acordo com a região considerada.

A importância dos fungos micorrízicos no desenvolvimento e sobrevivência de plantas florestais é evidente quando se tenta introduzí-las em solos desprovidos de inóculo natural destes fungos e o crescimento vegetal é falho (MIKOLA, 1973).

O setor florestal contribui de modo significativo para a economia nacional. Os produtos florestais representam 3% do produto nacional bruto e 3,5% de suas exportações. Atualmente cortes de 500 a 600 milhões de hectares devem ser feitos para atender ao consumo dos programas de papel, celulose, siderurgia e carvão vegetal e, nos próximos vinte anos, 5 milhões de hectares deverão ser reflorestados principalmente com *Pinus* spp e *Eucalyptus* spp (ZAMBOLIM & SIQUEIRA, 1985).

Entre as diversas espécies de fungos ectomicorrízicos que se associam às plantas florestais, o fungo *Pisolithus tinctorius* é comumente isolado em condições naturais, sendo também utilizado como inoculante e apresentando especificidade para *Pinus* e *Eucalyptus* (KRÜGNER & TOMAZELLO FILHO, 1979). É um fungo da classe Basidiomiceto, ordem Sclerodermatales, família Pisolithaceae. Segundo MULLETTE (1976), a primeira associação descrita desse fungo em *Eucalyptus* foi na África do Sul por A.A. van der Bijl, em 1917.

O *Pisolithus tinctorius* é uma espécie importante no estabelecimento de programa de micorrização e, no

entanto, é muito pouco conhecido quanto a sua biologia. Uma previsão do seu comportamento pode ser feita através de estudos fisiológicos, genéticos e ecológicos realizados em laboratório que em uma segunda fase muito contribuirão para o aumento da eficiência nos seus hospedeiros.

Diante destes fatos, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar alguns isolados de *Pisolithus tinctorius* sob dois aspectos:

a. Conhecimento básico desses isolados considerando-se a análise citológica, crescimento em diferentes meios de cultura, caracterização eletroforética e obtenção e regeneração de protoplastos;

b. Avaliação sob o ponto de vista mais aplicado considerando-se coleta, isolamento e seleção dos novos isolados de *P. tinctorius*, estudos sobre a interação entre alumínio e infecção micorrízica e a produção de mudas micorrizadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos citogenéticos em fungos

2.1.1. Componentes do núcleo

O envelope nuclear que envolve grande parte do DNA em fungos, consiste, como em eucariotos superiores, de duas membranas paralelas (FINCHAN et alii, 1979). Possuem poros que podem estar espalhados pela sua superfície ou, algumas vezes, concentrados em regiões específicas (BURNETT, 1976).

Em muitos organismos, o envelope nuclear dispersa-se durante a prófase, como em animais e plantas superiores; mas, em outros, permanece intacto durante a mitose, como observado em *Blastocladiella emersonii* (TURIAN & CANTINO, 1960), *Macrophomina phaseoli* (KNOX-DAVIES, 1967) e *Catenaria anguillulae* (ICHIDA & FULLER, 1968). Em alguns casos ocorre formação de abertura nos polos do envelope nuclear (MARTIN & MILLER, 1986). Segundo HEATH (1980a) estes são os três padrões mais comuns do comportamento do envelope nuclear na divisão do núcleo em fungos.

O nucléolo, uma estrutura tipicamente eucariótica, é um corpúsculo esférico, rico em ácido ribonucleico. Originam-se de um ponto específico em um dos cromossomos, o organizador do nucléolo (FINCHAN et alii, 1979) e, segundo HEATH (1980a) exibem uma série de padrões de comportamento durante a mitose, podendo persistir na sua forma interfásica (contraindo-se e originando duas partes aproximadamente iguais na telófase) ou dispersar-se durante a prófase. No entanto, entre estes extremos podem ser encontrados padrões de comportamento intermediários.

Outro componente, muito importante do núcleo é a cromatina, que é um complexo de DNA nuclear intimamente associado com proteínas histônicas e só podem ser vistos como corpúsculos separados durante a divisão nuclear. Em *Aspergillus*, *Neurospora* e *Saccharomyces* os componentes H_2A, H_2B, H_3 e H_4 das histonas são muito parecidos ou, em alguns casos, quase idênticos aos dos eucariotos superiores (FINCHAN et alii, 1979). Verifica-se não somente a presença de histonas, mas também de nucleossomos típicos.

A maioria dos eucariotos inferiores apresentam um padrão típico de heterocromatina-eucromatina na interfase, mas em alguns organismos a cromatina não se condensa em nenhum estágio do ciclo nuclear (HEATH, 1980b). O autor sugere que a heterocromatinização aparentemente não é um meio universal de controle gênico e que a condensação da cromatina não é um requerimento universal para a mitose.

HEATH (1980a) relata em sua revisão, fungos e protistas que apresentam esta falta de condensação da cromatina.

2.1.2. Divisão somática

Em muitos fungos podemos observar a condensação da cromatina e cromossomos independentes. Geralmente admite-se que a mitose nestes fungos segue o mesmo curso que em organismos superiores; porém, alguns autores encontraram que a mitose ocorria por divisão nuclear direta, através de alongamento, constricção e separação do núcleo em duas partes, sem formação de fases mitóticas ou cromossomos individualmente distintos.

Os trabalhos mostram que as mitoses fúngicas possuem particularidades que os colocam fora das formas mais comuns de divisão celular. As diferenças mais interessantes encontradas em alguns fungos incluem a segregação de cinetocoros em dois grupos durante a prófase, a ausência de condensação da cromatina e de placa metafásica, e a formação de um feixe central de microtúbulos (HEATH, 1980a).

Interfase

O núcleo interfásico dos fungos é morfologicamente similar ao núcleo interfásico de plantas superiores. São esféricos ou ovais, limitados por um envelope composto de duas membranas unitárias, contendo um proeminente nu-

cléolo. Em *Poria manticola* foram vistos filamentos duplos de cromatina; segundo BRUSHABER & JENKINS (1971) este é um fator comumente observado em núcleos interfásicos de fungos. SOMERS et alii (1960), observaram, em *Neurospora crassa*, segmentos heterocromáticos e um grande nucléolo. Os nucléolos em *Ceratocystis fagacearum* frequentemente estão localizados sobre a periferia da cromatina e, ocasionalmente, os núcleos redondos ou ovais tornam-se um pouco atenuados, parecendo uma massa de cromatina de contorno irregular, com os nucléolos ligados na extremidade dos cromossomos nucleolares (AIST & WILSON, 1967b). Em núcleos interfásicos de *Olpidiopsis varians*, além do nucléolo foram encontrados comumente inclusões de lipídios e, algumas vezes, dictiossomos associados ao núcleo (MARTIN & MILLER, 1986).

Algumas vezes, sobre ou próximo ao envelope nuclear, há uma organela que durante a divisão do núcleo está associada ao fuso. Esta organela apresenta ampla variação morfológica, podendo ser um centríolo ou uma estrutura mais simples que recebe várias denominações. ICHIDA & FULLER (1968) observaram em *Catenaria anguillulae* um simples par de centríolo, acompanhada por microtúbulos que irradiavam da região dos centríolos. Os centríolos neste fungo consistem de nove conjuntos de "triplets" arranjados em um padrão cilíndrico. Já em Basidiomicetos não foram descritos centríolos tubulares (BRUSHABER & JENKINS, 1971).

Prófase

A mitose praticamente inicia-se com a prófase, que é a fase mais interessante da divisão, pois é nesta etapa que a cromatina prepara-se para a divisão. Em *Neurospora crassa*, a prófase procede de maneira convencional. No estágio inicial os cromossomos são mais difíceis de serem observados, mas durante a prófase ocorre a espiralização e os cromossomos individualizados podem ser observados, bem como suas espirais (SOMERS et alii, 1960).

Já em *Ceratocystis fagacearum*, além de ocorrer o espessamento dos cromossomos, pode-se distinguir uma prófase inicial, observando-se a espessura dos cromossomos nucleolares que durante a interfase são muito finos e o nucléolo está a vários mícrons do corpúsculo de cromatina principal; mas, durante a prófase, o cromossomo nucleolar torna-se mais espesso e o nucléolo tende a permanecer dentro da massa de cromatina principal (AIST & WILSON, 1967b).

Segundo HEATH (1980a), a prófase é a fase mais negligenciada na literatura dos fungos. A metáfase e as figuras subsequentes são facilmente reconhecidas, mas alguns eventos da prófase se confundem com os da interfase.

De acordo com FULLER (1976), o reconhecimento de dois pares de centríolos é o primeiro sinal de que o núcleo está em prófase. Durante o estágio inicial da prófase em *Saprolegnia ferax*, cada núcleo é acompanhado por um simples par de centríolos extranucleares e, dentro do nú-

cleo, numa região diferenciada do envelope nuclear, adjacentes aos centríolos, formam-se microtúbulos curtos. Com o progresso da prófase, os centríolos se duplicam para formar dois pares e, durante este processo, os microtúbulos também separam-se em dois grupos discretos que depois se reorientam para formarem fusos metafásicos bipolares.

Metáfase

Em alguns fungos, os eventos da metáfase são convencionais: mostram placas metafásicas típicas. Já em outros, os cromossomos estão dispersos ao longo do fuso. A metáfase, em fungos centriolares, geralmente é clássica - os pares de cromátides estão alinhados sobre a placa equatorial. Em *Neurospora crassa* os cromossomos assumem configurações similares à metáfase mitótica regular. Os cromossomos individuais podem ser vistos alinhados na placa metafásica e, neste estágio, a morfologia dos cromossomos podem ser distinguidas (SOMERS et alii, 1960). Uma placa metafásica típica também foi observada por WARD & CIURYSEK (1961) em um Basidiomiceto onde todos os cromossomos também foram distinguidos.

Durante a metáfase em *Catenaria anguillulae*, a estrutura dos corpúsculos polares do fuso é claramente vista e a conexão das fibras com os cromossomos são evidentes (ICHIDA & FULLER, 1968). Nestes casos, os cromossomos são claramente separados de maneira tradicional; mas, em

alguns casos, foi observado que freqüentemente os cromossomos estavam aglomerados na metáfase, formando uma massa compacta (KNOX-DAVIS, 1967 e BRUSHABER & JENKINS, 1971).

Os núcleos, em *Humicula* sp, apresentam corpos cromatínicos em forma de rosário, ou irregulares e não diferenciados em cromossomos (RODRIGUES, 1987).

Em *Marasmius* foi detectada uma curiosa configuração cromossomal, o material cromatínico torna-se orientado em duas ou, raramente, mais cadeias paralelas enfileiradas ao redor e ao longo do fuso. Esta configuração foi chamada de "estágio de trilho" ou de "duplo trilho" (BURNETT, 1976). Este estágio de trilho, não tem equivalente nas formas usuais da mitose e foi observado em outros fungos, como: *Aspergillus nidulans* (ROBINOW & CATEN, 1969), *Fusarium oxysporum* (AIST & WILSON, 1967a) e *Ceratocystis fagacearum* (AIST & WILSON, 1966).

HEATH (1980a) concluiu que a aquisição de um equilíbrio dos cromossomos na posição equatorial não é um pré-requisito para a subseqüente separação e movimento anafásico e que o comportamento dos cromossomos é controlado a nível de cromossomos individuais.

Anáfase - Telófase

FULLER (1976) define a anáfase como o estágio caracterizado pela separação e polarização do material genômico duplicado e, telófase inclui os eventos envolvidos na

posterior separação das cromátides polarizadas e a formação de núcleos filhos com seus envelopes nucleares.

WARD & CIURYSEK (1961), estudando um Basidiomiceto, observaram que oito cromátides originaram-se de quatro cromossomos metafásicos e que estes se separaram regularmente em dois grupos de quatro para pólos opostos do fuso. Em *Macrophomina phaseoli* foram observados regularmente pontes cromossômicas e cromossomos retardatários (KNOX-DAVIES, 1967). As pontes cromossômicas também foram observadas em *Poria manticola* por BRUSHABER & JENKINS (1971).

Segundo HEATH (1980a), dois tipos de movimentos ocorrem durante a anáfase e telófase: o encurtamento dos microtúbulos cinetocoros, movendo o cinetocoro ligado ao cromossomo e, em adição, o alongamento do fuso, aumentando a distância interpolar. O arranjo destes dois processos varia de organismo para organismo.

Em *Catenaria anguillulae* foram observados núcleos alongados na fase anafásica. ICHIDA & FULLER (1968) sugerem que os cromossomos são puxados ou empurrados pelo alongamento do núcleo e a separação dos pólos. Foi observado que as fibras contínuas do fuso se alongam quando os pólos tornam-se mais distantes um do outro e este alongamento poderia servir para separar os cromossomos irmãos. Após a separação a região interzonal é comprimida próximo aos núcleos irmãos.

Segundo FULLER (1976) o alongamento de túbulos interpolares durante a telófase ocorre em todos os fungos centriolares.

Em fungos onde foi observado o estágio de "duplo trilho", o alongamento do núcleo e do fuso parece quebrar as barras transversalmente na região equatorial e, posteriormente, as duas partes migram para extremidades opostas do fuso. A cromatina se acumula nas extremidades da barra dupla e se condensa para formar dois núcleos filhos.

2.2. Protoplastos de fungos basidiomicetos

As condições experimentais para produção e regeneração de protoplastos de diferentes grupos taxonômicos dos fungos são bem estabelecidas. Um extenso trabalho de revisão foi feito por PEBERDY & FERENZY (1985) sobre as propriedades dos protoplastos. No entanto, poucos estudos foram feitos sobre protoplastos em Basidiomicetos.

VRIES & WESSELS (1972a) mostraram que protoplastos podem ser liberados de micélio de *Schizophylum commune*, utilizando uma preparação enzimática extracelular de *Trichoderma viride* crescida em parede de hifa de *S. commune*, ou com α-Glucanase e Quitinase purificada de cultura filtrada (VRIES & WESSELS, 1972b). O método, no entanto, envolve preparação de enzima lítica. Tendo em

vista que a preparação da enzima é um processo demorado, numerosas enzimas comerciais estão disponíveis e têm sido utilizadas para isolar protoplastos de fungos filamentosos.

GOLD et alii (1983) demonstraram que a combinação de duas enzimas comerciais, Novozyme 234 e Celulase CP foi muito eficiente para *Phanerochaete chrysosporium*: obteve-se $3x10^8$ protoplastos por grama de peso úmido depois de 3 horas de incubação. Os autores observaram que estas enzimas utilizadas individualmente produzem aproximadamente 5 e 50% respectivamente do número obtido quando utilizadas juntas. Devido à complexidade e diversidade da parede celular das hifas, muitas vezes a combinação de enzimas líticas promove melhores resultados na liberação de protoplastos.

A enzima Novozyme 234 também foi utilizada por MUKHERJEE & SENGUPTA (1986) para produzir protoplastos de micélio de *Volvariella volvacea* com 18 horas de incubação. O período de incubação é uma consideração importante durante a liberação dos protoplastos, pois a incubação prolongada pode causar a degeneração dos protoplastos formados inicialmente ou, em alguns casos, regenerar hifas aberrantes (Gabriel, 1968, citado por PEBERDY & FERENZY, 1985).

YANAGI & TAKEBE (1984) desenvolveram um processo altamente eficiente para isolamento de protoplastos de micélio de várias espécies de Basidiomicetos, utilizando uma

combinação de Quitinase e Celulase Onozuka R10. Depois de 1 hora de incubação, 10^8 protoplastos/ml foram liberados de *Coprinus macrorhizus* e a suplementação da mistura com zymoliase 60.000 ou β-glucuronidase elevou esta produção. A mistura destas quatro enzimas foi utilizada com sucesso por MORINAGA et alii (1985) para outras duas espécies de *Caprinus, Coprinus cinereus* e *Coprinus pellucidus*, e por WAKABAYASHI et alii (1985) para *Pleutorus cornucopiae.*

YANAGI et alii (1985) utilizaram Celulase Onozuka R10, Quitinase e Zymoliase para *Coprinus macrorhizus* e constataram que o acréscimo de Novozyme 234 a esta solução também podia elevar significativamente a produção de protoplastos e, mesmo sozinha, grande número de protoplastos foram liberados, mas eram relativamente pequenos e havia uma grande proporção anucleada. Esta solução enzimática também foi eficaz para a obtenção de protoplastos de outras espécies de Basidiomicetos como *Flammulina velutipes, Ganoderma lucidum, Grifola frondosa, Lentinus edodes, Lyophyllum ulmarium, Pleurotus ostreatus, Pholiota nameko* e *Tremella fuciformes.*

TOYOMASU et alii (1986) demonstraram que a combinação de driselase com celulase e β- glucuronidase são eficientes para produzir protoplastos a partir de micélio de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus salmoneo stramineus.*

A produção e a estabilidade dos protoplastos

podem ser influenciadas pelo tipo e concentração do estabilizador osmótico e estes fatores variam de organismo para organismo.

Em *Schizophyllum commune* a densidade dos protoplastos isolados pode ser afetada por diferentes estabilizadores. Em Sorbitol, Manitol, NaCl e KCl, os protoplastos sedimentam por gravidade, mas em Sucrose os protoplastos permanecem em suspensão, indicando que eles tem uma densidade similar à da solução. Quando $MgSO_4$ foi utilizado como estabilizador, os protoplastos liberados eram altamente vacuolados (VRIES & WESSELS, 1972a). No entanto, $MgSO_4$ foi o estabilizador mais satisfatório para *Coprinus cinereus* e *Coprinus pellucidus* (MORINAGA et alii, 1985) e também para *Phanerochaete chrysosporium* (GOLD et alii, 1983).

Segundo DAVIS (1985), os sais inorgânicos em geral, são os estabilizadores mais apropriados para fungos filamentosos. Porém, muitos pesquisadores têm obtido melhores resultados utilizando açúcares como estabilizadores para muitos fungos Basidiomicetos.

Para *Coprinus macrorhizus* a produção de protoplastos foi mais elevada em Manitol, mas os protoplastos isolados usando Sucrose como estabilizador, mostraram uma maior freqüência de regeneração (YANAGI et alii, 1985 e KIGUCHI & YANAGI, 1985). Semelhante observação foi feita para *Pleurotus cornucopiae* (WAKABAYASHI et alii, 1985 e MAGAE et alii, 1986).

Enquanto protoplastos têm sido produzidos de vários fungos basidiomicetos, são raros os trabalhos sobre obtenção de protoplastos de fungos basidiomicetos ectomicorrízicos.

Um trabalho histórico que relata obtenção de protoplastos de um fungo basidiomiceto ectomicorrízico foi feito por GILES & WHITEHEAD (1976) em *Rhizopogon* sp com preparação enzimática obtida de *Trichoderma viride*. Estes autores introduziram células de *Azotobacter vinelandii* em protoplastos de *Rizopogon* sp e demonstraram a capacidade de redução de acetileno e a síntese de micorriza pelo micélio modificado.

Mais recentemente, KROPP & FORTIN (1985) relataram o sucesso da aplicação de algumas enzimas comerciais para obtenção de protoplastos de *Laccaria bicolor*. Foram testados Novozyme 234, Celulase TV e Quitinase, individualmente combinações entre elas. O melhor resultado foi obtido com Novozyme 234. A adição de Quitinase ou Celulase não produziu nenhum aumento quando comparado ao obtido com Novozyme sozinha. A produção foram grandemente influenciada pela natureza do estabilizador osmótico: 12-13 x 10^6 protoplastos/cm^3 de micélio foram produzidos com Manitol ou Sucrose, mas somente 7 a 12% desta produção foram obtidas com KCl, NaCl ou $MgSO_4$. HÉBRAUD & FÈVRE (1988) demonstraram que a mistura de celulase Onozuka R10 e Driselase em combinação com $MgSO_4$ como estabilizador é a mistura mais eficiente para

Hebeloma cylindrosporum, Hebeloma edurum, Hebeloma sinapizans e *Suilis bellini*, mas não para *Pisolithus tinctorius* Manitol e Sorbitol foram utilizados no meio para regeneração dos protoplastos e cerca de 25% dos protoplastos nucleados de *Hebeloma cylindrosporum* regeneraram.

Mutantes de *H. cylindrosporum* resistentes a fungicidas foram isolados por radiação dos protoplastos com luz ultravioleta. A mutação é uma ferramenta comum em genética, usada para modificar a expressão de genomas existentes e introduzir variabilidade genética.

Similarmente a KROPP & FORTIN (1985), protoplastos de *Hebeloma circinans, Hebeloma cylindrosporum, Laccaria bicolor, Laccaria laccata* (3 isolados), *Pisolithus tinctorius, Suillus luteus* e *Thelephora terrestris* foram obtidos com Novozyme 234 por BARRETT et alii (1989). O Manitol foi utilizado como estabilizador para todos estes basidiomicetos. A regeneração dos protoplastos só não foi obtida de *Pisolithus tinctorius* e *Suillus luteus*, pois os protoplastos destes dois fungos mostraram ausência de núcleos.

Além das enzimas e dos estabilizadores, a idade da cultura tem sido analisada na tentativa de elevar a produção de protoplastos. Em geral, a produção máxima de protoplastos é obtida de micélio na fase exponencial de crescimento.

Segundo KROPP & FORTIN (1985), a produção de

protoplastos de *L. bicolor* variou grandemente, dependendo das condições usadas para digestão. Concluíram que o fator mais importante é a idade da cultura sendo digerida. Numerosas pontas de hifas jovens, suceptíveis à digestão, foram produzidas depois de 4 dias de crescimento do inóculo homogeneizado. Com seis dias de crescimento, o nível de liberação de protoplastos diminuiu muito. Para *H. cylindrosporum* a mais alta produção foi obtida com micélio de 2 dias de crescimento (HÉBRAUD & FÈVRE, 1988).

Ainda dentro deste contexto, BARRETT et alii (1989) testaram a formação de protoplastos com micélio de 2, 4 e 10 dias de crescimento de sete fungos basidiomicetos ectomicorrízicos e também concluiram que o isolamento de protoplastos foi grandemente afetado pela idade da cultura.

2.3. Fatores que influenciam a infecção ectomicorrízica

Segundo RIFFLE & MARONEK (1982), a interação entre o fungo e o hospedeiro é influenciada por processos bioquímicos, fisiológicos e condições ambientais.

A alta fertilidade comumente utilizada na produção de mudas, restringe ou impede o desenvolvimento micorrízico. Muitos experimentos comprovam que a redução do nível de fertilidade melhora significantemente o desenvolvimento micorrízico (MOLINA & TRAPPE, 1982).

Pisolithus tinctorius parece especialmente sensível a alta fertilidade no substrato. MULLETTE (1976) estudou o desenvolvimento de micorriza sob 5 níveis de fósforo em *Eucalyptus gummifera* por *Pisolithus tinctorius* e observou que houve pelo menos 70% de formacão em níveis favoráveis desse elemento (1-5 ppm). Nenhuma micorriza foi desenvolvida em concentrações acima de 10 ppm e, na ausência de fósforo, o desenvolvimento foi relativamente moderado.

A temperatura também pode influenciar na infecção micorrízica. MARX (1969) obteve com *Pisolithus tinctorius* uma máxima síntese de micorriza em *Pinus taeda* a 34°C.

Alguns fatores também podem afetar a efetividade do inóculo e, com isso, comprometer a formação das micorrizas. A idade da cultura pode ser um destes fatores. O inóculo preparado com micélio de *P. tinctorius*, crescido em meio líquido, tem uma ativide máxima com três semanas de crescimento - que coincide com a concentração máxima de ATP (LAPEYRIE & BRUCHET, 1985). MARX et alii (1982) concluiram que o inóculo de *P. tinctorius* mais efetivo é aquele com abundante hifa do fungo protegida dentro das partículas de vermiculita, pH entre 4,5 e 6,0, mínima quantidade de contaminantes microbianos e baixa quantidade de Glicose residual.

2.3.1. Influência de metais pesados na infecção micorrízica

Já está bem estabelecido que a infecção micorrízica pode levar a um aumento da eficiência na absorção de nutrientes restritos e que isto pode levar ao melhoramento do crescimento de plantas micorrizadas. No entanto, pouca atenção tem sido data para o papel da micorriza em ambientes contendo níveis tóxicos de elementos minerais. Nestas circunstâncias o resultado poderia ser fisiologicamente prejudicial em vez de benéfico para o hospedeiro.

Sob condições ácidas e deposição de metais pesados, a infecção pelo fungo endomicorrízico *Glomus faciculatum* elevou grandemente a absorção de metais, reduzindo o crescimento de *Ehrharta calycina* (KILLHAM & FIRESTONE, 1983). Alguns metais pesados são muito tóxicos para os organismos, embora eles sejam essenciais para o crescimento normal dos mesmos como micronutrientes.

MELO et alii (1987) observaram que a taxa de infecção radicular com *Glomus leptotichum* em duas cultivares de *Leucaena leucocephala* diminuiu com o aumento do nível de Al disponível no substrato; por outro lado, o estabelecimento de micorriza na cultivar Al-intolerante proporcionou características de tolerância das plantas ao Al. GILDON & TINKER (1983) sugeriram que concentrações intracelulares de

metais pesados nas raízes podem limitar a expansão do micélio em micorriza vesicular arbuscular.

BRADLEY et alii (1981) estudaram a relação entre infecção micorrízica e resistência à toxicidade de metais em três plantas Ericaceae e observaram que plantas micorrizadas mostraram crescimento em todos os tratamentos com metais, enquanto que plantas não micorrizadas cresceram somente no nível mais baixo do metal. Foi proposto que as hifas complexas do endofito iricóide provê uma superfície de absorção dentro das células corticais das raízes do hospedeiro, facilitando exclusão de metais nos brotos e, assim, escapando da toxicidade - as plantas micorrizadas apresentaram uma concentração significantemente mais baixa de metais em seus brotos e mais altas nas raízes. Estes resultados confirmam suas observações anteriores em *Colluna vulgaris* inoculada com *Pezizella ericae* (BRADLEY et alii, 1981).

O mecanismo pelo qual ectomicorriza influencia absorção de metais pesados pelas mudas pode ser associado com proteção das raízes pelo manto do fungo ou modificações da rizosfera pelo fungo associado (DIXON & BUSCHENA, 1981). No entanto, metais pesados podem ser fungitóxicos e podem influenciar na formação de ectomicorriza. Segundo os autores, a adição de metais pesados no meio, decresceu significantemente a infecção ectomicorrízica por *Suillus luteus* em associação com *Pinus banksiana* e *Picea*

glauca. O mecanismo preciso de inibição ectomicorrízica não é conhecido.

Em *Pinus rigida*, a porcentagem de micorriza foi maior em raízes tratadas com 25 ppm de Al que em raízes tratadas com 0 ou 50 ppm, porque neste nível o efeito inibitório foi maior sobre crescimento de raízes do que sobre a infecção com *Pisolithus tinctorius*. Já para 50 ppm, o alumínio teve um alto efeito inibitório em ambos: crescimento e infecção (McQUATTIE & SCHIER, 1986).

VIEIRA (1984), estudando a interação entre alumínio e infecção micorrízica em *Eucalyptus grandis* encontrou um isolado de *P. tinctorius* tolerante a elevados teores de alumínio, capaz de formar micorriza em substratos com 300 μg Al^{3+}/ml. Nesta concentração as plantas apresentam um decréscimo de 25% no peso da matéria seca em relação a mudas não inoculadas. O autor propõe que, em determinadas condições, o fungo induz um efeito parasítico.

A comparação entre os fungos deve ser feita com cautela visto que a tolerância a metais pesados pode variar com o fungo simbionte.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolados utilizados

Foram utilizados os seguintes isolados de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch:

Isolado	Local de coleta	Hospedeiro
1. Pt 185	Estados Unidos	*Pinus* sp
2. Pt *taeda*	França	*Pinus* sp
3. FEP 2	Amapá (reisolado do 185)	*Pinus* sp.
4. FEP 3	Piracicaba (reisolado do 185)	*Pinus* sp.
5. FEP 5	Lavras (reisolado do 185)	*Pinus* sp.
6. ITA 6	Itamarandiba-MG	*Eucalyptus* sp.
7. ITA 11	Itamarandiba-MG	*Eucalyptus pilularis*
8. AC1	Timóteo-MG	*Eucalyptus citriodora*
9. AC3	Timóteo-MG	*Eucalyptus torelliana*

Continua

Isolado	Local de coleta	Hospedeiro
10. AC6	Timóteo-MG	*Eucalyptus torelliana*
11. AC8	Timóteo-MG	*Eucalyptus paniculata*
12. AC12	Timóteo-MG	*Eucalyptus paniculata*
13. PI 0203	Parque Itajaí	*Eucalyptus* sp
14. PI 0312	Parque Itajaí	*Eucalyptus* sp
15. PI 0314	Parque Itajaí	*Eucalyptus* sp
16. PI 0316	Parque Itajaí	*Eucalyptus* sp
17. AT 0501	Atibaia-SP	*Eucalyptus* sp
18. AT 0502	Atibaia-SP	*Eucalyptus* sp
19. AT 0503	Atibaia-SP	*Eucalyptus* sp
20. AT 0504	Atibaia-SP	*Eucalyptus* sp
21. AT 0505	Atibaia-SP	*Eucalyptus* sp
22. AT 0506	Atibaia-SP	*Eucalyptus* sp
23. AT 0507	Atibaia-SP	*Eucalyptus* sp
24. AT 0508	Atibaia-SP	*Eucalyptus* sp
25. AT 0509	Atibaia-SP	*Eucalyptus* sp
26. AT 0510	Atibaia-SP	*Eucalyptus* sp

Os isolados de 1 a 16 foram gentilmente cedidos pelo Dr. Krügner, T.L. (ESALQ/USP) e pelo Dr. Lin, M.T. (Bioplanta Tecnologia de Plantas Ltda.), os demais foram isolados no presente trabalho.

3.2. Manutenção dos isolados

Os isolados foram mantidos em laboratório através de repiques periódicos em meio Melin Norkrans modi-

ficado. O inóculo foi cultivado por vinte (20) dias a 26-28°C e, posteriormente, estocado sob refrigeração, até um período máximo de um mês.

3.3. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e as soluções utilizadas foram esterilizadas em autoclave por vinte (20) minutos sob pressão de uma atmosfera.

Os substratos utilizados para produção de inoculante foram esterilizados em autoclave por quarenta (40) minutos a uma atmosfera de pressão.

A temperatura de incubação foi de 26-28°C.

3.4. Meio de cultura utilizados

3.4.1. Meio MNM (Melin Norkrans - modificado), de acordo com MARX, 1969

Extrato de malte	3,0	g
Glicose	10,0	g
$(NH_4)_2HPO_4$	0,25	g
KH_2PO_4	0,50	g
$MgSO_4.7H_2O$	0,15	g
$CaCl_2$	0,05	g
$FeCl_3$ a 1%	1,2	ml
NaCl	0,025	g
Tiamina-HCl	100	µg
Ágar	18,0	g

Água destilada até completar .... 1000 ml

O pH do meio foi ajustado a 5,5 com solução de ácido clorídrico 1N.

3.4.2. Meio BDA

Decocto de 200g de batata

Dextrose ..... 20 g

Ágar ..... 18 g

Água destilada até completar .. 1000 ml

O pH do meio foi ajustado a 5,5 com solução de ácido clorídrico 1N.

3.4.3. Meio BDA-D

Decocto de 200g de batata

Dextrose ..... 10 g

Ágar ..... 18 g

Água destilada até completar .. 1000 ml

O pH do meio foi ajustado a 5,5 com solução de ácido clorídrico 1N.

3.4.4. Meio BDMT

Decocto de 200g de batata

Dextrose	10 g
Extrato de malte	3 g
Tiamina	100 µg
Ágar	18 g
Água destilada até completar .	1000 ml

O pH do meio foi ajustado a 5,5 com solução de ácido clorídrico 1N.

3.4.5. Meio MNMB

Preparado segundo o item 3.4.1, sendo adicionado decocto de 200g de batata.

3.4.6. Meio MNM líquido (Melin Norkrans modificado) MARX, 1969

Preparado segundo o item 3.4.1 sem a adição de ágar.

3.4.7. Meio BDA líquido

Preparado segundo o item 3.4.2 sem a adição de ágar.

3.4.8. Meio BDA-D líquido

Preparado segundo o item 3.4.3 sem a adição de ágar.

3.4.9. Meio BDMT líquido

Preparado segundo o item 3.4.4 sem a adição de ágar.

3.4.10. Meio MNMB líquido

Preparado segundo o item 3.4.5 sem a adição de ágar.

3.4.11. Meio MNM+M semi sólido para regeneração de protoplastos

Ao meio MNM líquido, preparado segundo o item 3.4.6 foi adicionado manitol-0,6M; ácido maleico - 0,05M; ágar - 0,7%. O pH do meio foi ajustado a 5,5 com solução de Hidróxido de sódio 5N.

3.4.12. Meio MNM+M líquido para regeneração de protoplastos

Preparado segundo o item 3.4.11 sem a adição de ágar.

3.5. Soluções utilizadas

3.5.1. Solução de $FeCl_3$ 1%

1g de $FeCl_3$ em 100 ml de água destilada. Conservou-se em frasco escuro à temperatura ambiente.

3.5.2. Solução de Albumina 50%

A albumina foi obtida a partir da clara de um ovo picotada e filtrada em papel de filtro por gravidade sob refrigeração durante uma noite.

Preparou-se uma solução com uma parte de albumina para uma parte de glicerina. Conservou-se em frasco escuro a 4°C no refrigerador.

3.5.3. Solução de Giemsa

Giemsa	1,0 g
GLicerina	66,0 ml
Metanol	66,0 ml

A solução foi preparada pela dissolução de Giemsa em glicerina a 60°C e, após resfriamento à temperatura ambiente, foi adicionado metanol. Esta solução foi mantida à temperatura ambiente.

3.5.4. Tampão fosfato 0,07M pH 7,0

Solução A:

$NaH_2PO_4.H_2O$ ..... 9,66 g

Água destilada ..... 1000 ml

Solução B:

$Na_2HPO_4.12H_2O$ ..... 25,06 g

Água destilada ..... 1000 ml

Misturou-se 51,0 ml da solução A e 49,0 ml da solução B. A esta mistura foram adicionados 900 ml de água destilada. A mistura foi preparada no momento do uso e, o restante das duas soluções foi mantida sob refrigeração a 4°C.

3.5.5. Tampão fosfato 0,02M pH 5,8

Solução A:

$NaH_2PO_4.H_2O$ ..... 2,76 g

Água destilada ..... 1000 ml

Solução B:

$Na_2HPO_4.12H_2O$ ..... 7,16 g

Água destilada ..... 1000 ml

Misturou-se 920,0 ml da solução A e 80 ml da solução B. As soluções A e B foram conservadas no refrigerador e o tampão fosfato foi preparado no momento do uso.

3.5.6. Solução estoque de acrilamida

Acrilamida	75 g
Bis acrilamida	2 g
Água desmineralizada	250 ml

A solução foi filtrada e conservada a 4°C.

3.5.7. Tampão do gel separador

Tris base - 45,75 g. A solução foi titulada para pH 8,9 e seu volume completado com água destilada para 100 ml, sendo a seguir filtrada e armazenada à temperatura ambiente.

3.5.8. Tampão do gel empilhador

Tris base - 7,475 g. A solução foi titulada para pH 6,8 com HCl puro e seu volume completado com água destilada para 100 ml.

3.5.9. Tampão do tanque

Tris base	63,2 g
Glicina	39,9 g

O volume foi completado para 1000 ml com água destilada e a solução foi filtrada e armazenada à temperatura ambiente.

No momento do uso, o tampão foi diluído: 100 ml de tampão completado para o volume de 1000 ml com água destilada.

3.5.10. Tampão da amostra

Glicerol	5 ml
Tampão do gel empilhador	2,5 ml
Azul de bromofenol	traços

O volume foi completado para 25 ml com água destilada e armazenado a -10°C.

3.5.11. Gel separador a 10%

Tampão do gel separador (item 3.5.7.)	1,5 ml
Acrilamida (item 3.5.6.)	5,0 ml
Água desmineralizada	8,4 ml
Persulfato de amônio a 10% (item 3.5.13.)	0,112 ml
TEMED	0,005 ml

3.5.12. Gel empilhador a 4%

Tampão do gel empilhador (item 3.5.8.)	0,75 ml
Acrilamida (item 3.5.6.)	1,0 ml
Água desmineralizada	5,7 ml
Persulfato de amônio a 10% (item 3.5.13.)	0,056 ml
TEMED	0,0075ml

3.5.13. Solução de persulfato de amônia (AP)

Solução aquosa a 10% de AP

3.5.14. Solução Tris-HCl 0,5M

Tris-HCl - 78,8 g. A solução foi titulada para pH 7,1 e seu volume completado para 1000 ml com água destilada, sendo a seguir armazenada a 4°C.

3.5.15. Solução α,β-naftil acetato 1%

α-naftil acetato	1 g
β-naftil acetato	1 g
Acetona	50 ml
Água	50 ml

3.5.16. Solução para revelação de esterases

Fast blue RR	50 mg
Tris-HCl 0,5M pH 7,1 (item 3.5.14)	5 ml
α,β-naftil acetato 1% (item 3.5.15)	1,5 ml
Água destilada	43,5 ml

3.5.17. Solução de NaOH 5N

NaOH, 200g em 1000ml de água destilada.

3.5.18. Solução manitol 0,6M

Para o preparo desta solução 21,86 g de manitol foram dissolvidos com agitação e aquecimento em água destilada, sendo a seguir adicionados 1,16 g de ácido maleico e 1,47 g de $CaCl_2.2H_2O$. Levou-se ao potenciômetro e adicionou-se solução de NaOH 5N até atingir-se pH 5,5. O volume final foi ajustado para 200 ml com água destilada.

3.5.19. Solução de enzima para produção de protoplastos

Para cada 1,0 ml de solução manitol 0,6M foram adicionados 5,0 mg de Novozyme 234.

3.5.20. Solução de complexo lítico I para produção de protoplastos

Para cada 1,0 ml de solução manitol 0,6M foram adicionados 10 mg de celulase Onozuka R10, 10 mg de driselase, 2,5 mg de zimoliase e 1 mg de quitinase.

3.5.21. Solução de complexo lítico II para produção de protoplastos

Para cada 1,0 ml de solução manitol 0,6 M

foram adicionados 10 mg de celulase Onozuka R10, 10 mg de driselase e 5 μl de β-glucuronidase.

3.5.22. Solução estoque 1 da solução nutritiva

$Mg(NO_3)_2.6H_2O$	142,4 g
Água destilada até completar ..	1000 ml

3.5.23. Solução estoque 2 da solução nutritiva

KH_2PO_4	17,6 g
Água destilada até completar ...	1000 ml

3.5.24. Solução estoque 3 da solução nutritiva

$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	270,0 g
NH_4NO_3	33,8 g
Água destilada até completar ...	1000 ml

3.5.25. Solução estoque 4 da solução nutritiva

$FeSO_4.7H_2O$	24,9 g
Na_2 EDTA	29,6 g
Água destilada até completar ..	1000 ml

3.5.26. Solução estoque 5 da solução nutritiva

KCl	18,6 g
KNO_3	24,6 g
K_2SO_4	44,0 g
Água destilada até completar ..	1000 ml

3.5.27. Solução estoque 6 da solução nutritiva

$MnCl_2.4H_2O$	2,34 g
H_3BO_3	2,04 g
$CuSO_4$	0,20 g
$ZnSO_4$	0,88 g
$NaMoO_4.2H_2O$	0,26 g
Água destilada até completar ..	1000 ml

3.5.28. Solução nutritiva (FURLANI & HANNA, 1984)

Solução estoque 1	0,28 ml
Solução estoque 2	0,05 ml
Solução estoque 3	0,66 ml
Solução estoque 4	0,33 ml
Solução estoque 5	0,46 ml
Solução estoque 6	0,33 ml
Água destilada	1000 ml

O pH da solução foi ajustado a 4,0 com solução de ácido clorídrico 5N.

3.5.29. Solução nutritiva 5 ppm de alumínio

Preparado segundo o item 3.5.28, adicionando-se 1,64 ml da solução estoque de alumínio 3000 ppm. O pH foi ajustado a 4,0 com solução de ácido clorídrico 5N.

3.5.30. Solução nutritiva 10 ppm de alumínio

Preparado segundo o item 3.5.28, adicionando-se 3,32 ml da solução estoque de alumínio 3000 ppm. O pH foi ajustado a 4,0 com solução de ácido clorídrico 5N.

3.5.31. Solução nutritiva 15 ppm de alumínio

Preparado segundo o item 3.5.28, adicionando-se 5,0 ml da solução estoque de alumínio 3000 ppm. O pH foi ajustado a 4,0 com solução de ácido clorídrico 5N.

3.5.32. Solução nutritiva 20 ppm de alumínio

Preparado segundo o item 3.5.28, adicionando-se 6,64 ml da solução estoque de alumínio. O pH foi ajustado a 4,0 com solução de ácido clorídrico 5N.

3.5.33. Solução estoque de alumínio 3000 ppm

$AlK(SO_4)_2.12H_2O$, 52,77 g. Completar com água destilada para o volume de 1000 ml.

3.5.34. Solução nutritiva para fertilização de plantas de *Eucalyptus* de acordo com RUEHLE & WELLS (1984)

NH_4NO_3	250 mg
Na_2HPO_4	60 mg
KCl	40 mg
$CaCl_2$	40 mg
$MgSO_4.7H_2O$	20 mg
$FeCl_3.6H_2O$	5,5 mg
$NaMoO_4.7H_2O$	0,01 mg
$CuSO_4.5H_2O$	0,006mg
H_3BO_3	0,09 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	0,1 mg
$MnCl_2.4H_2O$	0,7 mg
Água destilada até completar ..	1000 ml

3.5.35. Solução de KOH 10%

KOH, 100g. Completar o volume para 1000 ml com água destilada.

3.5.36. Solução de HCl 1%

HCl, 10 ml. Completar o volume para 1000 ml com água destilada.

3.5.37. Solução descorante

Glicerina, água destilada e ácido láctico (1:1:1).

3.5.38. Solução corante Trypan-blue

Trypan-blue - 0,5 g para 1000 ml de solução descorante (item 3.5.27).

3.6. Substratos utilizados

3.6.1. Substrato Turfa-Vermiculita - Meio MNN para produção de inoculante

O substrato foi preparado com uma mistura de Turfa-vermiculita - meio MNM líquido na proporção de 1:28:14 e distribuído em frascos de 300 ml.

3.6.2. Substrato Turfa-vermiculita - Meio BDA para produção de inoculante

O substrato foi preparado com uma mistura de turfa-vermiculita - meio BDA líquido na proporção de 1:28:14 e distribuído em frascos de 300 ml.

3.6.3. Substrato Turfa-vermiculita - Meio BDA-D para produção de inoculante

O substrato foi preparado com uma mistura de turfa-vermiculita - meio BDA-D líquido na proporção de 1:28: 14 e ditribuído em frascos de 300 ml.

3.6.4. Substrato Turfa-vermiculita - Meio BDMT para produção de inoculante

O substrato foi preparado com uma mistura de turfa-vermiculita - meio BDMT líquido na proporção de 1:28: 14 e distribuído em frascos de 300 ml.

3.6.5. Substrato Turfa-vermiculita - Meio MNMB para produção de inoculante

O substrato foi preparado com uma mistura de turfa-vermiculita - meio MNMB líquido na proporção de 1:28: 14 e distribuído em frascos de 300 ml.

3.6.6. Substrato Turfa-vermiculita para produção de mudas

O substrato foi preparado com uma mistura de turfa-vermiculita na proporção de 1:1.

3.7. Sementes utilizadas

Foram utilizadas sementes de *Eucalyptus urophylla, Eucalyptus torelliana* e *Eucalyptus paniculata* provenientes da Acesita energética, pomar de Itamarandiba, MG.

3.8. Caracterização do crescimento dos isolados de *Pisolithus tinctorius* em diferentes meios de cultura

Foram retirados discos de 4 mm de diâmetro das bordas das colônias crescidas em meio MNM por 15 dias a 26°C. A seguir, estes discos foram transferidos para placas de Petri com 9 centímetros de diâmetro, contendo separadamente, 20 ml de meio MNM, meio BDA, meio BDA-D, meio BDMT e meio MNMB. As placas foram incubadas a 26°C por 30 dias. O diâmetro das colônias foram medidos em intervalos de 48 horas a partir do décimo dia.

Os tratamentos foram distribuídos segundo o

delineamento estatístico em blocos ao acaso com quatro repetições, seguindo o esquema de parcelas sub-subdivididas onde os isolados constituíram os tratamentos primários, os meios os tratamentos secundários e os diâmetros os tratamentos terciários.

O quadro abaixo apresenta a análise de variância proposta, bem como as causas de variação e respectivos valores de F. Realizou-se comparações entre médias de isolados, de meios e diâmetros aplicando-se teste de Tukey através da seguintes fórmula: $\Delta = q \frac{s}{\sqrt{r}}$, onde: q = valor da amplitude total estudentizada a nível de 5% ou 1% de probabilidade; r = número de repetições, s = estimativa do desvio padrão residual.

Causas de Variação	GL	QM	Valor F
Blocos (B)	R-1	QMB	QMB/QMR(a)
Isolados (I)	I-1	QMI	QMI/QMR(a)
Resíduo (a)	(I-1)(R-1)	QMR(a)	
Parcelas	(IR-1)		
Meios (M)	M-1	QMM	QMM/QMR(b)
Isolados x meios (IxM)	(I-1)(M-1)	QMIxM	QMIxM/QMR(b)
Resíduo (b)	I(M-1)(R-1)	QMR(b)	
Subparcelas	IMR-1		
Diâmetros (D)	D-1	QMD	QMD/QMR(c)
Isolados x diâmetros IxD	(I-1)(D-1)	QMIxD	QMIxD/QMR(c)
Meios x diâmetros MxD	(M-1)(D-1)	QMMxD	QMMxD/QMR(c)
Isolados x meios x diâmetros IxMxD	(I-1)(M-1)(D-1)	QMIxMxD	QMIxMxD/QMR(c)
Resíduo		QMR(c)	

3.9. Produção de biomassa dos isolados de *Pisolithus tinctorius* em diferentes meios de cultura

Foram retirados discos de 4 mm das bordas das colônias crescidas em meio MNM por 20 dias a 26°C. Em seguida, estes discos foram transferidos para frascos de 150 ml contendo separadamente, 25 ml de meio MNM, meio BDA, meio BDA-D, meio BDMT e meio MNMB líquido.

Os discos foram colocados cuidadosamente nos meios, visto que os isolados apresentam o crescimento inibido quando submersos.

Os frascos foram incubados a 26°C por 30 dias. O micélio obtido ao fim deste período foi filtrado em filtro Blüchner com auxílio de bomba de vácuo e lavado duas vezes com água destilada. O disco de meio de cultura que acompanhou o inóculo foi retirado e, a seguir, o micélio foi pesado e colocado em estufa a 60°C por 72 horas para medida de peso seco.

Os tratamentos foram distribuídos segundo o delineamento estatístico inteiramente casualizado com quatro repetições, seguindo o esquema fatorial 13x5 cujos fatores foram: isolados e meios.

O quadro abaixo apresenta a análise de variância proposta com as causas de variação e respectivos valores de F.

Realizaram-se comparações entre médias de

meios e isolados aplicando-se teste de Tukey através da seguintes fórmula: $\Delta = q \frac{s}{\sqrt{r}}$, onde, q = valor da amplitude total estudentizada a nível de 5% ou 1% de probabilidade, r = número de repetições e s = estimativa do desvio padrão residual.

Causa de Variação	GL	QM	Valor F
Tratamentos (T)	T-1	QMT	
Isolado (I)	I-1	QMI	QMI/QMR
Meio (M)	M-1	QMM	QMM/QMR
IsoladoxMeio IxM	(I-1)(M-1)	QMIxM	QMIxM/QMR
Resíduo (R)	T(R-1)	QMR	

3.10. Técnica para coloração de núcleos

(TANAKA et alii, 1979)

Foram realizadas observações citológicas do isolado TAEDA de *Pisolithus tinctorius*.

O micélio previamente crescido em meio MNM a 26°C foi aderido sobre a lamínula em presença de albumina 50%. Para a fixação foi utilizada solução de álcool etílico-ácido acético 3:1 durante 30 minutos à temperatura ambiente. A hidratação foi efetuada por tratamento sucessivo em álcool 95,0% por dez minutos e álcool 70% por trinta minutos, pro-

cedendo-se, a seguir, à hidrólise em ácido clorídrico 1N em banho-maria a 60°C por 8 minutos. O material foi corado por imersão em solução de Giemsa diluída de 1 para 5 com tampão fosfato pH 7,0 durante 30 minutos. O excesso de corante foi retirado por lavagem com o mesmo tampão. As lamínulas foram fixadas em lâminas com o uso de parafina e observadas ao microscópio.

3.10.1. Determinação do número de núcleos por célula somática micelial

O micélio proveniente de crescimento em meio MNM por 15 dias a 26°C foi preparado segundo o item 3.10. Estes foram observados em microscópio Olympus, modeo BHS, associado ao sistema fotomicrográfico Olympus modelo PM-10AD.

3.10.2. Medida do tamanho de núcleos

O micélio proveniente de crescimento em meio MNM por 25 dias a 26°C foi preparado segundo o item 3.10. Fez-se a medida de 596 núcleos escolhidos aleatoriamente, utilizando-se ocular micrométrica adaptável ao microscópio ótico.

3.10.3. Observações da divisão nuclear em células somáticas do micélio

O micélio proveniente de crescimento em meio MNM por 15 dias a 26°C foi preparado segundo o item 3.10. Estes foram observados em microscópio Olympus, modelo BHS, associado ao sistema fotomicrográfico Olympus modelo PM-10AD.

3.11. Caracterização eletroforética (PACCOLA-MEIRELLES et alii, 1988)

3.11.1. Preparação das amostras

Foram retirados dos isolados a serem determinados eletroforeticamente, discos de 5 mm das bordas das colônias crescidas em meio MNM por 15 dias a 26°C. Estes discos foram transferidos para frascos de 150 ml, contendo 25 ml de meio MNM líquido e incubados a 26°C por 12 dias. O micélio obtido neste período foi filtrado em filtro Blüchner com auxílio de bomba de vácuo e lavado com água destilada. Em seguida, o micélio foi secado em papel de filtro e triturado com nitrogênio líquido. Para cada 500 mg de micélio foi adicionado 1 ml de tampão do gel empilhador pH 6,8 (item 3.5.8). Este material foi deixado em banho de gelo durante uma noite e ao final deste período foi centrifugado durante

vinte minutos a 13.000 RPM em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi coletado e esta amostra foi mantida em "freezer".

3.11.2. Placa de gel de acrilamida

O gel separador preparado segundo o item 3.5.11. foi vertido em placa de 15 cm x 16 cm x 0,1 cm com uma seringa de vidro até a altura de 1 cm abaixo do pente. Depois de polimerizada foi preparado o gel empilhador segundo o item 3.5.12 e vertido na mesma placa até a borda. O pente foi colocado e retirado depois da polimerização do gel.

3.11.3. Aplicação das amostras e corrida da eletroforese

No momento da aplicação foi retirado 50 μl da amostra (item 3.11.1) e colocado em tubo ependorf junto com 50 μl do tampão da amostra (item 3.5.10). Com o auxílio de micropipeta, colocou-se 50 μl desta mistura na canaleta do gel. A placa foi colocada em cuba de eletroforese vertical. O tampão do eletrodo utilizado foi o tampão do tanque preparado segundo o item 3.5.9.

A corrida foi feita sob refrigeração a 120V até a amostra chegar no gel separador e depois colocado a 200V até o final da corrida.

3.11.4. Revelação das esterases

Após a corrida, o gel foi cuidadosamente retirado da placa e colocado em cuba de plástico com a solução reveladora (item 3.5.16).

3.12. Obtenção de protoplastos

Foram realizados estudos de protoplastização com o isolado FEP3 de *Pisolithus tinctorius*.

Discos de cultura de 4 mm de diâmetro foram retirados das bordas das colônias crescidas em meio MNM e colocados cuidadosamente em frascos de 150 ml com 25 ml de meio MNM líquido. Os frascos foram incubados a 26°C por 10 dias. O disco de meio de cultura que acompanhou o inóculo foi retirado e o micélio crescido foi cortado com bisturi em pequenos fragmentos e colocados em frascos de 150 ml com 50 ml de meio MNM líquido, sendo em seguida incubados em agitador orbital (120 RPM) a 26°C por 7 dias. O micélio obtido foi coletado e triturado em liquidificador esterilizado com 150 ml de meio MNM líquido, por 30 segundos em velocidade mínima. 50 ml deste homogeinizado foi colocado em frascos de 150 ml e incubado a 26°C em agitador orbital a 120 RPM por 7 dias. Esta operação foi repetida reduzindo-se o tempo de incubação para 4 dias. Ao fim deste período o

micélio foi filtrado em filtro de Blüchner com auxílio de bomba de vácuo e lavado com solução manitol 0,6 M. A seguir, o micélio foi pesado e colocado em presença de solução lítica (preparada segundo o item 3.5.19) na proporção de 50 mg de micélio: 1 ml de solução lítica.

Incubou-se novamente em agitador orbital a 100 rpm para que ocorresse a digestão lítica. Foram retiradas amostras em intervalos de 60 minutos num período de 4 horas para verificar-se a presença de protoplastos.

3.12.1. Avaliação da idade do micélio na liberação de protoplastos

O micélio proveniente de crescimento em meio MNM por 15 dias a 26°C foi preparado segundo o item 3.12, sendo que o tempo de incubação do micélio na última operação foi de 3, 4 e 5 dias.

3.12.2. Comparação de diferentes enzimas na liberação de protoplastos

O micélio proveniente de crescimento em meio MNM por 15 dias a 26°C foi preparado segundo o item 3.12, sendo testadas mais duas soluções líticas preparadas segundo os ítens 3.5.20 e 3.5.21.

3.12.3. Determinação do número de protoplastos

A contagem do número de protoplastos foi feita em intervalos de 60 minutos em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico até completar quatro horas de digestão lítica.

3.12.4. Medida do tamanho dos protoplastos

Foi feita a medida de 100 protoplastos produzidos de micélio de 4 e 5 dias de idade com 3 e 5 horas de digestão lítica. Utilizou-se ocular micrométrica adaptável ao microscópio ótico.

3.12.5. Regeneração de protoplastos

Após o período de incubação em agitador orbital com enzima lítica, os protoplastos foram separados dos fragmentos maiores de hifas por filtração em algodão colocado no fim de uma seringa de vidro de 10 ml. O algodão foi lavado com 3 ml de solução manitol 0,6M e os protoplastos foram peletizados por centrifugação por 15 minutos a 400 rpm (centrífuga Excelsa Baby). O sobrenadante foi eliminado e o "pellet" foi lavado duas vezes com solução manitol 0,6M por centrifugação a 400 rpm (centrífuga Excelsa Baby) por 5 minutos. O "pellet" final foi ressuspenso em 1 ml de

solução manitol 0,6M e o número de protoplastos contados em câmara de Neubauer foram semeados pela técnica "pourplate" em meio MNM+M semi-sólido (37-40°C) e incubados a 26°C. Em meio MNM+M líquido foram incubados em agitador orbital (100 rpm) a 26°C.

3.12.6. Coloração de núcleos dos protoplastos (BORGES, 1987)

Para a coloração de núcleos utilizou-se a suspensão de protoplastos obtida após a filtração em algodão do item 3.12.6.

Algumas gotas desta suspensão foram espalhadas em lâminas limpas, as quais foram mantidas à temperatura ambiente por 15 minutos. A fixação foi feita em metanol absoluto por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram parcialmente secas e imersas em solução de HCl 1N por 2 minutos a 56°C, sendo, a seguir, lavadas em água corrente e água destilada. A coloração foi feita em solução corante Giemsa-tampão fosfato 0,02M pH 5,8 (1:5) por 2 minutos.

Lavou-se em água corrente e depois das lâminas estarem secas fez-se a montagem com lamínulas.

3.13. Síntese de ectomicorriza em *Eucalyptus* com isolados de *Pisolithus tinctorius* em diferentes níveis de alumínnio em casa de vegetação

3.13.1. Produção de inoculante

O método de produção de inoculante consistiu da transferência de 8 discos de 0,5 cm de diâmetro retirados das bordas das colônias crescidas em meio MNM, para frascos de 300 ml contendo 200 ml de substrato turfa-vermiculita-meio MNM (preparado segundo o item 3.6.1). Os frascos foram incubados a 26°C por 3 meses.

3.13.2. Inoculação do substrato

A inoculação foi feita através de uma mistura manual do inoculante ao substrato turfa-vermiculita (preparado segundo o item 3.6.6) na concentração de 10%.

O inoculante dos isolados ectomicorrízicos, antes de sua utilização, foi transferido para um tecido poroso e submetido a uma lavagem em água corrente por 2 minutos e, em seguida colocado em bandeja plástica para secagem à temperatura ambiente, até eliminação do excesso de umidade.

3.13.3. Recipiente

O substrato turfa-vermiculita inoculado foi distribuído em tubetes do tipo "dibbing tube", fabricado em polietileno de alta densidade, de formato cônico, na cor preta, com estrias internas para direcionamento das raízes, dispostas em bandejas de isopor.

3.13.4. Semeadura

Foram colocadas 3 a 5 sementes de *Eucalyptus urophylla* por tubete a 1 cm de profundidade.

3.13.5. Local da instalação do experimento

O experimento foi instalado em casa de vegetação da Bioplanta Tecnologia de Plantas S.A. situata em Paulínia-SP.

3.13.6. Delineamento estatístico

Os tratamentos foram distribuídos segundo o delineamento estatístico inteiramente casualizado com 16 repetições, seguindo o esquema fatorial 4x5 cujos fatores foram: isolados e concentrações de alumínio no substrato.

O quadro a seguir representa a análise de

variância proposta, com as causas de variação e respectivos valores de F.

Causa de variação	GL	QM	F
Tratamentos (T)	T-1	QMT	
Isolados (I)	I-1	QMI	QMI/QMR
Concentração Al (A)	A-1	QMA	QMA/QMR
Isol. x Conc. Al	(I-1)(A-1)	QMIxA	QMIxA/QMR
Resíduo (R)	T(R-1)	QMR	

3.13.7. Desbaste

Aos 20 dias da inoculação foi feito um desbaste seletivo, eliminando as plantas menores ou mal localizadas, deixando-se somente uma por recipiente.

3.13.8. Adubação e aplicação do alumínio no substrato

A adubação e o alumínio foram adicionados ao substrato através da aplicação de solução nutriente contendo diferentes concentrações de alumínio, preparada segundo os ítens 3.5.28, 3.5.29, 3.5.30, 3.5.31 e 3.5.32, diariamente, quantas vezes fosse necessário, até a drenagem.

3.13.9. Avaliação visual de colonização

Aos 90 dias da inoculação foi feita uma avaliação visual em escalas de notas de 0 a 5 do grau de colonização das raízes.

3.13.10. Coloração de raízes para avaliação de colonização

Foram retiradas pequenas amostras das raízes lavadas de 8 plantas escolhidas ao acaso. As raízes foram colocadas em KOH 10% em banho-maria a 90°C por 1 hora, sendo em seguida lavadas três vezes em água destilada e colocadas em HCl 1% por 5 minutos. A coloração foi feita com o corante Trypan blue preparado segundo o item 3.5.38 em banho-maria a 90°C por 10 minutos. As raízes coloridas foram transferidas para placas de Petri contendo solução descorante (preparado segundo item 3.5.37). A avaliação foi feita em Lupa em escalas de notas de 0 a 10.

3.13.11. Análise química do substrato

Foi feita uma análise química do substrato turfa-vermiculita (item 3.6.6) antes da inoculação. No final do experimento, amostras do mesmo substrato foram retiradas dos tubetes e analisadas separadamente para a dosagem da concentração de alumínio. As análises foram feitas no de-

partamento de nutrição de plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

3.14. Coleta e isolamento de *Pisolithus tinctorius*

A coleta de corpos de frutificação de *Pisolithus tinctorius* foi feita na região de Atibaia-SP. Os basidiocarpos jovens foram transportados para o laboratório em sacos de papel e submetidos a uma lavagem em água corrente. A seguir foram lavados três vezes em álcool 70% para uma esterilização superficial. Após secagem em toalha de papel esterilizada, os basidiocarpos foram cortados ao meio com um bisturi estéril e, da parte interna, retiraram-se pequenas partes do tecido, de 1 a 2 mm^3. Estes foram colocados em placas contendo meio MNM e incubados a 26°C.

3.15. Seleção de isolados de *Pisolithus tinctorius* para três espécies de *Eucalyptus* quanto à eficiência para formação de micorrizas

3.15.1. Produção de inoculante

A produção de inoculante consistiu da transferência de 8 discos de 0,5 cm de diâmetro retirados das bordas das colônias crescidas em meio MNM, para frascos de 300 ml contendo 200 ml de substrato turfa-vermiculita-meio

MNM (preparado segundo o item 3.6.1). Os frascos foram incubados a 26°C por 3 meses.

3.15.2. Inoculação do substrato

A inoculação foi feita através de uma mistura manual do inoculante ao substrato turfa-vermiculita (preparado segundo o item 3.6.6) na concentração de 10%.

O inoculante dos isolados ectomicorrízicos, antes de sua utilização, foi transferido para um tecido poroso e submetido a uma lavagem em água corrente por 2 minutos e, em seguida colocada em bandeja plástica à temperatura ambiente para secagem, até eliminação do excesso de umidade.

3.15.3. Recipiente

O substrato inoculado foi distribuído em tubetes do tipo "dibbing tube", fabricado em polietileno de alta densidade, de formato cônico, na cor preta, com estrias internas para direcionamento das raízes, dispostos em bandejas de isopor.

3.15.4. Semeadura

Foram colocadas de 3 a 5 sementes de *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus torelliana* e *Eucalyptus paniculata* nos tubetes a 1 cm de profundidade.

3.15.5. Local de instalação do experimento

O experimento foi instalado em casa de vegetação da Bioplanta Tecnologia de Plantas S.A., situada em Paulínia-SP.

3.15.6. Delineamento estatístico

Os tratamentos foram distribuídos segundo o delineamento estatístico inteiramente casualizado com 24 repetições.

3.15.7. Desbaste

Aos 30 dias da inoculação foi feito um desbaste seletivo deixando-se somente uma planta por recipiente (a mais vigorosa).

3.15.8. Adubação

A adubação consistiu da aplicação de solução nutriente (RUEHLE & WELLS, 1984), preparado segundo o item 3.5.34, semanalmente, após o desbaste.

3.15.9. Avaliação

Aos 90 dias da inoculação foi feita uma avaliação visual em escalas de notas de 0 a 5 do grau de colonização das raízes e porcentagem de plantas micorrizadas.

3.16. Avaliação do grau de micorrização de mudas de *Eucalyptus urophylla* proveniente de semeio direto e plântulas, inoculadas com isolados de *Pisolithus tinctorius*

3.16.1. Produção de inoculante

A produção de inoculante consistiu da transferência de 8 discos de 0,5 cm de diâmetro retirados das bordas das colônias crescidas em meio MNM para frascos de 300 ml contendo 200 ml de substrato turfa-vermiculita-meio MNM (preparado segundo o item 3.6.1).

Os frascos foram incubados a 26°C por 3 meses.

3.16.2. Inoculação do substrato

A inoculação foi feita através de uma mistura manual do inoculante ao substrato turfa-vermiculita (preparado segundo o item 3.6.6) na concentração de 10%.

O inoculante dos isolados ectomicorrízicos, antes de sua utilização, foi transferido para um tecido poroso e submetido a uma lavagem em água corrente por 2 minutos e, em seguida, colocada em bandeja plástica à temperatura ambiente para secagem, até eliminação do excesso de umidade.

3.16.3. Recipiente

O substrato inoculado foi distribuído em tubetes do tipo "dibbing tube", fabricado em polietileno de alta densidade, de formato cônico, na cor preta, com estrias internas para direcionamento das raízes, dispostos em bandejas de isopor.

3.16.4. Semeadura

Foram colocadas de 3 a 5 sementes de *Eucalyptus urophylla* por tubete a 1 cm de profundidade.

3.16.5. Transplante de plântulas

Plântulas retiradas de sementeiras foram transplantadas para os tubetes com 20 dias de idade.

3.16.6. Local de instalação do experimento

O experimento foi instalado em casa de vegetação da Bioplanta Tecnologia de Plantas S.A. situada em Paulínia-SP.

3.16.7. Delineamento estatístico

Os tratamentos foram distribuídos segundo o delineamento estatístico inteiramente casualizado com dezesseis repetições, seguindo o esquema fatorial 7x2 cujos fatores foram: isolados e fases de inoculação (plântulas ou sementes).

O quadro abaixo representa a análise de variância proposta, com as causas de variação e respectivos valores de F.

Causa de variação	GL	QM	F
Tratamentos (T)	T-1	QMT	
Isolados (I)	I-1	QMI	QMI/QMR
Fases de inoculação (F)	F-1	QMF	QMF/QMR
Isolado x Fases de inoculação IxF	(I-1)(F-1)	QMIxF	QMIxF/QMR
Resíduo (R)	T(R-1)	QMR	

Realizaram-se comparações entre médias de isolados e fases de inoculação aplicando-se teste de Tukey, através da seguinte fórmula: $\Delta = q \frac{s}{\sqrt{r}}$, onde, q = valor da amplitude total estudentizada a nível de 5% e 1% de probabilidade, r = número de repetições e s = estimativa do desvio padrão residual.

3.16.8. Desbaste

Aos 30 dias da inoculação foi feito um desbaste seletivo, nos tubetes semeados, deixando-se somente uma planta por recipiente (a mais vigorosa).

3.16.9. Adubação

A adubação consistiu da aplicação de solução nutriente (RUEHLE & WELLS, 1984), preparado segundo o item 3.5.34, semanalmente, após desbaste.

3.16.10. Avaliação

Aos 60 dias da inoculação foi feita uma avaliação visual do grau de colonização das raízes.

3.17. Produção de inoculante de um isolado de *Pisolithus tinctorius* em diferentes substratos

3.17.1. Preparo do substrato

Preparado segundo os ítens 3.6.1, 3.6.2, 3.6.3, 3.6.4 e 3.6.5.

3.17.2. Produção de inoculante

O método de produção de inoculante consistiu da transferência de 8 discos de 0,5 cm de diâmetro retirados das bordas das colônias do isolado PI 314 crescidas em meio MNM, para frascos de 300 ml, contendo separadamente, 200 ml de substrato turfa-vermiculita-meio MNM, turfa-vermiculita-meio BDA, turfa-vermiculita-meio BDA-D, turfa-vermiculita-meio BDMT e turfa-vermiculita-meio MNMB (preparado segundo os ítens 3.6.1, 3.6.2, 3.6.3, 3.6.4 e 3.6.5). Os fracos foram incubados a 26°C por 3 meses.

3.17.3. Delineamento estatístico

Os tratamentos foram distribuídos segundo o delineamento estatístico inteiramente casualizado com seis repetições.

3.17.4. Avaliação

Aos 90 dias da inoculação do substrato foi feita uma avaliação visual do crescimento micelial nos substratos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do crescimento dos isolados de *Pisolithus tinctorius* em diferentes meios de cultura

Os isolados do fungo *Pisolithus tinctorius*, utilizados no presente trabalho, apresentam crescimento lento quando comparado a outros fungos. Segundo SASEK & MUSÍLEK (1971), o crescimento de fungos basidiomicetos micorrízicos em laboratório é geralmente mais lento do que fungos basidiomicetos não-micorrízicos. Do ponto de vista prático é interessante testarem-se outros meios de cultura, com vistas à aceleração do seu crescimento, o que muito ajudaria em estudos posteriores.

Seguindo-se a metodologia descrita no item 3.8, obtiveram-se os resultados dos diâmetros das colônias em placas contendo diferentes meios de cultura dos isolados AC1, AC3, AC6, AC8, AC12, PI 203, PI 312, PI 314, PI 316, ITA6, ITA11, Pt 185 e Pt *taeda* de *Pisolithus tinctorius*

(apresentados na Tabela 1 do Apêndice). A Tabela 1 apresenta os valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância, enquanto que as Tabelas 2, 3 e 4 mostram a comparação das médias de isolados, de meios e idades respectivamente, pelo teste de Tukey.

A análise de variância para medidas de diâmetro (Tabela 1) mostrou que houveram diferenças significativas a 1% para os fatores isolados, meios e idades.

Tabela 1. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados das medidas dos diâmetros das colônias em placas contendo diferentes meios de cultura.

CV	GL	Q.M.	F
Blocos	3	0,1304	0,3248ns
Isol.	12	65,2062	162,4152**
Resíduo (A)	36	0,4014	
Parcelas	51		
Meios	4	77,4182	258,3046**
Isol. x Meios	48	7,1502	23,8567**
Resíduo (B)	156	0,2997	
Subparcelas	259		
Diam.	5	668,7847	30641,7075**
Isol. x Dia	60	4,4901	159,9090**
Meios x Dia	20	1,7478	80,0828**
Isol. x Meios x Dia	240	0,2305	10,5651**
Resíduo (C)	975	0,0218	
Total	1559		

Coeficiente de Variação (A) = 2,299%
Coeficiente de Variação (B) = 4,442%
Coeficiente de Variação (C) = 2,936%

n.s. = não significativo
** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 2. Comparação das médias (diâmetros de colônias em cm) de isolados pelo teste de Tukey.

Isolados	Médias	5%	1%
AC 12	6,4595	a	A
PI 314	6,0545	b	B
PI 203	5,6170	c	C
ITA 6	5,5837	c	C
AC 6	5,3333	c	C
Pt 185	4,8137	d	D
Pt. *taeda*	4,8029	de	D
PI 312	4,7954	de	D
ITA 11	4,6104	def	D
PI 316	4,5441	def	D
AC 1	4,5154	ef	D
AC 3	4,5041	f	D
AC 8	3,7741	g	E

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.
DMS 1% = 0,3417 DMS 5% = 0,2903

Tabela 3. Comparação das médias (diâmetros de colônias em cm) de meios pelo teste de Tukey.

Meios	Médias	5%	1%
MNM	5,8104	a	A
BDA-D	5,0698	b	B
BDA	5,0237	b	B
MNMB	4,7945	c	C
BDMT	4,4586	d	D

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.
DMS 1% = 0,1447 DMS 5% = 0,1208

Tabela 4. Comparação das médias de diâmetros das colônias dos isolados em função da idade (dias) pelo teste de Tukey.

Idade (dias)	Médias	1%	5%
25	7,0334	a	A
22	6,3036	b	B
19	5,6242	c	C
16	4,7157	d	D
13	3,7444	e	E
10	2,7671	f	F

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

DMS 1% = 4,5894 DMS 5% = 4,0896

Os isolados AC 12 e PI 314 cresceram bem em todos os meios testados, porém não superando o crescimento em meio MNM. Esta observação pode ser confirmada através da comparação das médias de isolados pelo teste de Tukey (Tabela 2). Nesta tabela podemos verificar que estes isolados apresentam as melhores médias e que eles diferem entre si e diferem dos demais a 5 e 1% de significância.

O isolado PI 203 também apresentou um bom crescimento nos meios testados e, na Tabela 2 podemos verificar que este isolado apresentou a terceira melhor média,

apesar de não diferir estatisticamente dos isolados ITA 6 e AC 6.

Os outros isolados apresentaram modificações no hábito de crescimento micelial nos meios testados. Com exceção para o meio MNM, eles apresentaram crescimento de colônias compactadas, aumentando a massa micelial (discutido a seguir) e, em alguns casos, apresentaram colônias rugosas.

Na Tabela 3 podemos observar que o meio BDA que contém 20 g de Dextrose não diferiu estatisticamente do meio BDA contendo 10 g de Dextrose. Isto mostra que reduzindo-se para a metade a quantidade de Dextrose podemos obter o mesmo crescimento. Todos os outros meios diferem entre si ao nível de 5 e 1% de significância e o melhor meio foi o MNM, como pode ser verificado pela comparação das médias de meios pelo teste de Tukey.

Apesar de nenhum meio ter sido melhor que o meio MNM para os isolados AC 12 e PI 314, o crescimento nos meios MNMB, BDA, BDA-D e BDMT foi igual ao obtido no meio MNM.

Considerando-se os resultados obtidos, foi desenvolvido um outro ensaio para avaliar melhor os meios, visto que foi observado um aumento de massa micelial de alguns isolados.

4.2. Produção de biomassa dos isolados de *Pisolithus tinctorius* em diferentes meios de cultura

No experimento anterior foi verificado, na maioria dos isolados, um aumento na massa micelial devido ao crescimento de colônias com micélio compacto nos meios BDA, BDA-D, BDMT e MNMB. Para avaliar este aumento, os isolados foram inoculados em meio líquido visando a avaliação da biomassa produzida por eles nestes meios.

Os resultados dos pesos secos de micélio, dos isolados AC1, AC3, AC6, AC8, AC12, PI 203, PI 312, PI 314, PI 316, ITA 6, ITA 11, Pt 185 e Pt *taeda*, inoculados em diferentes meios de cultura, após 30 dias foram tomados segundo o item 3.9 e estão apresentados na Tabela 2 do Apêndice. A Tabela 5 apresenta os valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância. As Tabelas 6 e 7 mostram a comparação das médias de isolados e comparação das médias de isolados dentro de cada meio pelo teste de Tukey a nível de 5 e 1% de significância, enquanto que a comparação das médias de meios e comparação das médias de meios dentro de cada linhagem pelo teste de Tukey a nível de 5 e 1% de significância estão apresentados nas Tabelas 8 e 9.

A análise de variância mostra que houveram diferenças significativas a nível de 1% tanto para o fator isolado como para o fator meio.

Tabela 5. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados das medidas de pesos secos de micélio de diferentes isolados em diferentes meios de cultura.

C.V.	GL	Q.M.	F
Isolado	12	0,0162	44,2467**
Meio	4	0,0350	95,5171**
Isol. x Meio	48	0,0016	4,5080**
Resíduo	195	0,0003	
Total	259		

Média geral = 0,0866
Coeficiente de Variação = 20,00%
ns = não significativo
** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

Não existe uma relação direta entre diâmetro da colônia e seus respectivos pesos; os isolados que possuem as melhores médias de crescimento não são os que tem maior média de peso seco.

As médias de cada isolado indicam que os melhores foram Pt 185 e Pt *taeda*, os quais apresentaram 0,130 g e 0,118 g de peso seco de micélio respectivamente, como pode ser verificado na Tabela 6. Nesta tabela podemos verificar que o isolado Pt 185 difere dos demais, exceto do Pt taeda. No entanto, na Tabela 2 podemos verificar que estes dois isolados apresentaram as priores médias de crescimento.

Tabela 6. Comparação das médias (peso seco de micélio) de isolados inoculados em diferentes meios de cultura pelo teste de Tukey.

Isolado	Médias	5%	1%
Pt 185	0,1300	a	A
Pt *taeda*	0,1180	ab	AB
ITA 6	0,1040	bc	BC
AC 8	0,1025	bc	BC
AC 3	0,1020	bc	BC
AC 1	0,0925	cd	CD
ITA 11	0,0925	cd	CD
AC 6	0,0875	cde	CD
AC 12	0,0850	cde	CD
PI 316	0,0730	de	D
PI 312	0,0695	e	D
PI 314	0,0450	f	E
PI 203	0,0250	f	E

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

DMS 1% = 2,3071 DMS 5% = 2,0181

Dentro do meio MNM, que é o meio normalmente utilizado, os isolados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas a nível de 1% pelo teste de Tukey. Já nos outros meios testados ocorrem diferenças entre os isolados ao mesmo nível de significância (Tabela 7). No meio MNMB o isolado AC3 apresentou a maior média de peso seco. Neste meio, o AC 3 difere dos demais.

Tabela 7. Comparação das médias (peso seco de micélio) dos isolados dentro de cada meio.

Isolados	Médias dos pesos secos de micélio (g)				
	MNM	MNMB	BDA	BDA-D	BDMT
AC 1	0,0425A	0,1350BC	0,0950B	0,0850AB	0,1050AB
AC 3	0,0450A	0,2000A	0,0950B	0,0825AB	0,0875AB
AC 6	0,0400A	0,1275BC	0,0900BC	0,0850AB	0,0950AB
AC 8	0,0550A	0,1300BC	0,1175B	0,1000A	0,1100AB
AC 12	0,0475A	0,1100BCD	0,0925BC	0,0825AB	0,0925AB
PI 203	0,0175A	0,0450E	0,0225D	0,0200C	0,0200D
PI 312	0,0325A	0,0850CDE	0,0800BC	0,0700ABC	0,0800BC
PI 314	0,0525A	0,0625DE	0,0425CD	0,0350BC	0,0325CD
PI 316	0,0450A	0,0950BCDE	0,0750BC	0,0750AB	0,0750BC
ITA 6	0,0525A	0,1300BC	0,1125B	0,1100A	0,1150AB
ITA 11	0,0475A	0,1225BC	0,0925BC	0,9250A	0,1075AB
Pt 185	0,0675A	0,1400B	0,1950A	0,1100A	0,1375A
Pt *taeda*	0,0575A	0,1250BC	0,1800A	0,1025A	0,1250AB

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.
DMS (1%) = 5,1590

No meio BDA, Pt 185 e Pt *taeda* não diferem entre si, mas diferem dos demais, sendo estes os que produzem maiores médias de peso seco neste meio. Na mesma tabela podemos verificar que dentro do meio BDA-D os isolados ITA 6, Pt 185, Pt *taeda*, AC8, ITA11, AC6, AC1, AC12, AC3, PI

316 e PI 312 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, mas diferem de PI 314 e PI 203. Dentro do meio BDMT Pt 185 difere estatisticamente de PI 312, PI 316, PI 314 e PI 203, mas não difere dos demais.

Comparando-se os valores das médias de meios, podemos verificar que o meio MNM-B foi o melhor para produção de biomassa; no entanto, no meio MNM que foi o melhor meio para o crescimento do fungo (Tabela 2) - foi obtida a menor média de peso seco. Em todos os outros meios a produção de massa micelial foi maior, como mostra a Tabela 8.

Tabela 8. Comparação das médias (peso seco de micélio) de meios pelo teste de Tukey.

Meios	Médias	5%	1%
MNMB	0,1159	a	A
BDA	0,0992	b	B
BDMT	0,0909	bc	BC
BDA-D	0,0807	c	C
MNM	0,0463	d	D

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.
DMS 1% = 1,2290
DMS 5% = 1,0291

Na Tabela 9 podemos verificar que para os isolados PI 203 e PI 314 não houve diferença entre os meios a nível de 5 e 1% de significância.

O comportamento destes isolados confirmam os resultados obtidos anteriormente (item 3.8) onde estes isolados mostraram o mesmo crescimento em todos os meios testados.

Tabela 9. Comparação das médias de meios (peso seco de micélio) dentro de cada isolado.

Isolados	Médias dos pesos secos de micélio (g)				
	MNM	MNMB	BDA	BDA-D	BDMT
AC1	0,0425C	0,1350A	0,0950AB	0,0850BC	0,1050AB
AC3	0,0450C	0,2000A	0,0950B	0,0825BC	0,0875BC
AC6	0,0400B	0,1275A	0,0900A	0,0850A	0,0950A
AC8	0,0550B	0,1300A	0,1175A	0,1000A	0,1100A
AC12	0,0475B	0,1100A	0,0925A	0,0825AB	0,0925A
PI 203	0,0175A	0,0450A	0,0225A	0,0200A	0,0200A
PIO 312	0,0325B	0,0850A	0,0800A	0,0700AB	0,0800A
PI 314	0,0525A	0,0625A	0,0425A	0,0350A	0,0325A
PI 316	0,0450B	0,0950A	0,0750AB	0,0750AB	0,0750AB
ITA6	0,0525B	0,1300A	0,1125A	0,1100A	0,1150A
ITA11	0,0475B	0,1225A	0,0925A	0,0925A	0,1075A
Pt 185	0,0675C	0,1400B	0,1950A	0,1100BC	0,1375B
Pt *taeda*	0,0575C	0,1250B	0,1800A	0,1025B	0,1250B

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.
DMS (1%) = 4,4312

Para o isolado AC12 não houve diferença estatisticamente significativa entre os meios MNMB, BDA, BDA-D e BDMT, mas estes diferem do meio MNM (Tabela 9). No entanto, o desenvolvimento das colônias também foram normais em todos os meios. Para os outros isolados houveram diferenças estatisticamente significativas entre os meios. O desenvolvimento do fungo nos meios MNMB, BDA, BDA-D e BDMT não foi normal. As colônias cresceram rugosas, compactas, com coloração escura e ocorrendo também liberação de uma substância escura (não identificada); isto poderia causar uma mudança no comportamento do fungo.

Os meios foram bons somente para os isolados PI 203, PI 314 e AC12 porque eles tiveram desenvolvimento de colônias normais em todos os meios. Não foi constatado nenhum aumento na produção de massa micelial destes isolados. Contudo, deve-se salientar que os mesmos apresentam opções de crescimento em diferentes meios de cultura. Para estes três isolados, como já tinha sido observado anteriormente, o meio BDA que contém 20 g de Dextrose não difere estatisticamente do meio BDA contendo 10 g de Dextrose; reduzindo-se para a metade a quantidade de Dextrose obtemos o mesmo resultado.

4.3. Caracterização citológica

Com o intuito de se iniciar um estudo genético nessa espécie, fizeram-se inicialmente observações citológicas de hifas em diferentes estádios de desenvolvimento. Estes estudos citológicos são necessários para se conhecer e compreender os fenômenos de variabilidade genética natural já constatada nessa espécie.

Após a coloração pelo método descrito no item 3.10, foi possível observar o desenvolvimento de hifas, determinar o número de núcleos por célula micelial (Figura 1) e fazer algumas observações da divisão nuclear em células somáticas do micélio. As medidas dos núcleos foram feitas como descrito no item 3.10.2.

Os resultados mostram que as hifas possuem espessuras bem diversificadas. Cada célula micelial possui dois núcleos, sendo que estes apresentam um tamanho médio de 2,439 μ (média de 596 núcleos). De uma célula para outra foram observadas as pontes de conexão e, raramente, foi observado a passagem de núcleos através destas pontes, talvez por este processo ser relativamente rápido. AIST & WILSON (1967b) verificaram que em *Ceratocystis fagacearum* o processo de divisão nuclear prolonga-se por 3 a 5 minutos.

A divisão celular ocorre mais frequentemente em células de extremidades de hifas do que em hifas velhas.

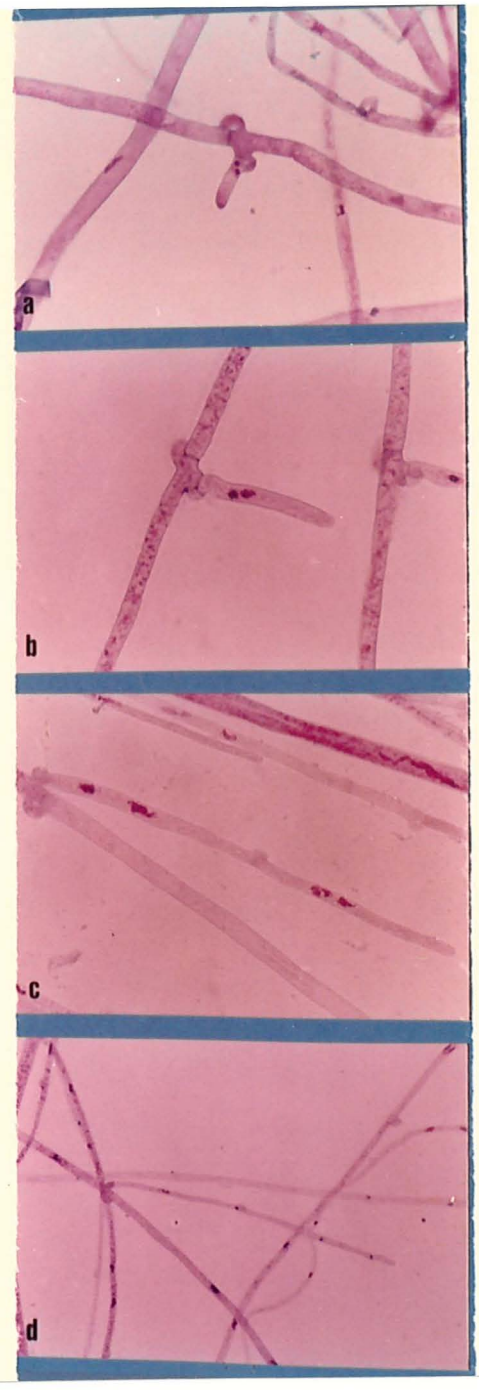

Figura 1. a - d) Desenvolvimento de hifas de *Pisolithus tinctorius*. Presença de dois núcleos por célula micelial (a-c x 1000, d x 400).

Há muitas teorias publicadas relacionadas à divisão nuclear assexual em fungos. Uma delas é a que a divisão corresponde à mitose clásica (SOMERS et alii, 1960; WARD & CIURYSEK, 1961 e ICHIDA & FULLER, 1968).

Alguns pesquisadores (BAKERSPIGEL, 1958 e 1959 e SAKSENA, 1961) não encontraram fusos, placas metafásicas ou centríolos, como na mitose regular. O núcleo simplesmente se alonga, contrai ao meio e, então, se separa para formar núcleos filhos.

Apesar do número considerável de informações sobre mitose em hifas de fungos filamentosos, nenhum padrão de divisão foi sugerido. Alguns pesquisadores não revelaram nada além do conhecido; mas, muitos outros encontraram que a divisão ocorre por um processo que difere em vários aspectos da divisão de núcleos de organismos superiores.

A literatura nos deixa em dúvida se essas diferenças se devem ao pequeno tamanho dos núcleos dos fungos, às técnicas empregadas em seu estudo, a alguma peculiaridade do comportamento ou se são meras impressões.

As observações da divisão nuclear em células somáticas do fungo *Pisolithus tinctorius* demonstraram ocorrer com alguma similaridade à de outros fungos, mas algumas estruturas não puderam ser observadas.

Os núcleos em divisão variam em forma e tamanho, dependendo, da fase de divisão que se encontra. Utilizando-se o critério proposto por TANAKA (1976) para o

fungo filamentoso *Pyricularia oryzae* e utilizado por RODRIGUES (1987) para o fungo *Humicola* sp, o processo de divisão foi classificado em cinco estágios de acordo com a forma e tamanho dos núcleos. No estágio de interfase os núcleos apresentavam-se esféricos ou subesféricos e corados uniformemente (Figura 2-h). Em muitos fungos o estágio de interface é caracterizado pela presença de um nucléolo proeminente como em *Neurospora crassa* (SOMERS et alii, 1960), *Ceratobasidium praticolum* (SAKSENA, 1961), *Ceratocystis fagacearum* (AIST & WILSON, 1967b), *Fusarium oxysporum* (AIST & WILSON, 1967a), *Macrophomina phaseoli* (KNOX-DAVIES, 1967), *Catenaria anguillulae* (ICHIDA & FULLER, 1968), *Poria monticola* (BRUSHABER & JENKINS, 1971); esta estruturanão foi observada em *Pisolithus tinctorius*. Na prófase, os núcleos apresentavam-se menos corados do que na interfase, tinham formato esférico ou, algumas vezes, alongados (Figura 2-a). Os cromossomos não foram diferenciados neste estágio. Os núcleos em metáfase apresentavam corpos cromatínicos irregulares e não diferenciados em cromossomos individualizados (Figura 2-b e c). Placas metafásicas encontradas por alguns pesquisadores (WARD & CIURYSEK, 1961 e SOMERS, 1960) não foram observados. Classificou-se como anafásicos, dois núcleos pareados, conectados por fios de cromatina. Com o prosseguimento da anáfase as cromatides irmãs, tornaram-se igualmente distribuídas no núcleo. Na anáfase final ou telófase inicial, os cromossomos filhos agregaram-se em duas

massas relativamente grandes, paralelas uma a outra e ao eixo longo da hifa, parecendo algumas vezes, uma configuração de "duplo trilho" (Figura 2d-e). Esta configuração cromossomal foi detectada em *Aspergillus* e *Fusarium*, utilizando-se o mesmo corante (BURNETT, 1976). Em *Aspergillus nidulans* os cromossomos se separam e o grupo compacto se transforma em duas ou mais cadeias de corpos cromatínicos parelalos uma a outra e a lacuna entre as cadeias paralelas é ocupada por um longo fuso (ROBINSON & CATEN, 1969). A estrutura do fuso não foi observada em *Pisolithus*.

Os detalhes do processo pelo qual o estágio de "trilho" é alcançado permanece obscuro. Segundo FINCHAM et alii (1979) a aparência de "trilho" pode ser devido, parcialmente, a assincromia da disjunção cromossómica, alguns pares quase nos polos enquanto outros se encontram ainda pouco separados.

A formação pareada, em *Aspergillus*, parece se quebrar transversalmente na região equatorial, ocorrendo movimento da cromatina em direção a ambas extremidades em cada cadeia (ROBINSON & CATEN, 1969). Semelhante observação também foi feita por BURNETT (1976). No entanto, em *Pisolithus tinctotius* não foi observado nenhuma quebra transversal. Neste fungo parece que há migração de uma cadeia para cada extremidade, como se cada cadeia fosse puxada para umpólo (Figura 2f-g). No final da telófase são formados dois núcleos filhos que assumem uma forma esférica (Figura 2h).

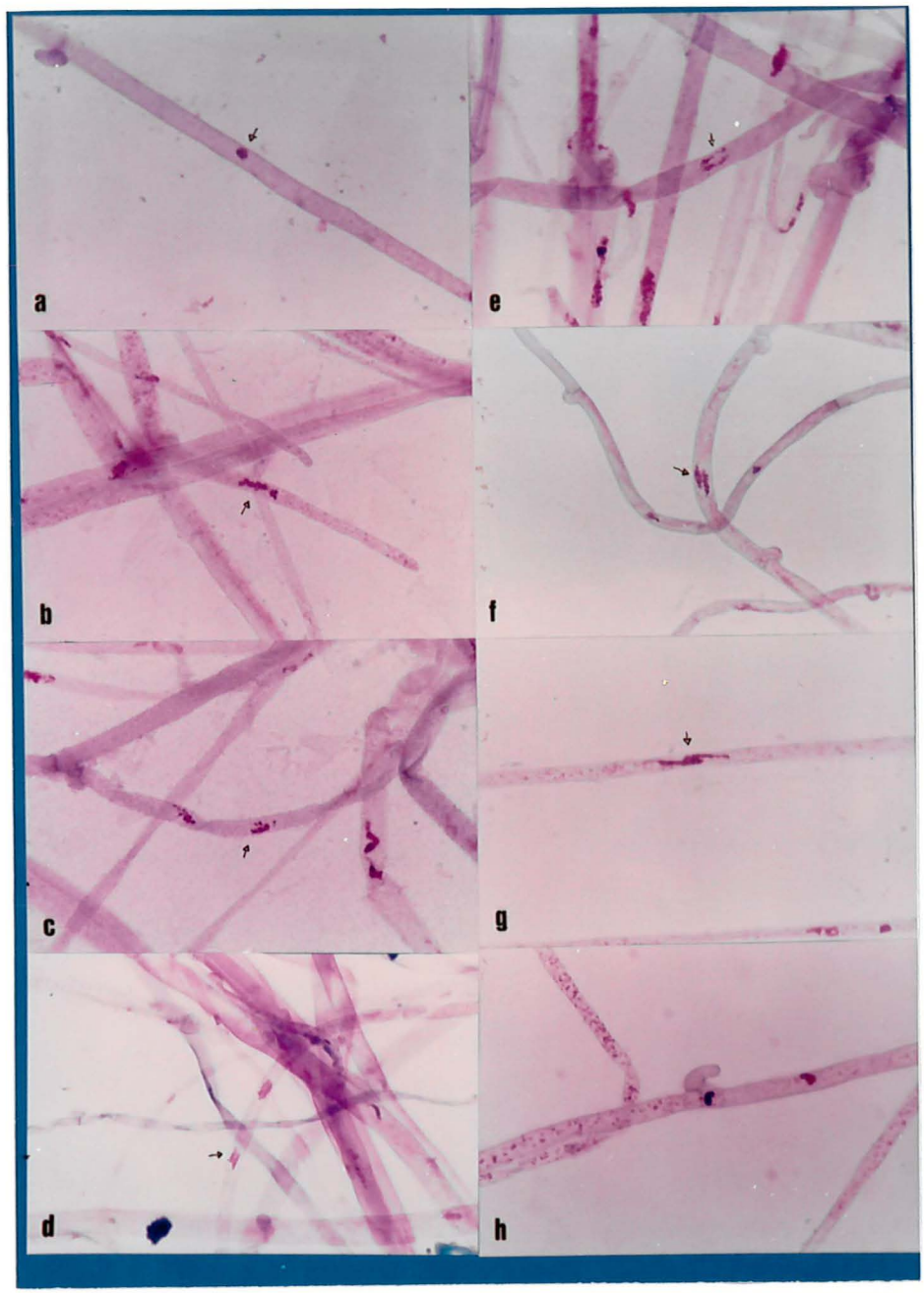

Figura 2. Fases da divisão mitótica em célula somática de micélio de *Pisolithus tinctorius* (x1000). a) Prófase; b-c) metáfase; d-e) anáfase; f-g) telófase; h) interfase.

Segundo BURNETT (1976), este tipo de alinhamento duplo paralelo é extremamente difundido entre os fungos e esta forma de arranjo tem sido mais comumente vista em Basidiomicetos de todas as espécies.

As limitações da resolução ótica não permitem maiores detalhes, contudo, a microscopia de contraste de fase ou microscopia eletrônica poderiam fornecer mais detalhadamente o processo de divisão podendo elucidar melhor o comportamento cromossomal neste fungo.

4.4. Padrão eletroforético de esterases

O perfil eletroforético para esterases em gel de poliacrilamida dos isolados Pt 185, FEP2, FEP3, Pt *taeda* e P5, obtido segundo o item 3.11, está representado na Figura 3.

A idade da cultura, a metodologia para extração das enzimas e a concentração das amostras foram padronizadas para os isolados de *Pinus* (item 3.11.1) e foram testados para os isolados de *Eucalyptus*, sendo que nestes não houve um resultado satisfatório.

Pelo padrão resultante, os isolados de *Pinus* não mostraram diferenças quando ao padrão de bandas para esterases, apresentando, todos eles, quatro bandas estreitas. O perfil eletroforético de outras enzimas deve ser

traçado para estes isolados com intenção de verificar se os mesmos apresentam diferenças no padrão de bandas de outras enzimas.

Para os isolados de *Eucalyptus* também devem ser padronizados a idade da cultura e uma metodologia para a extração das enzimas.

O desenvolvimento de uma metodologia para caracterização eletroforética dos isolados é de grande importância em estudos posteriores para demonstração de enzimas particulares presente no micélio e, também, para identificação de proteínas envolvidas na simbiose do fungo com o hospedeiro.

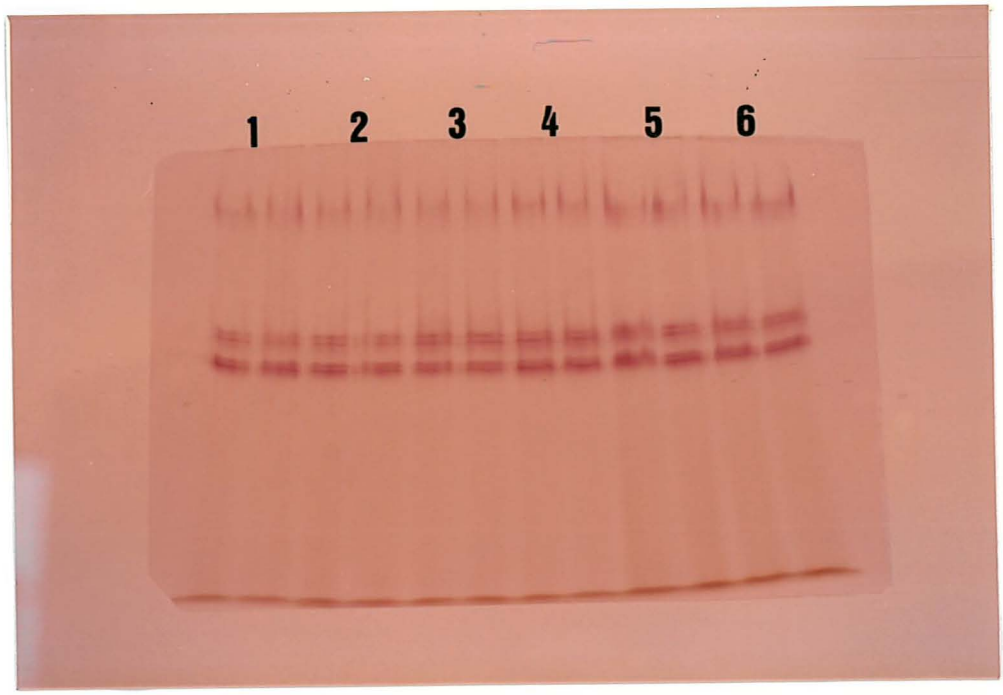

Figura 3. Padrão eletroforético de esterases de diferentes isolados de *Pisolithus tinctotius*. 1. Pt 185; 2. FEP2; 3. FEP3; 4. Pt *taeda;* 5 e 6. FEP5.

4.5. Obtenção de protoplastos

Técnicas para produção e regeneração de protoplastos podem ser de grande benefício para a pesquisa em organismos como os fungos micorrízicos, que são difíceis ou impossíveis de cultivar em laboratório e sobre os quais pouco ou nada se conhece sobre seu sistema genético.

Foram avaliadas algumas condições para produção de protoplastos de um isolado selecionado de *Pisolithis tinctorius*.

A seleção do isolado foi feita através da avaliação do crescimento dos isolados em meio sólido e meio líquido.

Soluções líticas preparadas com manitol 0,6M foram testadas para liberação de protoplastos do isolado FEP3 de *P. tinctorius*. A preparação enzimática mais eficiente foi Novozyme 234, liberando $3,3 \times 10^6$ protoplastos/ml depois de 2 horas de incubação. Esta enzima também foi utilizada por BARRETT et alii (1989) para obtenção de protoplastos de *Hebeloma circinans*, *Hebeloma cylindrosporum*, *Laccaria bicolor*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius*, *Suilus luteus* e *Telephora terrestris*. Segundo KROPP & FORTIN (1986) esta foi a enzima mais eficiente para *Laccaria bicolor*.

A combinação de Celulase Onozuka e Driselase com Zimoliase e Quitinase ou com β-Glucuronidase produziu um

número insignificante de protoplastos (Tabela 10). HÉBRAUD & FÈVRE (1988) testaram a mistura de Celulase Onozuka R10 e Driselase utilizando $MgSO_4$ 0,7M como estabilizador e não obtiveram protoplastos de micélio de *Pisolithus tinctorius*; segundo os autores foi devido à presença de pigmentos protetores na parede das hifas. Esta mesma mistura em combinação com β-glucuronidase foi utilizada com sucesso em outros Basidiomicetos como *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus salmoneo straminius* (TOYOMASU et alii, 1986).

Tabela 10. Liberação de protoplastos de *Pisolithus tinctorius* usando diferentes preparações enzimáticas.

Enzima lítica	Protoplastos liberados/ml depois de 4 h de incubação*
Novozyme 234	$3,3 \pm 0,4 \times 10^6$
Celulase Onozuka + Driselase + Zimoliase + quitinase	$0,09 \pm 0,05 \times 10^6$
Celulase Onozuka + Driselase + β-glucuronidase	$0,03 \pm 0,02 \times 10^6$

* média de 4 repetições.

Os protoplastos são formados em tampão MMC utilizados para outros fungos basidiomicetos ectomicorrízicos (KROPP & FORTIN, 1986; BARRETT et alii, 1989).

A idade da cultura afetou grandemente a digestão da parede celular por Novozyme 234 (Figura 4). A proporção de hifas jovens e velhas varia de acordo com a idade da cultura; consequentemente, isto afeta a produção de protoplastos, pois as hifas jovens são mais sensíveis à digestão enzimática. O maior número de protoplastos produzido foi observado após quatro dias de crescimento dos fragmentos de hifas. Depois de cinco dias de crescimento, o nível de protoplastos liberados declinou e, com três dias, quase nada foi produzido.

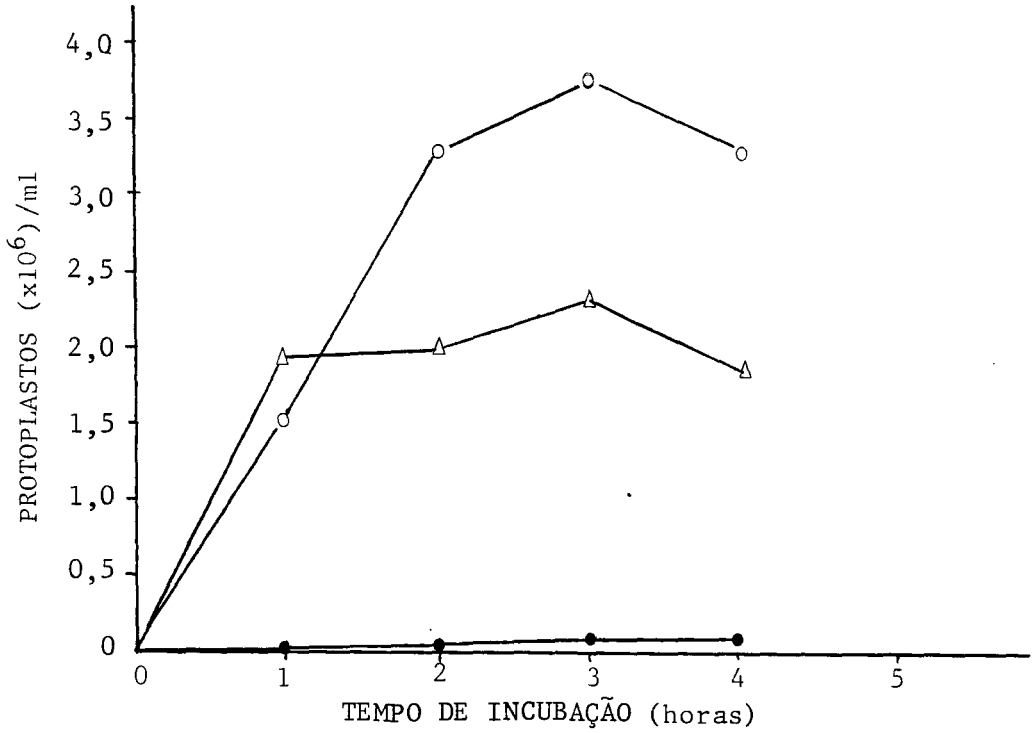

Figura 4. Influência da idade do micélio na liberação de protoplastos do isolado FEP3 de *Pisolitus tinctorius* em diferentes tempos de incubação com Novozyme 234 (média de 4 repetições); ●--●, 3 dias; o--o, 4 dias; Δ--Δ , 5 dias.

HÉBRAUD & FÈVRE (1988) consideraram a idade do micélio o principal parâmetro para a produção de protoplastos de *Hebeloma cylindrosporum*. KROPP & FORTIN (1985) observaram que em *Laccaria bicolor* a digestão da parece pela enzima foi grandemente afetada pela idade da cultura. Esta mesma observação foi feita por BARRETT et alii (1989) para oito fungos ectomicorrízicos.

Para se obter a produção adequada de protoplastos foi necessário homogeneizar o inóculo para que fossem produzidas numerosas pontas de hifas jovens susceptíveis à digestão.

Os protoplastos produzidos em diferentes tempos de incubação não mostraram variação em tamanho. O tamanho médio foi de 5,3 μ, variando de 3,4 μ a 8,6 μ de diâmetro. Com micélio de cinco dias, os protoplastos liberados eram relativamente menores - com um tamanho médio de 4,4 μ -, variando de 2,5 μ a 6,8 μ.

Não foi obtida a regeneração dos protoplastos nos meios testados. BARRETT et alii (1989) também não obtiveram regeneração de protoplastos de *P. tinctorius*; os protoplastos corados mostraram ausência de núcleos. Segundo os autores, o micélio deste fungo é composto predominantemente de hifas largas (> 3μ) com paredes celulares grossas e, freqüentemente, pigmentadas e/ou incrustadas. A minoria das células desse micélio são estreitas e com paredes finas.

YANAGI et alii (1985) constataram que protoplastos liberados com Novozyme 234 de *Coprinus macrorhizus* são pequenos e uma grande proporção são anucleados. Em *Laccaria bicolor* 62,9% dos protoplastos liberados eram anucleados (KROPP & FORTIN, 1986).

A técnica de coloração de núcleos de protoplastos utilizada neste estudo (item 3.12.6) foi proposta por BORGES (1987) e foi utilizada com sucesso em *Aspergillus nidulans* (VIEIRA, 1988), *Trichoderma pseudokoningii* (FURLANETO, 1989) e *Metarhizium anisopliae* (VALADARES, 1989). No entanto, não foi possível a coloração de núcleos de protoplastos de *Pisolithus tinctorius* com esta técnica, pois houve cristalização do manitol nas lâminas.

As possibilidades para o uso de protoplastos de fungos ectomicorrízicos justifica a importância da continuidade no esforço para regenerar protoplastos neste fungo.

Os protoplastos de fungos ectomicorrízicos são fontes para desenvolver o melhoramento de isolados que poderiam afetar positivamente a produtividade de culturas florestais.

Mutantes de *Hebeloma cylindrosporum* resistentes a fungicidas como Benomil, Benodanil e Carboxine foram obtidos por HÉBRAUD & FÈVRE (1988) através da irradiação de protoplastos com luz ultravioleta.

Recentes avanços no desenvolvimento de sistema de clonagem em vários grupos de fungos tornaram

possível considerar-se a aplicação e o potencial benéfico de tal sistema em fungos micorrízicos.

A aplicação de clonagem gênica em fungos micorrízicos inclui a possibilidade de introduzirem-se novos genes, determinando produtos que seriam benéficos à planta hospedeira em associações simbióticas. Outro aspecto inclui a possibilidade de conhecermos mais a biologia fundamental da associação micorrízica. Segundo Gilchrist & Yoder, 1984 (citados por TRAPPE & MOLINA, 1986) "um benefício primário de ter genes isolados é o potencial que eles oferecem para aumentar nosso conhecimento sobre os mecanismos moleculares que controlam a interação entre microrganismos e seus hospedeiros".

4.6. Avaliação da formação de ectomicorriza em *Eucalyptus* com isolados de *Pisolithus tinctorius* em diferentes concentrações de alumínio

Este estudo foi realizado com o intuito de verificar o efeito de altas concentrações de Al na capacidade de infecção micorrízica dos isolados AC6, AC8, AC12 e PI 314 de *P. tinctorius*.

Ao fim de três meses de permanência em casa de vegetação, as plantas inoculadas preparadas, segundo a metodologia descrita no item 3.13, foram avaliadas quanto ao

grau de micorrização. Os resultados da avaliação visual das raízes estão apresentados na Tabela 3 do Apêndice. As plantas inoculadas apresentaram-se visualmente com baixo grau de infecção micorrízica. A presença de micorrizas no interior do substrato foi facilmente detectada devido à coloração dourada das hifas que facilitam a visualização e determinação da quantidade de ectomicorrizas nas raízes das mudas (Figura 5 - 2 e 3).

O resultado da avaliação através da coloração das raízes (segundo item 3.13.10) estão apresentados na Tabela 4 do Apêndice. Estes dados foram avaliados estatisticamente. A Tabela 11 apresenta os valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância. Os resultados da análise química dos componentes do substrato estão indicados na Tabela 12, enquanto que a dosagem de alumínio no substrato no final do experimento está apresentada na Tabela 13. A Tabela 14 apresenta a concentração final da solução nutritiva (preparada segundo o item 3.5.28) utilizada durante o experimento.

Figura 5. 1) Corpos de frutificação do fungo *Pisolithus tinctorius*; 2) Fase inicial da síntese de ectomicorriza em *Eucalyptus urophylla* (x40); 3) Ectomicorriza em *Eucalyptus urophylla* (x40).

Tabela 11. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados da avaliação da síntese de ectomicorriza em *Eucalyptus* em diferentes níveis de alumínio através de coloração de raízes.

Causa de Variação	GL	QM	F
Isolados	3	4,5833	0,78ns
Concentração Al	4	4,5406	0,77ns
Isol. x Conc. Al	12	5,9531	1,01ns
Resíduo	140	5,8982	
Total	159		

Tabela 12. Resultado da análise química do substrato utilizado para o experimento da síntese de ectomicorriza em *Eucalyptus* em diferentes concentrações de alumínio.

%					
N	P	K	Ca	Mg	S
0,49	0,06	0,05	0,09	0,70	0,21

ppm					
B	Cu	Fe	Mn	Mo	Zn
30	17	4554	41	-	16

Tabela 13. Dosagem de alumínio nos substratos no final do experimento.

Substratos	Al	
	meq/100 ml	ppm
Substrato - 0 ppm Al	0,65	58,5
Substrato - 5 ppm Al	0,60	54,0
Substrato - 10 ppm Al	0,95	85,5
Substrato - 15 ppm Al	0,80	72,0
Substrato - 20 ppm Al	1,40	126,0

Tabela 14. Concentração final da solução nutritiva.

Nutriente	ppm
Ca	30
K	18
Mg	3,8
$N-NO_3^-$	31
$N-NH_4^+$	4
P	0,2
B	0,05
Fe	0,5
Mn	0,1
Mo	0,02
Zn	0,03
Cu	0,01

Os resultados mostram que não houve diferença entre os tratamentos a 10, 5 e 1% de significância pelo teste não paramétrico qui-quadrado. Pelo teste paramétrico seguindo-se o esquema fatorial, também não houve diferença significativa a nível de 1 e 5% de probabilidade para o fator isolado e concentração de Al.

Nas condições do experimento não foi possível verificar o efeito de concentração de Al na capacidade de infecção micorrízica. Houve falha na micorrização e a concentração final do alumínio no substrato não correspondeu à concentração aplicada, mas muito mais elevada (Tabela 13). O substrato da concentração 0, apresentou 58,5 ppm de alumínio, sem que o mesmo fosse acrescentado. O nível de alumínio pode variar no mesmo substrato, pois quando preparado com outro lote de turfa e vermiculita do mesmo lote, apresentou 40,5 ppm de alumínio.

Segundo DIXON & BUSCHENA (1981), os metais pesados podem ser fungitóxicos e podem influenciar na formação de ectomicorrizas; no entanto, altos níveis de Al no substrato, provavelmente não foram os fatores responsáveis pela falha na micorrização das plantas, pois algumas delas apresentaram raízes 100% micorrizadas, independente da concentração de alumínio.

Segundo MULLETTE (1976), as falhas ocorrem na infecção micorrízica em *Eucalyptus* devido à condução dos testes em condições inadequadas ao estabelecimento da infeção.

Alguns fatores já haviam sido avaliados anteriormente, como: as condições ambientais da casa de vegetação, dose do inóculo empregado, a espécie de *Eucalyptus*, substrato e tipo de recipiente.

Alta fertilidade que restringe ou impede o desenvolvimento micorrízico (MOLINA & TRAPPE, 1982) provavelmente não foi a causa da falha na infecção, visto que a solução nutritiva utilizada continha baixa concentração de P (0,2 ppm) para evitar a precipitação do alumínio.

Outros fatores não avaliados neste trabalho são, portanto, fundamentais para a formação de micorrizas e precisam ser estudados separadamente.

4.7. Coleta e isolamento de *Pisolithus tinctorius*

A busca de basidiocarpos de *Pisolithus tinctorius* é de grande importância para introdução e seleção de novos isolados.

A presença de basidiocarpos parece depender da idade do talhão, da quantidade de insolação e da interdependência entre ambos (YOKOMIZO & KRÜGNER, 1983/85).

Os basidiocarpos foram coletados segundo o item 3.14. A idade e a espécie de *Eucalyptus* não foram identificadas. As formas dos basidiocarpos eram

variáveis; de um modo geral eram irregularmente globosas com a cor amarela predominante, apresentando manchas rajadas de preto (Figura 5-1). O isolamento de *Pisolithus tinctorius* a partir de basidiocarpos, em meio de cultura (item 3.14), começa a se caracterizar aos cinco dias com um tênue crescimento micelial a partir do tecido implantado. A cor do micélio em meio de cultura não é uniforme para todos os isolados obtidos. Alguns isolados do fungo apresentavam setores de contorno irregular, geralmente com um micélio mais denso e coloração mais escura que o normal. As dez culturas obtidas foram repicadas várias vezes até se conseguir um crescimento homogêneo das colônias. Os isolados foram denominados de AT 501, AT 502, AT 503, AT 504, AT 505, AT 506, AT 507, AT 508, AT 509 e AT 510.

Há necessidade de estudos posteriores para avaliar-se a capacidade de micorrização dos isolados.

4.8. Avaliação da seleção de isolados de *Pisolithus tinctorius* para três espécies de *Eucalyptus* quanto à eficiência para formação de micorrizas

Este estudo foi realizado com o intuito de selecionar a eficiência de diferentes isolados de *P. tinctorius* coletados, para formação de micorriza em três espécies de *Eucalyptus*.

Os isolados obtidos segundo o item 3.14 foram selecionados para três espécies de *Eucalyptus* seguindo-se a metodologia descrita no item 3.15. O isolado AT 506 foi eliminado do experimento porque houve contaminação do inoculante. A Tabela 15 apresenta a porcentagem de plantas micorrizadas e a média do grau de micorrização em escalas de notas de 0 a 5 para *Eucalyptus urophylla, E. torelliana* e *E. paniculata* inoculadas com nove isolados coletados. Considerando-se um bom isolado aquele com capacidade de micorrizar mais de 80% das plantas e com um grau de micorrização acima de 3,0, foram selecionados para *Eucalyptus urophylla* e *E. paniculata* os isolados AT 501 e AT 502 e para *E. torelliana* os isolados AT 502 e AT 508.

Tabela 15. Avaliação do grau de micorrização de três espécies de *Eucalyptus*, inoculadas com 9 isolados de *Pisolithus tinctorius*.

	Espécies de *Eucalyptus*					
	E. urophylla		*E. torelliana*		*E. paniculata*	
	% de plantas micor.	Grau micorriz.*	% de plantas micor.	Grau micorriz.*	% de plantas micor.	Grau micorriz.*
AT 501	91,67	3,5	72,73	3,06	100	3,36
AT 502	91,67	3,5	95,65	3,27	82,60	3,05
AT 503	75,00	2,83	68,18	2,00	33,33	2,00
AT 504	29,16	2,28	29,16	1,71	27,27	1,66
AT 505	47,82	2,63	31,82	1,42	45,83	1,63
AT 507	62,50	2,6	65,21	2,60	78,26	3,00
AT 508	87,50	2,78	86,66	3,38	68,75	2,18
AT 509	58,33	2,5	60,86	2,21	58,33	2,07
AT 510	41,66	2,10	45,83	2,36	45,83	1,54

* Média de 24 plantas

Para os isolados AT 504, AT 505 e AT 510 houve grande falha na micorrização - mais de 50% das plantas não apresentavam micorrizas.

É provável que o insucesso foi devido à inadequabilidade da metodologia empregada.

A formação de micorriza pode ter sido afetada por inúmeros fatores não testados anteriormente, incluindo a qualidade do inóculo.

É preciso que o inóculo vegetativo de um fungo sobreviva às manipulações, como: lavagem, secagem e sua incorporação no substrato. Além disso, o inóculo deve sobreviver de 4 a 6 semanas entre a inoculação e a produção de raízes curtas pelas plantas.

Torna-se necessário conduzir novos ensaios para testar a qualidade do inóculo e influência de fatores externos que possam estar afetando a eficiência dos isolados.

4.9. Avaliação do grau de micorrização de mudas de *Eucalyptus urophylla* provenientes de semeio direto e plântulas, inoculadas com isolados de *Pisolithus tinctorius*

Com o intuito de solucionar o problema de falha na micorrização de mudas produzidas a partir de sementes, foram testadas a inoculação de plântulas para produção de mudas micorrizadas, seguindo-se a metodologia des-

crita no item 3.16. A Tabela 5 do Apêndice apresenta a avaliação em escala de notas de 0 a 5 do grau de micorrização de mudas provenientes de sementes e de plântulas inoculadas com os isolados AT 502, AT 503, AT 505, AT 507, AT 509 e AT 510. Os valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância, estão apresentados na Tabela 16. As Tabelas 17 e 18 mostram a comparação das médias pelo teste de Tukey a 5 e 1% de significância de isolados e comparação das médias de isolados dentro de sementes e plântulas do fator "fases de inoculação" respectivamente, enquanto que a comparação das médias pelo teste de Tukey a nível de 5 e 1% de significância de fases de inoculação e comparação das médias de fases de inoculação dentro de cada isolado estão apresentados nas Tabelas 19 e 20.

Tabela 16. Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância dos dados do grau de micorrização de mudas de *Eucalyptus* provenientes de semeio direto e plântulas com isolados de *P. tinctorius*.

C.V.	GL	Q.M.	F
Isolados	6	3,8640	5,7689**
Fases de inoc.	1	91,8304	137,0981**
Isol. x Fases inoc.	6	3,7330	5,5732**
Resíduo	210	0,6698	
Total	223		

Média geral = 1,7661
Coeficiente de Variação = 46,340%

Tabela 17. Comparação das médias (grau de micorrização) de isolados de *Pisolithus tinctorius* pelo teste de Tukey.

Isolados	Médias	5%	1%
AT 502	2,4163	a	A
AT 503	1,9723	ab	AB
AT 505	1,7409	bc	AB
AT 507	1,7145	bc	AB
AT 509	1,6033	bc	B
AT 510	1,5978	bc	B
AT 504	1,3176	c	B

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.
DMS 5% = 0,6043 DMS 1% = 0,7077

Tabela 18. Comparação das médias (grau de micorrização) de isolados dentro de sementes e plântulas do fator fases de inoculação.

Isolados	Fases de inoculação	
	Sementes	Plântulas
AT 502	2,3167 A	2,5158 A
AT 503	1,4697 AB	2,4748 A
AT 504	0,1250 C	1,5102 A
AT 505	0,9424 BC	2,5394 A
AT 507	1,2817 B	2,1472 A
AT 509	0,8738 BC	2,3329 A
AT 510	0,8713 BC	2,3243 A

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.
DMS (1%) = 1,0009

Tabela 19. Comparação das médias (grau de micorrização) de fases de inoculação pelo teste de Tukey.

Fases de inoculação	Médias	5%	1%
Plântulas	2,4064	a	A
Semente	1,1258	b	B

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

DMS 5% = 0,2144 DMS 1% = 0,2819

Tabela 20. Comparação das médias (grau de micorrização) de sementes e plântulas do fator fases de inoculação dentro de cada isolado.

Isolados	Fases de inoculação	
	Sementes	Plântulas
AT 502	2,3167 A	2,5158 A
AT 503	1,4697 B	2,4748 A
AT 504	0,1250 B	2,5102 A
AT 505	0,9424 B	2,5394 A
AT 507	1,2817 B	2,1472 A
AT 509	0,8738 B	2,3229 A
AT 510	0,8713 B	2,3243 A

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

DMS (1%) = 0,7459

Os resultados mostram que as plantas de *E. urophylla* provenientes de plântulas, praticamente não apresentaram falhas na micorrização, além de apresentarem um grau de micorrização maior do que as provenientes de semeio direto para todos os isolados testados (Tabela 5 do Apêndice). Para alguns isolados essa diferença foi mais evidente, como é o caso do isolado AT 504, pois somente duas das dezesseis plantas formaram micorrizas quando proveniente de semeio direto.

A análise de variância (Tabela 16) mostra que houveram diferenças significativas (a nível de 1% e 5% de probabilidade) para o fator isolado e para as fases de inoculação quanto ao grau de micorrização.

Um aspecto que se destaca foi o alto coeficiente de variação 46,34% encontrado na análise estatística dos resultados. Esse problema resultou da grande variação do grau de micorrização verificado entre as repetições de um mesmo tratamento.

Pelo teste de Tukey para comparação de médias dos isolados podemos verificar que o isolado AT 502 apresentou a maior média quanto ao grau de micorrização, embora não diferisse de AT 503, AT 505 e AT 507, como mostra a Tabela 17.

Quando a fase de inoculação é semente, verificamos pelo teste de Tukey, que há diferença estatisticamente significativa entre os isolados. A Tabela 18 mostra

novamente que os isolados AT 502 e AT 503 foram os melhores com 2,31 e 1,46 de média de grau de micorrização respectivamente. Os isolados AT 503 e AT 507 diferem de AT 504 que foi o pior isolado, embora não diferisse de AT 510, AT 509 e AT 505 a 1% de significância. Quando a fase de inoculação é plântula, todos os isolados apresentaram médias altas quanto ao grau de micorrização e não apresentaram diferenças estatisticamente significativas a nível de 1% (Tabela 18).

A Tabela 19 mostra a comparação das médias pelo teste de Tukey das duas fases de inoculação testadas: sementes e plântulas. Podemos verificar que há diferença estatisticamente significativa a nível de 5 e 1% entre as duas fases. Notadamente a fase de plântulas foi a melhor, apresentando cerca do dobro da média de grau de micorrização (2,40) em relação a sementes (1,12).

Todos os isolados, com exceção ao AT 502, apresentaram diferenças significativas ao nível de 5 e 1% para as fases de inoculação (Tabela 20). A fase de plântulas do fator "fases de inoculação" para todos os isolados é a que apresentou maior média quanto ao grau de micorrização. Somente para o isolado AT 502 o teste de Tukey para comparação de médias não apresentou diferença significativa ao nível de 5 e 1% entre as duas fases testadas (Tabela 20).

Podemos verificar que com a utilização de

plântulas obtemos um resultado melhor, praticamente eliminando o problema de falha na micorrização de mudas.

Segundo LAPEYRIE & BRUCHET (1985) o primeiro requerimento para a inoculação artificial é um inóculo bem crescido de uma forma que possa ser usado para dispersar o fungo ativo inteiramente no novo meio e realizar contato com o sistema radicular da planta. No inoculante preparado segundo o item 3.16.1, as hifas cobriam as partícuclas de vermiculita; no entanto, nos tubetes as hifas externas expostas ao substrato, talvez não tenham sobrevivido o período entre a inoculação e o desenvolvimento de raízes curtas. Durante este período as partículas de vermiculita provêm um nicho protetor para o micélio desprotegido (MOLINA & TRAPPE, 1982). Segundo MARX et alii (1982), as hifas internas às partículas de vermiculita protegidas é que são responsáveis pela efetividade do inóculo.

Isto pode explicar o maior grau de micorrização quando utilizamos plântulas para produção de mudas. As hifas externas colonizaram as raízes curtas já pré-formadas das plântulas.

Para a utilização de sementes, as partículas de vermiculitas devem estar internamente tomadas pelas hifas que ficam protegidas até a formação de raízes curtas. No inoculante utilizado, talvez poucas partículas de vermiculita estivessem internamente tomadas pelas hifas; por essa

razão ocorreram falhas na micorrização das plantas provenientes de sementes.

O isolado AT 502 mostrou-se mais resistente, pois não houveram diferenças na micorrização de plantas provenientes de sementes e plântulas, confirmando os resultados anteriormente obtidos com três espécies de *Eucalyptus*, onde obtivemos altas percentagens de plantas micorrizadas com este isolado (Tabela 15).

A desvantagem do uso de plântulas para obtenção de plantas micorrizadas é que estas exigem um maior cuidado durante os primeiros sete dias após o transplante. Durante este período as plântulas são muito sensíveis e exigem cuidados especiais, como um rigoroso controle de umidade e temperatura. Para fins práticos isto não seria viável. Segundo MORO et alii (1988) a produção de mudas de *Eucalyptus* vêm sofrendo grandes avanços técnicos nos últimos anos, visando automatização de todas as etapas, inclusive do semeio; sendo assim, sugere-se para futuros trabalhos, a utilização de partículas de vermiculitas maiores para que as hifas cresçam internamente às partículas ou o desenvolvimento de outras técnicas para produção de inoculante em que as hifas fiquem protegidas.

4.10. Avaliação da produção de inoculante de um isolado de *Pisolithus tinctorius* em diferentes substratos

Após os isolados serem testados em diferentes

meios de cultura quanto ao crescimento e produção de biomassa (segundo os ítens 3.8 e 3.9 respectivamente), foi selecionado o isolado PI 314 que apresentou um desenvolvimento normal das colônias em todos os meios e não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os meios, quanto à produção de massa micelial (Tabela 22). Este isolado foi testado quanto à produção de inoculante em substratos preparados com os diferentes meios anteriormente testados, segundo o item 3.17. Os resultados do crescimento do fungo nestes substratos estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Crescimento do isolado PI 314 em diferentes substratos.

Substratos	PI 314					
	RI	RII	RIII	RIV	RV	RVI
Subst. MMN	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Subst. BDA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Subst. BDA-D	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Subst. BDMT	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SUbst. MMNB	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Legenda: +++ abundante; ++ regular; + escassa; - ausência

O isolado PI 314 cresceu bem em todos os substratos, podendo o inoculante deste isolado ser produzido em qualquer um destes substratos testados.

Propõe-se que seja realizado outro ensaio para testar a efetividade destes inoculantes visto que os meios utilizados talvez afetem a qualidade do inóculo.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

a) Nenhum meio testado se apresentou melhor que o meio MNM para o cultivo do fungo, mas para os isolados AC12, PI314 e PI203 o crescimento nos meios MNMB, BDA, BDA-D e BDMT foi igual ao obtido no meio MNM.

b) Os isolados PI 203 e PI 314 não apresentaram diferenças entre os meios testados para a produção de biomassa.

c) Cada célula micelial possui dois núcleos com um tamanho médio de 2,439 μ.

d) Os eventos da divisão mitótica em células miceliais se mostraram similares a de alguns fungos filamentosos em que ocorrem agregação dos cromossomos formando barras paralelas. O número de cromossomos não pode ser determinado.

e) Os isolados Pt 185, FEP 2, FEP 3, Pt *taeda*, FEP 5, obtidos de *Pinus* apresentaram o mesmo perfil eletroforético para esterases.

f) A melhor produção de protoplastos do isolado FEP3 de *Pisolithus tinctorius* é obtida utilizando-se micélio de quatro dias de idade, com a enzima lítica Novozyme 234 e manitol 0,6 M como estabilizador osmótico.

g) Dos isolados coletados, o AT 501 e AT 502 são os melhores para a síntese de micorriza em *Eucalyptus urophylla* e *E. paniculata*. Já para *E. torelliana* os melhores isolados foram AT 502 e AT 508.

h) O problema de falha na micorrização de plantas provenientes de sementes pode ser solucionado se utilizarmos plântulas no lugar de sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIST, J.R. & C.L. WILSON. A study of asexual nuclear division in *Ceratocystis fagacearum* with phase-contrast microscopy. **Phytopathology.** Lancaster, **56**: 869, 1966.

AIST, J.R. & C.L. WILSON. Chromosome behavior during vegetative nuclear division in *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology.** Lancaster, **57**: 801, 1967a.

AIST, J.,R. & C.L. WILSON. Nuclear behavior in the vegetative hyphae of *Ceratocystis fagacearum*. **American Journal Botany**, New York, **54**(1): 99-104, 1967b.

BARROS, N.F.; R.M. BRANDI; M.S. REIS. Micorriza em eucalipto. **Revista Árvore,** Viçosa, 2(2): 130-40, 1978.

BACHMANN, B.J. & D.M. BONNER. Protoplasts from *Neurospora crassa*. **Journal of Bacteriology.** Baltimore, **78**: 550-6, 1959.

BAKERSPIGEL, A. The structure and mode of division of the nuclei in the vegetative spores and hyphae of *Endogone sphagnophila* ATK. **American Journal of Botany.** New York, **45**: 404-10, 1958.

BAKERSPIGEL, A. The structure and manner of division of the nuclei in the vegetative mycelium of the basidiomycete *Schizophyllum commune*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **37**: 835-47, 1959.

BARRET, V.; P.A. LEMKE; R.K. DIXON. Protoplast formation from selected species of ectomycorrhizal fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, **30**: 381-87, 1989.

BORGES, M.I. Técnicas de protoplastização e isolamento de DNA de alto peso molecular de *Aspergillus niger*. Campinas, 1987. 112p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).

BRADLEY, R.; A.J. BURT; D.J. READ. Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. **Nature**, London, **292**: 335-7, 1981.

BRADLEY, R.; A.J. BURT; D.J. READ. The biology of mycorrhiza in the ericaceae. VIII. The role of mycorrhizal infection in heavy metal resistance. **New Phytopathologist**, London, **91**: 197-209, 1982.

BRUSHABER, J.A. & S.F. JENKINS JUNIOR. Mitosis and clamp formation in the fungus *Poris monticola*. **American Journal of Botany**, New York, **58**(1): 273-80, 1971.

BURNETT, J.H. Fundamentals of Mycology. London, Edward Arnold Publishers Limited, 1976. 673p.

DAVIS, B. Factors influencing protoplast isolation. In: **Fungal Protoplasts**. J.F. PEBERDY e L. FERENCZY (Eds.). New York, 1985. p.45-71.

DIXON, R.K. & C.A. BUSCHENA. Response of ectomycorrhizal *Pinus banksiana* e *Picea glauca* to heavy metals in soil. **Plant and Soil**, Hague, **105**: 265-71, 1981.

EMERSON, S. & M.R. EMERSON. Production, reproduction and reversion of protoplasts-like structures in the osmotic strain of *Neurospora crassa*. **Proceedings of National Academy of Science**, Washington, **44**: 663-71, 1958.

FINCHAM, J.R.S.; P.R. DAY; A. RADFORD. Fungal genetics. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1979. 636p.

FULLER, M.S. Mitosis in fungi. **International Review of Cytology**. New York, **45**: 113-53, 1976.

FURLANETO, M.C. Recombinação genética e produção de celulases em *Trichoderma pseudokoningii* var. rifai. Piracicaba, 1989. 152p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

FURLANI, P.R. & L.G. HANNA. Avaliação da tolerância de plantas de arroz e milho ao alumínio em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Campinas, **8**(2): 205-8, 1984.

GILDON, A. & P.B. TINKER. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. I. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytologist**, London, **95**: 247-61, 1983.

GILES, K.L. & H. WHITEHEAD. Uptake and continued activity of *Azotobacter* within fungal protoplasts. **Science**, Washington, **193**: 1125-6, 1976.

GOLD, M.H.; T.M. CHENG; M. ALIC. Formation, fusion, and regeneration of protoplasts from wild-type and auxotrophic strains of the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, **46**: 260-3, 1983.

HACSKAYLO, E. Pure culture syntesis of pine mycorrhizae in terra-lite. **Mycologia**, Lancaster, **45**: 971-5, 1953.

HACSKAYLO, E. **Mycorrhizae**. Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office, 1971. 255p.

HAMLYN, P.F.; R.E. BRADSHAW; F.M. MELLON; C.M. SANTIAGO; J.M. WILSON; J.F. PEBERDY. Efficient protoplast isolation from fungi using comercial enzymes. **Enzyme and Microbial Tecnology**, Guildford, **3**: 321-5, 1981.

HEATH, I.B. Fungal mitosis, the significance of variations on a theme. **Mycologia**. New York, **72**: 229-250, 1980a.

HEATH, I.B. Variant mitosis in lower eukaryotes: indicators of the evolution of mitosis? **International Review Cytology**. New York, **64**: 1-80, 1980b.

HÉBRAUD, M. & M. FÈVRE. Protoplast production and regenetion from mycorrhizal fungi and their use for isolation of mutants. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, **34**: 157-61, 1988.

HOGBERG, P. Mycorrhizal association in some woodland and forest trees and shrubs in Tanzania. **New Phytologist**, London, **92**: 407-15, 1982.

HUNG, L.L. & R. MOLINA. Temperature and time in storage influence the efficacy of selected isolates of fungi in commercially produced ectomycorrhizal inoculum. **Forest Science**, Washington, **32**(2): 534-45, 1979.

ICHIDA, A.A. & M.S. FULLER. Ultrastucture of mitosis in the aquatic fungus *Catenaria anguillulae*. **Mycologia.** New York, **60**: 141-55, 1968.

JACKSON, R.M. & P.A. MASON. **Mycorrhiza.** London, Edward Arnold, 1984. 59p.

KIGUCHI, T. & S.O. YANAGI. Intraspecific heterokoryon and fruit body formation in *Coprinus macrorhizus* by protoplast fusion of auxotrophic mutants. **Applied Microbiol. Biotechnology**, Berlin, **22**: 121-27, 1985.

KILLHAN, K. & M.K. FIRESTONE. Vesicular arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal depositions. **Plant and Soil**, Hague,. **72**: 39-48, 1983.

KNOX-DAVIES, P.S. Mitosis and aneuploidy in the vegetative hyphae of *Macrophomina phaseoli*. **American Journal of Botany.** New York, **54**(10): 1290, 1967.

KROPP, B.R. & J.A. FORTIN. Formation and regeneration of protoplasts from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, **64**: 1224-6, 1986.

KRÜGNER, T.L. & M. TOMAZELLO FILHO. Tecnologia de inoculação micorrízica em viveiro de *Pinus* sp. **Circular Técnica, 6.** Piracicaba, IPEF, 1979. 6p.

LAPEYRIE, F.F. & G. BRUCHET. Some factors influencing viability of ectomycorrhizal fungal inoculum. **New Phytologist**, London, **100**: 585-93, 1985.

MAGAE, Y.; Y. KASHIWAGI; M. SENDA; T. SASAKI. Eletrofusion of giant protoplasts of *Pleurotus cornucopiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, **24**: 509-11, 1986.

MARTIN JUNIOR, R.W. & C.W. MILLER. Ultrastructure of mitosis in the endoparasite *Olpidiopsis varians*. **Mycologia**. New York, **78**(1): 11-21, 1986.

MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. 1. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, **59** 153-63, 1969.

MARX, D.H. Three host rang and wored distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, **23**: 217-23, 1977.

MARX, D.H. & W.C. BRYAN. Pure culture synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on different conifer hosts. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **48**: 639-43, 1969.

MARX, D.H.; J.L. RUEHLE; D.S. KENNEY; C.E. CORDELL; J.W. RIFFLE; R.J. MOLINA; W.H. PAWUK; S. NAVRATIL; R.W. TINUS; D.C. GOODWIN. Comercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for develoment of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. **Forest Science**, Washington, **28**: 373-400, 1982.

McQUATTIER, C.J. & SCHIER, G.A. Response of red spruce seedlings to aluminum toxicity in nutrient solution: alterations in root anatomy. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, **20**(7): 1001-11, 1990.

MELO, I.S.; A.P.D. SILVEIRA; A.M. MALUF. Efeito do alumínio e de *Glomus leptotichum* Schenk e Smith no desenvolvimento de cultivares de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit tolerante e intolerantes ao alumínio. **Anais da ESALQ**, Piracicaba, **XLIV**: 1365-80, 1987.

MIKOLA, P. Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practice. In: MARX, G.C. & KOZLOWSKY, T.T. Ectomycorrhizae: their ecology and physiology. New York. Academic Press, 1973. p.383-411.

MOLINA, R. & J.G. PALMER. Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: SCHENK, N.C. Methods and Principles of Mycorrhizae Research. **The American Phytopathological Society**, Minnesota, 1982. p.115-29.

MOLINA, R. & J.M. TRAPPE. Applied aspects of ectomocorrhizae. In: RAO, N.N.S., ed. **Advances in Agricultural Microbiology**. London, Butterworth Scientific, 1982. p.305-26.

MORINAGA, T.; M. KIKUCHI; R. NOMI. Formation and regeneration of protoplasts in *Coprinus pellucidus* and *Coprinus cinereus*. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, **49**(2): 523-4, 1985.

MORO, L.; C. BRESSAM; R.A. CANEVA; G. COLLI JUNIOR; P.A. NEGRI. Viveiro contínuo de *Eucalyptus* da Champion Papel e Celulose Ltda. **Circular Técnica nº 160.** Piracicaba, 1988. 5p.

MUKHERJEE, M. & S. SENGUPTA. Mutagenesis of protoplasts and regeneration of mycelium in the mushroom *Volvariella valvacea.* **Applied Environmental Microbiology,** Baltimore, **52:** 1412-14, 1986.

MULLETTE, K.J. Studies of eucalypt micorrhizas. I. A method of mycorrhizae induction in *Eucalyptus gummifera* (Gaertn & Hochr.) by *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch. **Australian Journal of Botany.** Melbourne, **24:** 193-200, 1976.

NAMBOODIRI, A.N. & R.J. LOWRY. Vegetative nuclear division in *Neurospora.* **American Journal of Botany.** New York, **54** (6): 735-48, 1967.

NEVES, J.C.L.; N.F. BARROS; R.F. NOVAIS; J.L. ANJOS. Efeito do alumínio em amostras de dois latossolos sob cerrado sobre o crescimento e a absorção de nutrientes de mudas de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore,** Viçosa, 6(1): 17-28, 1982.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C. **Manual de técnicas eletroforéticas em microrganismos.** Piracicaba, FEALQ, 1988. 54p.

PEBERDY, J.F. Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. **Annual Review of Microbiology.** Palo ALto, **33:** 21-39, 1979.

PEBERDY, J.F. & L. FERENCZY. **Fungal protoplasts;** applications in biochemistry and genetics. New York. Marcel Dekker, 1985. v.6, 353p.

PIMENTEL GOMES, F. **Estatística Experimental.** 11a. ed. São Paulo, Nobel, 1985. 466p.

QUEIROZ, M.V. O efeito da protoplastização na instabilidade mitótica de *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1988. 136p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

RIFFLE, J.W. & D.M. MARONEK. Ectomycorrhizal inoculations procedures for greenhouse and nursery studies. In: SCHENCK, N.C. Methods and Principles of Mycorrhizae Research. **The American Phytopathological Society,** Minnesota, p.115-29, 1982.

ROBINOW, C.F. & A. BAKERSPIGEL. Somatic nuclei and forms of mitosis in fungi. In: AINSWORTH, G.C. & A.S. SUSSMAN, Eds. **The Fungi:** an advanced treatise. New York, Academic Press, 1965. p.119-42.

ROBINOW, C.F. & C.E. CATEN. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. **Journal Cell Science**, London, **5**: 403-31, 1969.

RODRIGUES, E.C. Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico *Humicola* sp. Piracicaba, 1987. 152p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

RUEHLE, J.L. & WELLS, C.G. Development of *Pisolihus tinctorius* ectomycorrhizae on container-grown pine seedlings as affected by fertility. **Forest Science,** Washington, **30**(4): 1010-16, 1984.

SAKSENA, H.K. Nuclear structure and division in the mycelium and basidiospores of *Ceratobasidium praticolum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **39**: 749-55, 1961.

SASEK, V. & V. MUSÍLEK. Growth promotion of slowly growing mycorrhizal basidiomycetes in submerged culture. In: HACSKAYLO, E. **Mycorrhizae**. Washington, Superintendent of Document N.S. Government Printing Office, 1971. 255p.

SHENCK, N.C. Methods and principles of mycorrhizal research. **The American Phytopathological Society**, Minnesota, 1982. 244p.

SOMERS, C.E.; R.P. WAGNER; T.C. HSU. Mitosis in vegetative nuclei of *Neurospora crassa*. **Genetics**, Princeton, **45**: 801-10, 1960.

TANAKA, Y. Karyological studies on variation of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cav. Tokyo, 1976. 218p. (Ph.D - Univ. Nihon).

TANAKA, Y.; N. MURATA; H. KATO. Behavior of nuclei and chromosomes during ascus development in the matting between either rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. **Annual Phytopathology Society Japan**, Tokyo, **45**: 182-91, 1979.

TOYOMASU, T.; T. MATSUMOTO; K. MORI. Interespecific protoplast fusion between *Pleurotes ostriatus* and *Pleurotus salmoneo-straminus*. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, **50**(1): 223-5, 1986.

TRAPPE, J.M. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. **Botanical Review**, Lancaster, **28**: 538-606, 1962.

TRAPPE, J.M. Selection of fungi ectomycorrhizal inoculation in nurseries. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, **15**: 203-22, 1977.

TRAPPE, J.M. & MOLINA, R. Taxonomy and genetics of mycorrhizal fungi: their interactions and relevance. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON MYCORRHIZAE, 1., Dijon, 1985. **Physiological and genetical aspects of mycorrhizal; proceedings**. Paris, Institut National de la Recherche Agronomic, 1986. p.133-45.

TURIAN, G. & E.C. CANTINO. A study of mitosis in the mold *Blastocladiella* with a ribonuclease acetoorcein staining technique. **Cytologia**, Tokyo, **25**: 101-7, 1960.

VALADARES, M.C.C. Genética e produção de exoenzimas em linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. anisopliae (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1989. 160p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

VIEIRA, R.F. Efeito de fatores edáficos associados ao cerrado no crescimento de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch em meio de cultura e na infecção micorrízica de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex. Maiden em condições controladas. Viçosa, 1984. 84p. (Mestrado - Universidade Federal de Viçosa).

VRIES, O.M.H. & J.G.H. WESSELS. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride*. **Journal of General Microbiology**, Great Britain, **73**: 13-22, 1972a.

VRIES, O.M.H. & J.G.H. WESSELS. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by combined action of purified α-1,3-glucanase and chitinase derived from *Trichoderma viride*. **Journal of General Microbiology**, Great Britain, **76**: 319-30, 1972b.

WAKABAYASHI, S.; Y. MAGAE; Y. KASHIWAGI; T. SASAKI. Formation of giant protoplasts from protoplasts of *Pleurotus cornucopiae* by the cell wall lytic enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, **21**: 328-30, 1985.

WARD, E.W.B. & K.W. CIURYSEK. Somatic mitosis in a basidiomycete. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **39**: 1497-1503, 1961.

YANAGI, S.O.; M. MONMA; T. KAWASUMI; A. HINO; M. KITO; I. TAKEBE. Conditions for isolation of and colony formation by mycelial protoplasts of *Coprinus macrorhizus*. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, **49**(1): 171-9, 1985.

YANAGI, S.O. & I. TAKEBE. An efficient method for the isolation of mycelial protoplasts from *Coprinus macrorhizus* and other basidiomycetes. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, **19**: 58-60, 1984.

YOKOMIZO, N.K.S. & T.L. KRÜGNER. *Pisolithus tinctorius* Coker et Couch e ectomicorrizas em espécies de *Eucalyptus* L'Heritier. **Silvicultura em São Paulo, 17/19**: 1-8, 1983/85.

ZAK, B. & D.H. MARX. Isolation of mycorrhizal fungi from roots of individual slash pines. **Forest Science**, Washington, **2**: 214-22, 1964.

ZAMBOLIM, L. & J.O. SIQUEIRA. Associações micorrízicas das plantas superiores. **Informe Agropecuário.** Belo Horizonte, **11**(122): 77-81, 1985.

ZAMBOLIM, L. & SIQUEIRA, I.O. Importância e potencial das associações micorrízicas para a agricultura. Belo Horizonte. EPAMIG, 1985. 36p. (EPAMIG. Série Documentos, 26).

APÊNDICE

Tabela 1. Medidas (cm) de diâmetros das colônias em placas contendo diferentes meios de cultura, dos isolados AC1, AC3, AC6, AC8, AC12, PI203, PI312, PI314, PI316, ITA6, ITA11, Pt 185 e Pt *taeda*.

			RI	RII	RIII	RIV
		D1	2,45	1,95	2,50	2,15
		D2	4,00	3,90	3,90	3,65
	MNM	D3	5,45	5,20	5,10	5,05
		D4	6,75	6,45	6,45	6,30
		D5	7,50	7,20	7,15	7,00
		D6	8,25	7,80	7,90	7,70
		D1	2,10	2,10	2,15	1,60
		D2	3,35	3,40	3,40	2,90
	MNMB	D3	4,35	4,00	4,10	3,85
		D4	5,45	4,65	4,65	4,85
		D5	6,35	5,20	5,10	5,35
		D6	6,85	5,60	5,60	5,85
		D1	2,05	2,15	2,05	2,10
		D2	3,10	3,25	3,10	3,15
AC1	BDA	D3	3,50	3,80	3,70	3,75
		D4	4,35	4,65	4,55	4,60
		D5	4,85	5,20	5,15	5,10
		D6	5,35	5,65	5,60	5,60
		D1	2,65	2,40	2,35	2,85
		D2	3,60	3,25	3,25	3,75
	BDA-D	D3	4,30	3,95	3,90	4,40
		D4	5,00	4,60	4,75	5,20
		D5	5,60	5,20	5,25	5,70
		D6	6,10	5,70	5,75	6,15
		D1	2,30	1,80	1,95	2,20
		D2	3,60	2,90	3,05	3,35
	BDMT	D3	4,20	3,75	4,05	4,25
		D4	5,00	4,80	5,10	5,20
		D5	5,50	5,50	5,80	6,00
		D6	6,00	6,10	6,40	6,50

D = Diâmetro
R = Repetições

Continua

Tabela 1. Continução.

			RI	RII	RIII	RIV
		D1	3,30	3,10	2,90	2,75
		D2	4,30	4,20	3,90	4,00
	MNM	D3	5,30	5,25	5,00	5,20
		D4	5,90	6,20	5,95	5,90
		D5	6,30	6,65	6,30	6,25
		D6	6,50	6,90	6,55	6,50
		D1	2,80	2,40	2,35	2,70
		D2	3,40	2,90	3,00	3,45
	MNMB	D3	4,10	3,50	3,60	4,05
		D4	4,75	4,20	4,15	4,70
		D5	5,30	4,65	4,75	5,20
		D6	5,50	5,00	5,05	5,55
		D1	2,90	2,80	2,85	2,70
		D2	3,70	3,60	3,70	3,50
AC3	BDA	D3	4,50	4,40	4,70	4,30
		D4	5,20	5,10	6,00	5,00
		D5	5,80	5,55	6,75	5,50
		D6	6,10	6,00	7,35	5,95
		D1	2,85	2,75	2,85	2,80
		D2	3,60	3,60	3,60	3,60
	BDA-D	D3	4,35	4,35	4,45	4,20
		D4	5,10	5,10	5,25	4,95
		D5	5,60	5,60	5,75	5,45
		D6	5,90	6,00	6,15	5,80
		D1	2,60	2,50	2,25	2,10
		D2	3,30	3,25	2,95	2,75
	BDMT	D3	4,00	4,05	3,60	3,40
		D4	4,65	4,70	4,25	4,10
		D5	5,15	5,20	4,65	4,50
		D6	5,50	5,50	4,95	4,85

Continua

Tabela 1. Continuação.

			RI	RII	RII	RIV
		D1	3,05	3,10	3,10	3,30
		D2	3,95	4,00	4,00	4,20
	MNM	D3	4,65	4,70	4,70	4,90
		D4	5,95	6,05	6,00	6,15
		D5	6,80	7,00	7,10	7,10
		D6	7,50	7,55	7,70	7,70
		D1	3,05	3,25	3,25	3,00
		D2	3,85	4,00	4,05	3,80
	MNMB	D3	4,30	4,50	4,60	4,25
		D4	5,20	5,35	5,50	5,10
		D5	6,00	6,05	6,35	5,85
		D6	6,65	6,70	7,00	6,50
		D1	3,80	3,75	3,95	4,05
		D2	4,50	4,50	4,65	4,75
AC6	BDA	D3	5,20	5,40	5,15	5,35
		D4	6,05	6,55	6,05	6,40
		D5	6,80	7,40	6,80	7,15
		D6	7,40	8,00	7,45	7,85
		D1	3,90	3,80	4,10	3,75
		D2	4,60	4,50	4,80	4,45
	BDA-D	D3	5,15	5,10	5,50	4,95
		D4	6,00	6,05	6,50	6,00
		D5	6,65	6,70	7,30	6,65
		D6	7,25	7,45	8,10	7,35
		D1	3,15	2,80	2,90	3,05
		D2	3,95	3,60	3,70	3,85
	BDMT	D3	4,45	4,10	4,20	4,35
		D4	5,40	5,05	5,05	5,20
		D5	6,10	5,85	6,85	6,00
		D6	6,90	6,55	6,40	6,60

Continua

Tabela 1. Continuação.

			RI	RII	RIII	RIV
		D1	2,95	2,75	2,75	2,75
		D2	3,55	3,35	3,35	3,35
	MNM	D3	3,95	3,70	3,90	3,80
		D4	4,80	4,30	4,90	4,60
		D5	5,35	5,00	5,50	5,10
		D6	5,80	5,45	6,00	5,70
		D1	2,40	2,50	2,35	2,15
		D2	3,00	3,10	2,95	2,75
	MNMB	D3	3,40	3,40	3,35	3,15
		D4	4,05	4,10	4,05	4,05
		D5	4,60	4,55	4,45	4,85
		D6	5,15	5,00	4,95	5,40
		D1	2,30	2,35	2,20	2,50
		D2	3,00	3,05	2,90	3,20
AC8	BDA	D3	3,20	3,40	3,20	3,60
		D4	3,90	4,20	4,00	4,20
		D5	4,55	4,95	4,70	4,90
		D6	5,40	5,65	5,35	5,75
		D1	2,20	2,10	2,10	2,10
		D2	2,90	2,80	2,80	2,80
	BDA-D	D3	3,30	3,20	3,20	3,20
		D4	4,20	4,00	4,00	4,00
		D5	4,95	4,70	4,70	4,70
		D6	5,40	5,30	5,30	5,40
		D1	2,00	2,00	1,95	1,80
		D2	2,60	2,60	2,55	2,40
	BDMT	D3	2,80	2,95	2,80	2,80
		D4	3,35	3,70	3,55	3,50
		D5	3,80	4,35	4,15	4,20
		D6	4,40	4,90	4,75	4,85

Continua

Tabela 1. Continuação.

			RI	RII	RIII	RIV
		D1	3,00	3,00	3,05	3,30
		D2	4,05	4,00	3,80	4,20
	MNM	D3	5,05	5,10	4,55	5,15
		D4	6,40	6,45	5,80	6,75
		D5	7,55	7,55	6,70	7,80
		D6	8,35	8,15	7,50	8,55
		D1	3,60	3,55	3,60	3,70
		D2	5,05	4,90	4,90	5,10
	MNMB	D3	6,55	6,00	6,20	6,50
		D4	8,10	7,50	7,85	7,90
		D5	8,60	8,65	9,00	9,00
		D6	8,55	9,00	9,00	9,00
		D1	3,80	3,65	3,70	3,85
		D2	5,20	5,00	5,00	5,10
AC 12	BDA	D3	6,55	6,40	6,40	6,40
		D4	7,80	7,75	7,80	7,80
		D5	8,35	8,45	9,00	9,00
		D6	8,50	8,80	9,00	9,00
		D1	3,60	3,65	3,50	3,40
		D2	5,20	5,10	5,00	4,90
	BDA-D	D3	6,75	6,75	6,50	6,50
		D4	8,65	8,15	8,05	7,95
		D5	9,00	8,55	8,50	8,75
		D6	9,00	8,70	8,50	9,00
		D1	3,70	3,45	3,45	3,40
		D2	4,90	4,70	4,65	4,70
	BDMT	D3	6,10	6,00	6,00	6,00
		D4	7,40	7,35	7,45	7,20
		D5	8,10	8,20	8,05	7,65
		D6	8,35	8,85	8,10	7,85

Continua

Tabela 1. Continuação.

			RI	RII	RIII	RIV
		D1	2,20	2,40	2,15	2,35
		D2	3,65	3,90	4,30	4,00
	MNM	D3	5,20	5,55	5,95	5,65
		D4	7,10	7,55	8,10	7,70
		D5	8,70	9,00	9,00	9,00
		D6	9,00	9,00	9,00	9,00
		D1	2,05	1,95	2,05	1,75
		D2	3,60	3,20	3,55	3,25
	MNMB	D3	5,10	4,40	4,95	4,80
		D4	6,80	5,65	6,35	6,50
		D5	8,10	6,60	7,00	7,75
		D6	8,90	7,55	7,35	8,75
		D1	1,80	2,20	2,15	2,15
		D2	3,50	3,95	4,00	3,85
PI203	BDA	D3	5,10	5,35	5,55	5,35
		D4	6,75	6,85	7,25	7,05
		D5	8,05	7,75	8,35	8,25
		D6	9,00	8,85	8,90	9,00
		D1	2,70	2,40	2,20	2,40
		D2	4,60	4,25	4,10	4,20
	BDA-D	D3	6,15	5,90	5,70	5,75
		D4	7,85	7,50	7,20	7,40
		D5	9,00	8,35	8,20	8,85
		D6	9,00	9,00	8,70	9,00
		D1	1,90	1,85	2,00	1,70
		D2	3,10	2,90	3,15	2,80
	BDMT	D3	4,15	3,90	4,25	3,65
		D4	5,30	4,95	5,45	4,70
		D5	6,00	5,70	6,15	5,40
		D6	6,90	6,35	6,85	6,15

Continua

Tabela 1. Continuação.

			RI	RII	RIII	RIV
		D1	3,25	3,10	3,00	3,10
		D2	4,10	3,95	3,80	3,95
	MNM	D3	5,95	5,70	5,40	5,65
		D4	7,05	6,75	6,45	6,70
		D5	7,95	7,60	7,20	7,50
		D6	9,00	9,00	8,80	9,00
		D1	2,60	2,50	2,65	2,60
		D2	3,20	3,05	3,25	3,20
	MNMB	D3	4,40	4,10	4,30	4,15
		D4	5,10	4,60	4,90	4,85
		D5	5,65	5,10	5,45	5,35
		D6	6,65	6,00	6,45	6,15
		D1	2,55	2,80	2,65	2,50
		D2	3,25	3,30	3,10	3,15
PI312	BDA	D3	4,10	4,30	4,15	4,10
		D4	4,80	4,95	4,80	4,80
		D5	5,30	5,60	5,40	5,30
		D6	6,40	6,65	6,35	6,40
		D1	2,55	2,70	2,65	2,90
		D2	3,05	3,30	3,20	3,35
	BDA-D	D3	4,00	4,35	4,10	4,30
		D4	4,55	5,00	4,80	5,00
		D5	5,10	5,60	5,30	5,50
		D6	6,05	6,55	6,30	6,40
		D1	2,50	2,70	2,45	2,50
		D2	3,20	3,30	3,20	3,15
	BDMT	D3	4,50	4,45	4,40	4,20
		D4	5,20	5,20	5,10	4,90
		D5	6,00	6,00	5,90	5,50
		D6	7,25	7,10	6,80	6,45

Continua

Tabela 1. Continuação.

			RI	RII	RIII	RIV
		D1	2,55	2,80	2,95	2,85
		D2	4,05	4,50	4,65	4,45
	MNM	D3	5,40	6,00	6,05	6,10
		D4	7,00	7,55	7,60	7,80
		D5	8,10	8,65	8,75	9,00
		D6	8,75	9,00	9,00	9,00
		D1	3,20	2,95	2,95	3,05
		D2	4,65	4,25	4,30	4,40
	MNMB	D3	5,70	5,15	5,20	5,35
		D4	6,70	6,30	6,25	6,45
		D5	7,55	7,15	7,10	7,35
		D6	8,30	7,75	7,80	8,00
		D1	3,20	3,05	3,55	2,65
		D2	4,90	4,90	4,40	4,50
PI314	BDA	D3	6,25	6,15	6,75	5,75
		D4	7,60	7,65	8,30	7,10
		D5	8,60	8,55	9,00	8,20
		D6	9,00	9,00	9,00	9,00
		D1	3,85	3,35	3,30	3,45
		D2	5,60	4,90	4,85	5,15
	BDA-D	D3	6,90	6,05	6,10	6,55
		D4	8,40	7,45	7,60	8,00
		D5	9,00	8,15	8,55	8,60
		D6	9,00	8,85	9,00	9,00
		D1	2,00	2,80	2,15	2,95
		D2	3,15	3,90	3,35	4,35
	BDMT	D3	4,00	4,80	4,30	5,30
		D4	4,90	5,85	5,25	6,25
		D5	5,65	6,40	6,00	6,90
		D6	6,25	6,96	6,60	7,40

Continua

Tabela 1. Continuação.

			RI	RII	RIII	RIV
		D1	2,40	2,30	2,20	2,40
		D2	3,60	3,50	3,40	3,45
	MNM	D3	4,40	4,20	4,05	4,15
		D4	6,00	5,90	5,65	5,65
		D5	7,20	7,20	6,95	7,00
		D6	8,40	8,55	8,70	8,25
		D1	2,40	2,45	2,10	2,40
		D2	3,10	3,15	2,80	3,10
	MNMB	D3	3,55	3,55	3,30	3,50
		D4	4,45	4,45	4,20	4,45
		D5	5,05	5,05	4,95	5,05
		D6	5,85	5,75	5,65	5,80
		D1	2,95	2,75	3,00	3,05
		D2	3,65	3,45	3,70	3,75
PI316	BDA	D3	4,30	3,95	4,15	4,30
		D4	5,45	5,10	4,90	5,00
		D5	6,25	5,95	5,60	5,70
		D6	7,00	6,80	6,75	6,80
		D1	2,70	2,60	2,60	2,90
		D2	3,60	3,50	3,50	3,80
	BDA-D	D3	4,10	4,05	4,00	4,30
		D4	5,15	5,15	5,10	5,40
		D5	6,00	6,10	6,00	6,15
		D6	6,85	6,85	6,85	7,00
		D1	2,80	2,60	2,10	2,50
		D2	3,40	3,20	2,70	3,10
	BDMT	D3	3,85	3,65	3,15	3,50
		D4	4,65	4,40	3,85	4,30
		D5	5,30	5,00	4,30	4,90
		D6	5,90	5,65	4,85	5,50

Continua

Tabela 1. Continuação.

			RI	RII	RIII	RIV
		D1	3,00	3,20	3,30	3,50
		D2	4,40	4,80	4,70	4,95
	MNM	D3	5,95	6,30	6,30	6,45
		D4	6,75	7,00	6,90	7,00
		D5	7,30	7,40	7,30	7,45
		D6	8,50	8,00	8,20	8,15
		D1	3,00	2,80	3,10	3,15
		D2	4,05	3,90	4,25	4,25
	MNMB	D3	5,30	5,20	5,60	5,55
		D4	5,80	5,80	6,25	6,15
		D5	6,25	6,30	6,80	6,75
		D6	7,20	7,60	8,00	7,50
		D1	2,90	2,80	2,85	2,85
		D2	4,40	4,30	4,25	4,20
ITA6	BDA	D3	5,65	5,65	5,60	5,60
		D4	6,25	6,20	6,20	6,25
		D5	6,85	6,90	6,80	6,85
		D6	8,15	8,20	8,10	8,00
		D1	3,20	3,00	3,05	3,00
		D2	4,40	4,30	4,40	4,15
	BDA-D	D3	5,60	5,50	5,70	5,45
		D4	6,20	6,05	6,20	5,95
		D5	6,80	6,65	6,80	6,60
		D6	7,90	7,75	8,25	7,95
		D1	2,35	2,75	3,00	2,95
		D2	3,55	3,85	4,10	4,05
	BDMT	D3	4,75	4,90	5,20	5,15
		D4	5,30	5,40	5,70	5,70
		D5	5,90	5,95	6,20	6,20
		D6	7,10	7,00	7,60	7,40

Continua

Tabela 1. Continuação.

			RI	RII	RIII	RIV
		D1	3,00	3,20	2,80	3,10
		D2	4,50	4,60	4,10	4,65
	MNM	D3	5,75	5,95	5,45	6,00
		D4	6,20	6,35	6,00	6,45
		D5	6,70	6,85	6,45	7,05
		D6	7,50	8,00	7,50	8,15
		D1	2,20	2,10	2,05	2,05
		D2	3,30	3,10	3,05	2,90
	MNMB	D3	4,40	4,30	4,10	4,05
		D4	5,00	4,80	4,70	4,65
		D5	5,55	5,40	5,40	5,30
		D6	7,10	6,85	6,95	6,80
		D1	2,05	2,30	2,40	2,30
		D2	3,00	3,30	3,25	3,15
ITA11	BDA	D3	4,05	4,40	4,35	4,15
		D4	4,70	4,90	4,90	4,75
		D5	5,35	5,50	5,50	5,25
		D6	7,25	6,95	7,05	6,65
		D1	1,95	2,40	2,10	1,90
		D2	2,90	3,35	2,90	2,90
	BDA-D	D3	4,05	4,55	4,00	3,95
		D4	4,55	5,05	4,50	4,55
		D5	5,25	5,60	5,05	5,10
		D6	6,60	7,00	6,30	6,45
		D1	2,25	2,00	2,00	2,20
		D2	3,10	3,10	2,95	3,00
	BDMT	D3	4,10	4,10	3,95	4,10
		D4	4,60	4,65	4,45	4,55
		D5	5,10	5,15	5,00	5,10
		D6	6,30	6,30	6,20	6,20

Continua

Tabela 1. Continuação.

			RI	RII	RIII	RIV
		D1	4,90	4,95	5,05	4,90
		D2	6,10	6,05	6,20	5,95
	MNM	D3	7,70	8,15	8,05	8,00
		D4	8,10	8,65	8,80	8,75
		D5	8,10	9,00	9,00	9,00
		D6	8,10	9,00	9,00	9,00
		D1	3,00	3,25	2,50	3,50
		D2	3,60	3,95	3,15	4,40
	MNMB	D3	4,10	4,75	4,05	5,50
		D4	4,45	5,35	4,55	6,50
		D5	4,70	5,85	5,10	7,30
		D6	5,40	6,60	5,85	8,20
		D1	2,45	2,30	2,40	2,30
		D2	2,80	2,70	2,85	2,75
Pt 185	BDA	D3	3,65	3,50	3,60	3,60
		D4	4,25	4,20	4,20	4,25
		D5	4,80	4,70	4,80	4,75
		D6	6,00	5,90	5,90	5,90
		D1	2,80	2,75	2,75	2,95
		D2	3,25	3,15	3,15	3,55
	BDA-D	D3	3,85	3,70	3,80	4,25
		D4	4,25	4,00	4,10	4,75
		D5	4,55	4,30	4,35	5,10
		D6	5,20	5,20	5,10	6,30
		D1	2,40	2,30	2,00	2,50
		D2	2,70	2,65	2,35	2,80
	BDMT	D3	3,50	3,50	3,15	3,50
		D4	4,00	4,05	3,80	4,10
		D5	4,60	4,60	4,30	4,60
		D6	5,70	5,70	5,30	5,75

Continua

Tabela 1. Continuação.

			RI	RII	RIII	RIV
	MNM	D1	4,30	4,15	4,00	4,20
		D2	5,00	5,00	4,90	4,95
		D3	6,30	6,25	6,10	6,15
		D4	6,80	7,15	6,80	6,90
		D5	7,35	7,75	7,45	7,50
		D6	8,05	8,50	8,20	8,50
	MNMB	D1	2,95	2,65	3,05	2,65
		D2	3,55	3,25	3,60	3,15
		D3	4,45	4,20	4,60	4,00
		D4	4,90	4,80	5,10	4,30
		D5	5,25	5,20	5,45	4,75
		D6	6,10	6,10	6,35	5,60
Pt *taeda*	BDA	D1	2,60	2,75	2,60	2,70
		D2	3,05	3,30	3,15	3,30
		D3	4,00	4,15	4,10	4,20
		D4	4,45	4,80	4,90	4,90
		D5	5,25	5,20	5,45	5,75
		D6	6,00	6,55	6,80	6,60
	BDA-D	D1	3,00	3,20	3,15	2,90
		D2	3,55	3,85	3,85	3,30
		D3	4,20	4,85	4,85	3,95
		D4	4,65	5,15	5,35	4,35
		D5	4,95	5,45	5,80	4,75
		D6	5,60	6,20	6,50	5,65
	BDMT	D1	2,80	2,80	2,70	2,50
		D2	3,25	3,15	3,15	2,95
		D3	4,00	3,90	4,15	3,60
		D4	4,60	4,45	4,85	4,30
		D5	5,05	4,95	5,50	4,90
		D6	6,20	5,85	7,00	5,90

Tabela 2. Medidas dos pesos secos de micélio (g) dos isolados AC1, AC3, AC6, AC8, AC12, PI203, PI312, PI314, PI316, ITA6, ITA11, Pt 185 e Pt *taeda* em diferentes meios de cultura após 30 dias de incubação.

Isolados	Meios	RI	RII	RIII	RIV
	MNM	0,05	0,04	0,04	0,04
	MNMB	0,13	0,14	0,14	0,13
AC1	BDA	0,08	0,10	0,11	0,09
	BDA-D	0,09	0,08	0,09	0,08
	BDMT	0,10	0,10	0,11	0,11
	MNM	0,04	0,04	0,05	0,05
	MNMB	0,12	0,16	0,11	0,41
AC3	BDA	0,10	0,09	0,09	0,10
	BDA-D	0,08	0,08	0,09	0,08
	BDMT	0,08	0,09	0,09	0,09
	MNM	0,04	0,04	0,03	0,05
	MNMB	0,12	0,12	0,14	0,13
AC6	BDA	0,08	0,08	0,10	0,10
	BDA-D	0,08	0,10	0,08	0,08
	BDMT	0,10	0,10	0,09	0,09
	MNM	0,05	0,06	0,06	0,05
	MNMB	0,13	0,13	0,13	0,13
AC8	BDA	0,12	0,12	0,12	0,11
	BDA-D	0,10	0,10	0,10	0,10
	BDMT	0,11	0,11	0,11	0,11
	MNM	0,05	0,05	0,05	0,04
	MNMB	0,09	0,13	0,10	0,12
AC12	BDA	0,09	0,09	0,09	0,10
	BDA-D	0,07	0,08	0,09	0,09
	BDMT	0,09	0,08	0,10	0,10
	MNM	0,01	0,02	0,03	0,01
	MNMB	0,06	0,04	0,04	0,04
PI203	BDA	0,02	0,02	0,02	0,03
	BDA-D	0,02	0,02	0,02	0,02
	BDMT	0,02	0,02	0,02	0,02
	MNM	0,03	0,03	0,03	0,04
	MNMB	0,09	0,05	0,11	0,09
PI312	BDA	0,08	0,08	0,08	0,08
	BDA-D	0,07	0,07	0,07	0,07
	BDMT	0,08	0,08	0,08	0,08

Continua

Tabela 2. Continuação.

Isolados	Meios	RI	RII	RIII	RIV
	MNM	0,05	0,05	0,06	0,05
	MNMB	0,07	0,05	0,05	0,08
PI314	BDA	0,05	0,04	0,04	0,04
	BDA-D	0,03	0,03	0,05	0,03
	BDMT	0,03	0,03	0,03	0,04
	MNM	0,05	0,04	0,04	0,05
	MNMB	0,09	0,09	0,10	0,10
PI316	BDA	0,08	0,07	0,08	0,07
	BDA-D	0,07	0,08	0,08	0,07
	BDMT	0,08	0,07	0,07	0,08
	MNM	0,05	0,06	0,05	0,05
	MNMB	0,13	0,13	0,13	0,13
ITA6	BDA	0,11	0,12	0,11	0,11
	BDA-D	0,11	0,11	0,11	0,11
	BDMT	0,11	0,12	0,12	0,11
	MNM	0,05	0,04	0,04	0,06
	MNMB	0,13	0,12	0,12	0,12
ITA11	BDA	0,09	0,09	0,09	0,10
	BDA-D	0,09	0,10	0,09	0,09
	BDMT	0,10	0,11	0,11	0,11
	MNM	0,07	0,07	0,07	0,06
	MNMB	0,15	0,14	0,13	0,14
Pt 185	BDA	0,20	0,21	0,20	0,17
	BDA-D	0,11	0,11	0,11	0,11
	BDMT	0,13	0,14	0,14	0,14
	MNM	0,06	0,05	0,06	0,06
	MNMB	0,12	0,13	0,12	0,13
Pt *taeda*	BDA	0,17	0,19	0,18	0,18
	BDA-D	0,11	0,10	0,10	0,10
	BDMT	0,13	0,12	0,12	0,13

Tabela 3. Avaliação visual em escalas de notas de 0 a 5 da síntese de ectomicorriza em *Eucalyptus urophylla* em diferentes níveis de alumínio.

Isolados		Concentração de Al (ppm)				
		0	5	10	15	20
	R1	0	1	2	0	0
	R2	0	0	1	0	0
	R3	2	3	1	1	0
	R4	1	0	2	0	0
	R5	2	1	0	0	1
	R6	2	0	1	0	1
	R7	2	0	3	1	0
AC6	R8	1	0	1	1	1
	R9	1	0	0	1	0
	R10	0	0	1	1	1
	R11	0	1	1	2	1
	R12	0	2	1	1	0
	R13	1	0	3	1	1
	R14	1	0	1	1	1
	R15	0	1	0	1	0
	R16	1	3	1	1	1
	R1	2	2	4	2	0
	R2	1	2	4	2	1
	R3	1	1	4	2	1
	R4	1	2	3	3	0
	R5	1	1	1	1	1
	R6	1	1	1	2	1
	R7	2	0	1	1	2
AC8	R8	1	2	3	1	0
	R9	1	1	1	2	1
	R10	1	1	1	0	0
	R11	1	1	0	2	1
	R12	2	1	1	2	0
	R13	1	1	1	3	1
	R14	3	0	2	3	2
	R15	0	1	1	1	3
	R16	1	1	1	2	1

Continua

Tabela 3. Continuação.

Isolados		Concentração de Al (ppm)				
		0	5	10	15	20
	R1	1	2	1	2	1
	R2	1	1	1	2	1
	R3	2	0	3	3	0
	R4	2	1	1	2	1
	R5	1	5	2	1	3
	R6	1	5	1	1	2
	R7	3	5	2	3	1
AC12	R8	0	1	1	1	1
	R9	3	0	2	3	1
	R10	0	2	1	4	0
	R11	1	0	3	1	1
	R12	0	1	2	1	1
	R13	2	1	3	5	1
	R14	2	1	1	1	0
	R15	0	1	5	1	1
	R16	1	1	4	2	0
	R1	3	2	2	1	2
	R2	3	2	3	1	3
	R3	0	3	5	3	1
	R4	2	1	4	1	2
	R5	3	1	2	4	0
	R6	0	4	1	2	1
	R7	3	1	1	4	3
PI314	R8	2	3	4	2	1
	R9	4	2	2	1	1
	R10	2	4	2	1	1
	R11	4	3	3	2	0
	R12	0	4	4	3	0
	R13	3	1	5	5	2
	R14	3	1	4	4	1
	R15	3	3	2	2	1
	R16	0	3	4	3	0

Tabela 4. Avaliação em escalas de notas de 0 a 10 da síntese de ectomicorriza em *Eycalyptus urophylla* em diferentes níveis de alumínio, através de coloração de raízes.

Isolados		Concentração de Al (ppm)				
		0	5	10	15	20
	RI	3	8	3	2	3
	RII	1	3	1	1	1
	RIII	2	1	3	1	1
AC6	RIV	3	2	5	8	2
	RV	7	8	6	3	1
	RVI	8	3	5	6	5
	RVII	5	4	3	3	1
	RVIII	7	1	3	2	4
	RI	5	8	1	3	3
	RII	2	5	1	2	4
	RIII	4	3	5	10	0
AC8	RIV	3	5	3	3	8
	RV	9	3	5	2	4
	RVI	7	4	3	8	5
	RVII	9	8	1	3	5
	RVIII	4	1	8	1	2
	RI	3	3	8	3	1
	RII	4	2	5	7	5
	RIII	3	3	3	5	2
AC12	RIV	1	4	1	4	3
	RV	2	1	8	4	2
	RVI	6	2	4	5	8
	RVII	9	9	3	9	1
	RVIII	1	2	3	7	1
	RI	2	6	3	8	2
	RII	2	3	7	3	5
	RIII	1	3	3	2	5
PI314	RIV	3	3	4	2	2
	RV	3	1	4	1	7
	RVI	2	7	10	4	7
	RVII	8	3	4	3	1
	RVIII	1	2	2	4	1

Dados originais não transformados. Para efeito de análise estatística pelo teste paramétrico foram transformados em 1x na potência de 0,471489.

Tabela 5. Avaliação em escalas de notas de 0 a 5 do grau de micorrização de mudas de *Eycalyptus* proveniente de semeio direto e plântulas inoculadas com isolados de *Pisolythus tinctorius*.

	AT 502		AT 503		AT 504		AT 555		AT 507		AT 509		AT 510	
	SEM	PLAN	SEM	PLAN	SEM	PLAN	SEM	PLAN	SEM	PLAN	SEM	PLAN	SEM	PLAN
R1	2	3	3	4	0	3	0	4	3	3	0	3	0	0
R2	5	4	0	5	0	4	0	2	1	1	0	4	0	3
R3	3	5	2	4	1	5	0	3	2	4	0	5	0	5
R4	4	4	1	1	0	3	2	5	0	3	3	4	0	3
R5	5	5	1	3	1	4	0	4	2	3	1	5	3	3
R6	3	2	3	4	0	4	0	3	4	4	0	2	1	4
R7	0	4	0	4	0	3	1	3	0	5	0	1	1	3
R8	5	5	0	4	0	1	1	2	2	2	2	4	0	4
R9	2	2	5	2	0	3	0	5	3	4	1	1	3	5
R10	3	3	3	5	0	5	3	2	3	2	2	4	3	3
R11	4	3	0	4	0	5	3	4	0	1	4	5	0	4
R12	3	4	5	5	0	5	0	5	5	5	2	4	3	4
R13	4	3	4	4	0	4	3	5	3	3	3	5	0	4
R14	5	4	0	4	0	3	3	5	0	2	0	2	1	4
R15	3	3	2	3	0	3	0	5	0	4	0	3	0	2
R16	3	5	4	2	0	4	4	3	0	2	0	2	3	3

Dados originais não transformados. Para efeito de análise estatística foram transformados em 1x na potência 0,7129 + 0.