**ENVOLVIMENTO DE EXSUDATOS RADICULARES,
COMPOSTOS FENÓLICOS E ENZIMAS VEGETAIS NA
COMPATIBILIDADE ENTRE ISOLADOS DO FUNGO
ECTOMICORRÍZICO *Pisolithus tinctorius* E
PLÂNTULAS DE *Eucalyptus urophylla***

MÍRIAN JOSEFINA BAPTISTA
Bióloga

Orientador: Prof. Dr. **TASSO LEO KRUGNER**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia, Área de Concentração:
Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Baptista, Mirian Josefina

Envolvimento de exsudatos radiculares, compostos fenólicos e enzimas vegetais na compatibilidade entre isolados do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* e plântulas de *Eucalyptus urophylla* / Mirian Josefina Baptista. - - Piracicaba, 2000.

115 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Composto fenólico 2. Cultivo "in vitro" 3. Enzima vegetal 4. Eucalipto 5. Fungo micorrízico 6. Plântula 7. Raiz 8. Simbiose I. Título

CDD 634.9734

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

INCLUIR

- Agradecimentos à Prof^a. Dr^a. Beatriz Appezzato-da-Glória por disponibilizar o Laboratório de Anatomia Vegetal, pela orientação e sugestões.

ERRATA

- Em todo o texto: onde se lê “Lecitinas”, leia-se “Lectinas”.
onde se lê: “ginospermas”, leia-se “gimnospermas”.
onde se lê: “genes VIR”, leia-se “genes *vir*”.
onde se lê: “genes NOD”, leia-se “genes *nod*”.
- p.24, linhas 9 e 15: onde se lê “*Fusarium oxysporum radices lycopersici*”, leia-se “*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*”..
- p.25, linha 4: onde se lê “Vögeli et al. (1998)”, leia-se “Vögeli et al. (1988)”.
- p.25, linha 11: onde se lê “Jacobs et al. (1998)”, leia-se “Jacobs et al. (1999)”.
- p. 36, linha 24: onde se lê “estratos fluorogênicos”, leia-se “substratos fluorogênicos”.
- p.60, linha 7: onde se lê “ectomicorrizas”, leia-se “endomycorrizas”.
- p. 63, título: onde se lê “*Eucalyptus Urophylla*”, leia-se “*Eucalyptus urophylla*”.

*A Hilton J. Estanislão,
pelo incansável incentivo, apoio, carinho
e pelo amor sempre presente .*

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais,

Ao Prof. Dr. Tasso Leo Krugner pela valiosa oportunidade fornecida, incentivo e orientação.

Ao Prof. Dr. Sérgio F. Pascholati por disponibilizar o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, pela orientação e sugestões na realização do trabalho e pelo incentivo.

Aos colegas José Renato Stangarlin pelo enorme auxílio na realização dos experimentos, pelas sugestões, incentivo e amizade e Kátia Schwan-Estrada pela colaboração e apoio nas fases iniciais deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica e aos funcionários do Setor de Fitopatologia, do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola.

Aos amigos Aloyséia Noronha e Luiz T. Sória pelo carinho e solidariedade.

A Deus pela presença constante, inspiração e força sempre mantidas.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	i
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Simbiose micorrízica.....	5
2.2 Especificidade e compatibilidade na simbiose micorrízica.....	7
2.3 Aspectos ultraestruturais da simbiose ectomicorrízica.....	13
2.4 Mecanismos de regulação da simbiose.....	16
2.5 Enzimas vegetais relacionadas aos mecanismos de defesa das plantas...	22
2.6 Compatibilidade entre isolados de <i>Pisolithus tinctorius</i> e a planta hospedeira.....	32
3. ATIVIDADE DAS ENZIMAS VEGETAIS β -1,3-GLUCANASE, QUITINASE E PEROXIDASE NA SIMBIOSE ENTRE DOIS ISOLADOS DE <i>Pisolithus tinctorius</i> E <i>Eucalyptus urophylla</i> IN VITRO.....	40
3.1 Resumo.....	40
3.2 Summary.....	41
3.3 Introdução.....	42
3.4 Material e métodos.....	45
3.5 Resultados e discussão.....	49
3.6 Conclusões.....	61
4. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE A INFECÇÃO ECTOMICORRÍZICA POR DOIS ISOLADOS DE <i>Pisolithus tinctorius</i> EM <i>Eucalyptus urophylla</i> IN VITRO.....	63
4.1 Resumo.....	63
4.2 Summary.....	64

4.3	Introdução.....	64
4.4	Material e métodos.....	66
4.5	Resultado e discussão.....	68
4.6	Conclusões.....	80
5.	EFEITO DE EXUDATOS E COMPOSTOS FENÓLICOS RADICULARES NO CRESCIMENTO ASSIMBIÓTICO DE DOIS ISOLADOS DE <i>Pisolithus tinctorius</i>	81
5.1	Resumo.....	81
5.2	Summary.....	82
5.3	Introdução.....	83
5.4	Material e métodos.....	86
5.5	Resultados e discussão.....	89
5.6	Conclusões.....	98
6.	CONCLUSÕES GERAIS.....	99
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
	APÊNDICE.....	112

LISTA DE FIGURAS

Página

- 3.1 Crescimento do micélio de *P. tinctorius* nas raízes de *E. urophylla* 24 horas após a inoculação. **A e B** - Pântulas inoculadas com o Isolado 185 (incompatível). Com a retirada do papel (B), verifica-se que o micélio não está aderido às raízes. **C e D** - Plântulas inoculadas com o isolado 1604 (compatível), verifica-se grande quantidade de micélio aderido às raízes e ao papel de filtro (D) (setas)..... 51
- 3.2 Quantidade de micélio de *P. tinctorius* , isolados 1604 (compatível) (□) (F=0,02) e 185 (Δ) (incompatível) (F=0,002) presente em raízes de *E. urophylla*. Testemunha (O), representada por raízes não inoculadas (F=0,43)..... 52
- 3.3 Atividade da β-1,3-glucanase em raízes de *E. urophylla* não inoculadas (O) e inoculadas com os isolados 185 (incompatível) (Δ) e 1604 (compatível) (□) de *P. tinctorius*. Valores médios, resultados de dois experimentos (A e B). Não houveram variações estatisticamente significativas, em função do tempo, de acordo com o teste F para análise de variância..... 54
- 3.4 Atividade da quitinase em raízes de *E. urophylla* inoculadas com os isolados 185 (Δ) (incompatível) e 1604 (□) (compatível) de *P. tinctorius* e em raízes não inoculadas (O). Valores médios. Não houveram variações estatisticamente significativas em função do tempo de acordo com o teste F para análise de variância..... 55
- 3.5 Atividade da quitinase em raízes de *E. urophylla* 72 horas após a inoculação. Tes-raízes não inoculadas. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente segundo o teste de Tukey (P=0,05), (F=0,012)..... 56
- 3.6 Atividade da peroxidase em raízes de *E. urophylla* inoculadas com os isolados 185 (incompatível) (Δ) e 1604 (compatível) (□) de *Pisolithus tinctorius* e em raízes não inoculadas (O), (Primeiro experimento). As

- variações em função do tempo foram estatisticamente significativas apenas para as plantas inoculadas com o isolado 1604 ($F=0,03$)..... 58
- 3.7 Atividade da peroxidase em raízes de *E. urophylla* inoculadas com os isolados 185 (Δ) (incompatível) e 1604 (compatível) ($\square$) de *Pisolithus tinctorius* e em raízes não inoculadas (O), (Segundo experimento). As variações em função do tempo foram estatisticamente significativas para as plantas inoculadas com o isolado 1604 ($F=0,02$) e 185 ($F=0,004$). As plantas não inoculadas não apresentaram alterações significativas em função do tempo..... 59
- 3.8 Atividade da peroxidase em raízes de *E. urophylla* inoculadas com os isolados 185 (incompatível) e 1604(compatível) de *P. tinctorius* e em plantas não inoculadas (Tes), 6 e 72 horas após a inoculação. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,01$). 6 horas ($F= 0,006$; $DMS=2,76$); 72 horas ($F= 0,00029$; $DMS = 1,20$)..... 60
- 4.1 Cortes transversais de raízes de *E. urophylla* não inoculadas com *P. tinctorius*, coletadas após 12 horas (A), 24 horas (B), 72 horas (C), e 96 horas (D). A, B e C, coloração com azul de astra/fuccina básica (tecidos lignificados corados em vermelho). D, coloração com azul de toluidina (tecidos lignificados e suberizados corados em azul). (A-20 X, barra = $36\mu m$; B, C, D- 40 X, barra = $18\mu m$)..... 70
- 4.2 Cortes transversais de raízes de *E. urophylla* inoculadas com o isolado 185 de *P. tinctorius* 96 horas após a inoculação. A, B- As setas indicam as hifas de *P. tinctorius*. Coloração com azul de astra/fuccina básica, (100X, barra = $7,2\mu m$), C- As setas indicam deposição de compostos fenólicos na epiderme. Coloração com azul de toluidina, (40X, barra = $18\mu m$), D-O mesmo corte de C, (100X, barra = $7,2\mu m$)..... 71
- 4.3 Cortes transversais de raízes de *E. urophylla* inoculadas com o isolado 1604 de *P. tinctorius*. Coloração com azul de astra/fuccina básica. A -

raízes 24 horas após inoculação. A seta indica a presença de hifas em torno da raiz. (40X, barra = 18 μ m), B - Raízes 72 horas após inoculação. Abundância de hifas em torno das raízes, (20X, barra = 36 μ m), C - Raízes 96 horas após a inoculação, (20X, barra = 36 μ m), D - raízes 120 horas após inoculação. Presença de penetração intercelular das hifas na epiderme (setas). (100X, barra = 7,2 μ m).....	72
4.4 Cortes transversais de raízes de <i>E. urophylla</i> . A - Raízes inoculadas com o isolado 185, 120 horas após inoculação. Observa-se grande quantidade de micélio em torno das raízes. Coloração com azul de toluidina, (40X, barra = 18 μ m), B - Raízes inoculadas com o isolado 1604 de <i>P. tinctorius</i> 120 horas após a inoculação. Presença de alterações nos pelos radiculares. Coloração com azul de astra/fuccina básica, (100X, barra = 7,2 μ m).....	73
4.5 Valores médios relativos a dosagem de compostos fenólicos em raízes de <i>E. urophylla</i> inoculadas com os isolados 185 (Δ) e 1604 ($\square$) de <i>P. tinctorius</i> e em raízes não inoculadas (O). Apenas as raízes inoculadas com o isolado 185 apresentaram alterações significativas na dosagem de compostos fenólicos totais em função do tempo (figura 4.6).....	75
4.6 Variação na concentração de compostos fenólicos totais em raízes de <i>E. urophylla</i> inoculadas com o isolado 185 de <i>P. tinctorius</i> (F=0,008).....	76
4.7 Dosagem de compostos fenólicos no período de 96 horas após a inoculação em raízes de <i>E. urophylla</i> inoculadas com os isolados 185 e 1604 de <i>P. tinctorius</i> . Raízes não inoculadas (TES). Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,01) (F=0,002).....	77
5.1 Efeito de exsudatos radiculares de <i>P. caribaea</i> (Δ) e <i>E. urophylla</i> ($\square$) sobre o crescimento micelial do isolado 185 de <i>P. tinctorius</i> em meio Pachlewsky. Testemunha (O): meio sem exsudatos radiculares.	90

- 5.2 Efeito de exsudatos radiculares de *P. caribaea* e *E. urophylla* sobre o crescimento micelial do isolado 185 de *P. tinctorius*. Testemunha (TEST), meio sem exsudatos radiculares. Avaliação aos 20 dias de incubação. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,01$) ($F=0,00001$)..... 91
- 5.3 Efeito de exsudatos radiculares de *P. caribaea* (Δ) e *E. urophylla* ($\square$) sobre o crescimento micelial do isolado 1604 de *P. tinctorius* em meio Pachlewsky. Testemunha (O): meio sem exsudatos radiculares. 92
- 5.4 Efeito de exsudatos radiculares de *P. caribaea* e *E. urophylla* sobre o crescimento micelial do isolado 1604 de *P. tinctorius* em meio Pachlewsky. Avaliação aos 40 dias de incubação. Testemunha (TEST), meio sem exsudatos radiculares. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,01$) ($F=0,01$)..... 93
- 5.5 Efeito de compostos fenólicos totais extraídos de raízes de *E. urophylla* sobre o crescimento do isolado 185 de *P. tinctorius*. Meio BDA contendo compostos fenólicos (5 $\mu\text{g/ml}$) ($\blacktriangle$), meio sem compostos fenólicos (Δ)..... 94
- 5.6 Efeito de compostos fenólicos totais (5 $\mu\text{g/ml}$) extraídos de raízes de *E. urophylla* sobre o crescimento do isolado 185 de *P. tinctorius*. TES: Testemunha sem compostos fenólicos. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,01$)..... 95
- 5.7 Efeito de compostos fenólicos totais extraídos de raízes de *E. urophylla* sobre o crescimento do isolado 1604 de *P. tinctorius*. Meio BDA contendo compostos fenólicos (5 $\mu\text{g/ml}$)(FENOL) (O), meio sem compostos fenólicos (TES) (Δ). As duas curvas são praticamente iguais. 96
- 5.8 Crescimento micelial dos isolados 185 e 1604 de *P. tinctorius* em meio agar batata dextrose (BDA) suplementado com compostos fenólicos extraídos de raízes de *E. urophylla* (5 $\mu\text{g/ml}$) (F). Controle (C), sem adição de compostos fenólicos..... 97

**ENVOLVIMENTO DE EXSUDADOS RADICULARES, COMPOSTOS
FENÓLICOS E ENZIMAS VEGETAIS NA COMPATIBILIDADE ENTRE
ISOLADOS DO FUNGO ECTOMICORRÍZICO *Pisolithus tinctorius* E
PLÂNTULAS DE *Eucalyptus urophylla*.**

Autora: Mirian Josefina Baptista

Orientador: Prof. Dr. Tasso Leo Krugner

RESUMO

A colonização das raízes pelos fungos ectomicorrízicos resulta em inúmeros benefícios para o desenvolvimento da planta hospedeira. Embora geralmente não seja observada especificidade entre os fungos ectomicorrízicos e a planta, existem diferentes graus de compatibilidade entre os simbioss. Nas interações incompatíveis, a planta reage à presença do fungo com reações semelhantes as observadas em interações com fitopatógenos. A reação da planta limita a simbiose e reduz ou elimina os benefícios da micorrização. Não se sabe ainda em que momento ocorre a determinação da incompatibilidade da interação, mas recentemente, estudos envolvendo isolados compatíveis e incompatíveis de *P. tinctorius* e *E. urophylla* têm buscado determinar os fatores necessários para o desenvolvimento de uma interação compatível. Este trabalho teve como objetivos determinar as reações de plântulas de *E. urophylla* à inoculação com dois isolados de *P. tinctorius* (isolados de eucalipto e de *Pinus*) e verificar o efeito de exsudatos e compostos fenólicos radiculares sobre o crescimento *in vitro* destes fungos. Foi analisada a atividade das enzimas vegetais relacionadas às reações de defesa da planta: β -1,3-glucanase, quitinase e peroxidase 6, 12, 24 e 72 horas após a inoculação de plântulas de *E. urophylla* com dois isolados de *P. tinctorius*: um isolado de *Pinus* (185) e um isolado de eucalipto (1604). As etapas da infecção micorrízica foram caracterizadas através de cortes anatômicos 24, 72, 96 e 120 horas após a inoculação, para verificar a ocorrência de reações estruturais de

defesa. Foi feita a dosagem de compostos fenólicos totais em cada uma destas etapas para quantificar a produção de compostos fenólicos nas raízes. Para avaliar o efeito de exsudatos radiculares sobre o crescimento dos isolados de *P. tinctorius*, plântulas de *E. urophylla* e *P. caribaea* foram crescidas em placas de petri, contendo meio de cultura por 30 dias, em seguida as plantas foram retiradas e as mesmas placas foram utilizadas para o crescimento dos isolados 185 e 1604 de *P. tinctorius*. O efeito de compostos fenólicos radiculares foi avaliado através da mistura de compostos fenólicos, extraídos de raízes de *E. urophylla*, no meio de cultura utilizado para o crescimento dos fungos.

O isolado 1604 de *P. tinctorius* iniciou a colonização das raízes 24 horas após a inoculação enquanto o isolado 185 só iniciou a colonização após 72 horas. Embora o crescimento do isolado 185 em meio de cultura seja mais rápido e vigoroso, a infecção pelo isolado 1604 foi mais rápida, confirmando sua maior compatibilidade com *E. urophylla*. Não foram observadas alterações na atividade da β -1,3-glucanase. A atividade da quitinase foi inibida nas plantas inoculadas com o isolado 1604, 72 horas após a inoculação. A atividade da peroxidase foi aumentada 6 horas após a inoculação com o isolado 1604, mas este aumento não se manteve e a atividade foi reduzida em seguida. As plantas inoculadas com o isolado 185 também apresentaram redução na atividade da peroxidase. As plantas inoculadas com o isolado 185 apresentaram um aumento na concentração de compostos fenólicos totais 96 horas após a inoculação, este aumento também não se manteve e não impediu o desenvolvimento do isolado 185 na raiz. Os exsudatos radiculares de *P. caribaea* e *E. urophylla* foram estimulantes para o crescimento assimbiótico do isolado 185 de *P. tinctorius* e o crescimento do isolado 1604 foi inibido pelos exsudatos radiculares de *P. caribaea*. No entanto, os compostos fenólicos radiculares de *E. urophylla* foram inibitórios para o crescimento do isolado 185 de *P. tinctorius* e não tiveram efeito sobre o crescimento do isolado 1604. Possivelmente os exsudatos e compostos fenólicos radiculares têm um papel importante na determinação da compatibilidade entre estes fungos e suas plantas hospedeiras. As reações

observadas no início da interação: indução da atividade de peroxidase nas plantas inoculadas com o isolado 1604 e o acúmulo de compostos fenólicos nas raízes inoculadas como isolado 185 , não se mantiveram e não impediram o desenvolvimento subsequente do fungo na raiz. Aparentemente, diversos fatores são responsáveis pela compatibilidade de *P. tinctorius* e suas plantas hospedeiras, sendo necessários maiores estudos para se determinar a importância de cada estágio da interação no desenvolvimento da simbiose.

**ROLE OF ROOT EXUDATES, PHENOLIC COMPOUNDS AND PLANT
ENZYMES IN THE COMPATIBILITY BETWEEN ISOLATES OF THE
ECTOMYCORRHIZAL FUNGUS *Pisolithus tinctorius* AND *Eucalyptus
urophylla* SEEDLINGS.**

Author: Mirian Josefina Baptista

Adviser: Prof. Dr. Tasso Leo Krugner

SUMMARY

Specificity is not generally observed in mycorrhizal associations but there are different degrees of compatibility between the symbionts. In incompatible interactions, the plant reacts against infection with structural and biochemical defences like in pathogenic interactions. When incompatibility is triggered is unknown, but recently, interactions between *P. tinctorius* isolates and *E. urophylla* have been used in studies of the factors involved in compatibility.

This study investigated the initial stages of ectomycorrhizal infection in compatible and incompatible interactions between *P. tinctorius* and *E. urophylla* to determine the plant reaction and the effect of root exudates and phenolic compounds on the assymbiotic growth of the two isolates. *E. urophylla* seedlings were inoculated with a compatible (1604) and a incompatible (185) isolate of *P. tinctorius* and enzymatic activities of β -1,3-glucanase, chitinase and peroxidase were evaluated at 6, 12, 24 and 72 hours after inoculation by the two isolates. Anatomical study using optical microscopy was carried out at 24, 72, 96 and 120 hours after inoculation and concentration of phenolic compounds was evaluated at the same time. To evaluate the effect of root exudates on growth of *P. tinctorius* isolates *E. urophylla* and *P. caribaea* seedlings were grown in petri dishes with culture medium for 30 days. After that, plants were removed and *P. tinctorius* isolates were grown in the same medium. The effect of *E. urophylla* root phenolic

compounds was studied using them mixed with the medium used to grow *P. tinctorius* isolates.

The fungal isolate 1604 infected and colonized *E. urophylla* roots faster than isolate 185. β -1,3-glucanase activity did not change on the course of infection but chitinase was reduced 72 hours after inoculation with isolate 1604. Peroxidase activity was reduced on the roots of inoculated plants, but on the plants inoculated with isolate 1604, there was an increase at 6 hours after inoculation. This increase did not reduce root colonization by the isolate 1604.

Phenolic compounds accumulated in the roots inoculated with isolate 185, 96 hours after inoculation but it did not reduce root colonization. *E. urophylla* and *P. caribaea* root exudates did not reduce growth rate *in vitro* of the isolate 185 but growth rate of the isolate 1604 was inhibited by the *P. caribaea* root exudates. The Root phenolic compounds of *E. urophylla* reduced the growth rate of isolate 185 and had no effect on the growth of the isolate 1604. The differential effect of root exudates and root phenolic compounds suggests that there may be a recognition mechanism leading to the determination of compatibility between *P. tinctorius* isolates and *E. urophylla*. The enzymatic activity on the roots or phenolic compounds produced after infection were not related to reduction of fungal growth rate in the roots of *E. urophylla*.

1. INTRODUÇÃO

A penetração e colonização das raízes pelos fungos ectomicorrízicos resultam em alterações na morfologia, fisiologia, bioquímica e nutrição da planta hospedeira. Essas alterações podem levar a benefícios no seu estado nutricional através do aumento da taxa fotossintética e da absorção, translocação e utilização de nutrientes minerais e água. Em adição ao papel nutricional, os fungos ectomicorrízicos podem deter patógenos e toxinas nas raízes e promover o crescimento das plântulas através da produção de hormônios (Trappe, 1977; Harley & Smith, 1983; Siqueira & Franco, 1988).

Devido à grande variabilidade fisiológica e morfológica existente entre os fungos ectomicorrízicos, é possível esperar variações no seu comportamento durante o estabelecimento da simbiose, provocando respostas diferenciais nas plantas que variam desde uma simbiose bastante eficiente até a ausência de efeitos ou efeitos deletérios (Harley & Smith, 1983). Existem, no entanto, poucas evidências de especificidade entre plantas hospedeiras e fungos ectomicorrízicos, como as observadas nas relações com patógenos biotróficos. Molina & Trappe (1982) agrupam os fungos ectomicorrízicos em 3 grupos: fungos com ampla faixa de hospedeiros, fungos com faixa restrita de hospedeiros (específicos) e fungos com comportamento intermediário, que apresentam alguma especificidade. Duddridge (1987) relaciona exemplos de interações gênero-específicas (*Suillus grevillei* / *Larix spp*) e espécie-específicas (*Suillus plorans* / *Pinus cembra*) como exemplo de especificidade entre fungos ectomicorrízicos e plantas hospedeiras. A maioria das interações são, no entanto, classificadas como apresentando faixa de hospedeiros ampla ou intermediária (Duddridge, 1987). Apesar da maioria das interações não

apresentar especificidade, observa-se que pode haver uma maior ou menor compatibilidade nas simbioses ectomicorrízicas. Nas relações incompatíveis, a planta mostra respostas de defesa que incluem deposição de compostos fenólicos, formação de papila, espessamento de parede, etc. A reação da planta limita o desenvolvimento da simbiose e conseqüentemente impede sua efetividade (Duddridge, 1987; Münzenberger et al, 1997; Weiss et al, 1999).

Exemplos de simbioses compatíveis e incompatíveis entre fungos ectomicorrízicos e plantas hospedeiras incluem a relação entre o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch e *Eucalyptus urophylla*. Malajczuk et al (1990) observaram que isolados de *P. tinctorius* obtidos a partir de eucalipto ou *Pinus* se comportam de forma diferente quando inoculados em plântulas de *E. urophylla*. Foi observado que os isolados de *P. tinctorius* de eucalipto formavam ectomicorrizas rapidamente, cerca de 2 dias após a inoculação em plântulas de eucalipto. Os isolados de *P. tinctorius* obtidos de *Pinus* iniciavam a colonização de plântulas de eucalipto só 7 dias após a inoculação. Em estudos bioquímicos e fisiológicos, Lei et al (1990) observaram que, na interação entre *P. tinctorius* isolado de *Pinus* e plântulas de eucalipto, a célula vegetal reagia à presença do fungo produzindo espessamento de parede, caracterizando a incompatibilidade da interação.

Não se sabe ainda em que momento ocorre a determinação da incompatibilidade ou compatibilidade da simbiose ectomicorrízica, mas provavelmente, os estágios iniciais da interação, quando ocorre o reconhecimento, são os passos principais para o desenvolvimento de uma simbiose eficiente (Malajczuk et al, 1990). A comparação entre interações micorrízicas e a patogênese microbiana sugere que, durante a interação, fatores moleculares da planta e do fungo atuam como chaves que liberam cada etapa do ciclo de desenvolvimento micorrízico. Alguns fatores limitam o crescimento fúngico dentro da raiz impedindo a patogênese e outros fatores estão envolvidos no bloqueio ou repressão dos mecanismos de defesa da planta (Anderson, 1988). Dessa forma, o reconhecimento de substâncias nos

exsudatos radiculares, a produção de enzimas celulolíticas pelo fungo (Schwan-Estrada, 1997), a produção de barreiras estruturais e químicas e de enzimas quitinases e β -1,3 glucanases pela planta (Albrecht et al, 1994a,b; 1994b; Weiss et al, 1999) podem ser fatores importantes na regulação e controle do desenvolvimento da simbiose. Estudos recentes têm demonstrado alterações nos padrões de produção de proteínas relacionadas à patogênese (quitinases e β -1,3 glucanases) por plantas em simbiose com isolados compatíveis e incompatíveis de fungos ectomicorrízicos (Albrecht et al, 1994a e 1994b). Da mesma forma, o estudo da produção de enzimas celulolíticas nas simbioses entre eucalipto e isolados compatíveis e incompatíveis de *P. tinctorius* demonstrou a maior produção de enzimas celulolíticas nas primeiras 12 horas após a inoculação do isolado compatível do fungo (isolado de eucalipto) e somente após 24(endo β -1,4 glucanase) e 48 horas (exo β -1,4 glucanase e glicosidase) na interação com isolado incompatível (isolado de *Pinus*) (Schwan-Estrada, 1997). A maior produção de enzimas celulolíticas foi relacionada aos estágios iniciais da colonização, quando ocorre a penetração fúngica na raiz.

Estudos histológicos e bioquímicos dos estágios sequenciais do desenvolvimento da simbiose ectomicorrízica vêm sendo feitos com o objetivo de determinar as diferenças fisiológicas e histológicas entre as simbioses compatíveis e incompatíveis (Horan et al, 1988; Lei et al, 1990; Malajczuk et al, 1990; Albrecht, 1994; Hodge, 1995; Schwan-Estrada, 1997). Estes estudos permitirão compreender alguns dos fatores essenciais para o desenvolvimento de uma interação eficiente e a possibilidade de interferência no processo visando maximizar a efetividade da simbiose. Neste contexto, este trabalho teve por objetivos verificar a existência de alterações na atividade das enzimas quitinase, β -1,3-glucanase e peroxidase nos estágios iniciais da infecção e colonização micorrízica por isolados de *P. tinctorius* (um isolado de *Pinus* e um de eucalipto) em *E. urophylla*. Observar alterações morfológicas e bioquímicas, em raízes de *E. urophylla* colonizadas com cada um dos isolados, que possam explicar a incompatibilidade do isolado de *Pinus* com as raízes de *E. urophylla* e

determinar o efeito de exsudatos e compostos fenólicos radiculares sobre o crescimento assimbiótico de isolados de *P. tinctorius* para verificar a possibilidade destas substâncias exercerem papel no reconhecimento entre os simbiossiontes nos estágios iniciais da interação.

Para isto, foram realizados experimentos correspondentes aos seguintes trabalhos apresentados:

1. Atividade das enzimas vegetais β -1,3-glucanase quitinase, e peroxidase na simbiose entre dois isolados de *Pisolithus tinctorius* e *Eucalyptus urophylla* *in vitro*.
2. Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus urophylla* *in vitro*.
3. Efeito de exsudatos e compostos fenólicos radiculares sobre o crescimento assimbiótico de *Pisolithus tinctorius*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Simbiose micorrízica.

Cerca de 95% das espécies de plantas vasculares pertencem a famílias caracteristicamente micorrízicas (Trappe, 1977). As micorrizas representam um fenômeno de ocorrência generalizada resultante da união orgânica entre as raízes e o micélio de fungos pertencentes a diversas espécies de Ascomicetos, Basidiomicetos e Zigomicetos (Trappe, 1977; Siqueira & Franco, 1988). Tradicionalmente as micorrizas têm sido agrupadas com base na anatomia da infecção em ectomicorrizas, endomicorrizas e ectendomicorrizas. As endomicorrizas são caracterizadas pela penetração inter e intracelular do micélio fúngico no córtex da raiz. Intracelularmente é formada uma estrutura específica para troca de metabólitos denominada arbúsculo. Este tipo de micorriza é formada entre a maioria das angiospermas e algumas ginospermas e fungos zigomicetos da ordem Glomales (Morton et al, 1990 ; Harley & Smith, 1983). As ectomicorrizas são caracterizadas pela penetração intercelular do micélio fúngico no córtex da raiz (rede de Hartig) e formação de um manto fúngico ao redor das raízes colonizadas. São formadas principalmente entre fungos basidiomicetos e alguns ascomicetos e a maioria das ginospermas e algumas angiospermas. Nas ectendomicorrizas o manto é reduzido e muitas vezes ausente. A rede de Hartig é bem desenvolvida e apresenta penetração intracelular do micélio. São produzidas entre os mesmos fungos ectomicorrízicos e plantas hospedeiras em condições específicas (Harley & Smith, 1983; Siqueira & Franco, 1988). Do ponto de vista ecológico e prático, as ectomicorrizas e endomicorrizas são consideradas as mais importantes (Siqueira & Franco, 1988).

As ectomicorrizas formadas por fungos basidiomicetos e ascomicetos correspondem a apenas 5% das espécies de plantas vasculares, incluindo espécies florestais e ornamentais. Todas as espécies de Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae, Tiliaceae e muitos membros de Rosaceae, Leguminosae, Ericaceae, Juglandaceae e outras famílias são ectomicorrízicas (Trappe, 1977). As espécies arbóreas ectomicorrízicas comercialmente importantes incluem Betulaceae, Dipterocarpaceae, Fagaceae, Myrtaceae e Pinaceae (Castellano, 1994). A importância da inoculação ectomicorrízica para o sucesso do estabelecimento de espécies arbóreas foi primeiro registrado em 1927 (Keissel, citado por Castellano, 1994) para a associação entre *Pinus radiata* e *Rhizopogon luteolus* na Austrália. No entanto só a partir da década de 70, a pesquisa intensiva com o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, por Marx e colaboradores, aumentou o interesse da comunidade científica pela simbiose (Castellano, 1994).

A penetração e colonização das raízes pelos fungos ectomicorrízicos resultam em modificações na fisiologia, bioquímica e nutrição da planta hospedeira, aumentando a taxa fotossintética, absorção, translocação e utilização de nutrientes minerais e água e alterações na morfologia e taxa de crescimento das raízes (Harley & Smith 1983; Siqueira & Franco, 1988). Em adição ao papel nutricional, os fungos podem deter patógenos das raízes, proteger as plantas contra toxinas radiculares e promover o crescimento das mudas através da produção de hormônios (Trappe, 1977). A natureza e magnitude dessas alterações depende da relação de compatibilidade entre os componentes do sistema. O estabelecimento do fungo representa, por outro lado um dreno de fotossintatos nas raízes para a manutenção do crescimento fúngico. Esse dreno é muito mais acentuado nas ectomicorrizas que nas endomicorrizas e é compensado pelos benefícios nutricionais e fisiológicos que o fungo provoca na planta (Harley & Smith 1983). Muitas espécies vegetais hospedeiras crescem pobremente na ausência de fungos micorrízicos, mesmo em solo fértil. Outras, particularmente os pinheiros, podem crescer

satisfatoriamente sem micorrizas, nos primeiros dois anos, se a fertilidade é mantida e os patógenos do solo controlados. No entanto, mesmo se mudas vigorosas são produzidas, o último teste de sua qualidade é a sobrevivência e crescimento no campo e o sucesso das plantas micorrizadas é significativamente maior que o das não micorrizadas em muitas ou na maioria das circunstâncias, (Trappe, 1977; Castellano, 1994). Hoje, a seleção cuidadosa do fungo é reconhecida como um passo importante nos programas de inoculação em viveiros. Fungos ectomicorrízicos diferentes podem afetar a planta hospedeira de formas distintas. Algumas diferenças entre os fungos ectomicorrízicos incluem: especificidade ao hospedeiro, adaptabilidade ecológica do fungo, capacidade de absorção e translocação de nutrientes, produção de reguladores de crescimento e interações com outros organismos do solo. A variação ecotípica dentro de uma espécie fúngica pode ser tão pronunciada como as diferenças entre as espécies. Trappe (1977) afirmou que comparações entre muitos isolados de uma mesma espécie provavelmente revelaria que certos ecotipos se comportam melhor que outros. Realmente tem sido verificadas, recentemente, diferenças na compatibilidade entre isolados de *Pisolithus tinctorius* e *Eucalyptus urophylla* (Malajczuk et al, 1990).

2.2 Especificidade e compatibilidade na simbiose ectomicorrízica.

As ectomicorrizas apresentam baixa diversidade de espécies hospedeiras (cerca de 2000 espécies), predominando as ginospermas e poucas angiospermas, e alta diversidade de fungos simbiontes (cerca de 5000 espécies). Uma alta diversidade morfológica e fisiológica explica as diferenças em efetividade ou eficiência micorrízica observada em programas de inoculação (Harley & Smith, 1983). Diferentes espécies fúngicas ou isolados de uma mesma espécie se comportam de forma diferente quando em associação com várias espécies hospedeiras, podendo apresentar um efeito benéfico variável ou até mesmo um efeito deletério sobre o crescimento e desenvolvimento da planta. Portanto, considerando a grande variedade fisiológica e morfológica

existente entre os fungos ectomicorrízicos, é possível esperar variações no comportamento desses fungos durante o desenvolvimento e estabelecimento da simbiose e na efetividade dessa simbiose nos programas de inoculação existentes.

Existem poucas evidências da existência de especificidade entre espécies e biotipos hospedeiros e raças fisiológicas e isolados fúngicos. Esse é o grau de especificidade que se observa entre patógenos biotróficos e que tem sido freqüentemente discutida. A especificidade, vista desse modo, em geral não é observada em hospedeiros e fungos endo ou ectomicorrízicos uma vez que um isolado fúngico é capaz de formar micorrizas em qualquer espécie vegetal que seja capaz de desenvolver a simbiose. Da mesma forma, nenhum exemplo foi demonstrado onde a simbiose apresente genes específicos de virulência ou avirulência para o fungo e de resistência ou susceptibilidade para o hospedeiro, o que levaria a especificidade em sentido restrito. O genótipo hospedeiro pode afetar a intensidade mas não a presença ou ausência da infecção (Harley & Smith, 1983; Siqueira & Franco, 1988). Essa característica pode ser entendida considerando que as associações mutualísticas têm uma vantagem seletiva para ambos os simbiontes e fatores que levam à epidemia, ou seja, à presença universal das associações, terão vantagem seletiva. Por outro lado, muitos fungos da raiz, incluindo as micorrizas, dependem do micélio perene e de propágulos de resistência para a sobrevivência. As chances de sobrevivência são portanto grandemente aumentadas pela existência de ampla faixa de espécies hospedeiras susceptíveis e a pressão de seleção sobre o fungo age contra a evolução da especificidade (Harley & Smith, 1983). Existe, no entanto, considerável variação entre os fungos simbiontes, principalmente os ectomicorrízicos no que se refere aos padrões de desenvolvimento e funcionamento das micorrizas (Malajczuk et al, 1990; Lei et al, 1990). Cada tipo de micorriza é complexo em morfologia, anatomia e fisiologia e cada aspecto do processo total de infecção pode, portanto, apresentar variações, levando a diferenças no desenvolvimento e

funcionamento da simbiose. Embora a maioria dos fungos ectomicorrízicos tenham um baixo grau de especificidade, simbiontes diferentes podem variar na sua habilidade de aumentar a absorção de nutrientes pelo hospedeiro em diferentes condições. As diferenças na efetividade podem ser um reflexo da maior ou menor compatibilidade entre o fungo e a planta hospedeira. Segundo Koide & Schreiner (1992), a compatibilidade entre fungos micorrízicos e a planta é definida como a competência dos dois simbiontes em formar uma simbiose completamente funcional. Uma simbiose funcional é aquela em que o fungo penetra a raiz hospedeira, onde metabólitos são trocados e onde a propagação do fungo é efetuada. A penetração e infecção limitada do fungo na raiz não constitui participação completa na simbiose e revela a incompatibilidade da interação.

A complexibilidade do ciclo de vida dos fungos micorrízicos nas plantas indica que a compatibilidade não pode ser o resultado de um gene único. O controle da expressão de muitos genes fúngicos e vegetais está envolvido e a diversidade dos tipos e efetividade das micorrizas no reino vegetal suportam esse conceito (Anderson, 1988). Virtualmente nada se sabe sobre os genes específicos que regulam a simbiose micorrízica, todavia é possível usar a diversidade existente entre os diferentes hospedeiros e genótipos fúngicos para obter pistas relevantes sobre a regulação genética da simbiose (Kropp & Anderson, 1994). a natureza contínua da variabilidade entre isolados haplóides sugere que a formação ectomicorrízica é controlada poligeneticamente. Pode-se inferir que algumas espécies de fungos ectomicorrízicos requerem informações adicionais àquelas carregadas no genoma haplóide para serem capazes de formar ectomicorrizas e simbioses funcionais. Desta forma, a formação de isolados dicarióticos permite a micorrização eficiente (Kropp & Anderson, 1994). A complexibilidade e o caráter poligênico da regulação da simbiose se torna compreensível quando a variabilidade é examinada ao nível fisiológico. As interações fisiológicas observadas em ecto e endomicorrizas mostra que muitos genes no fungo e da

planta são requeridos. Estes genes regulam eventos em vários estágios da interação, inicialmente na rizosfera, depois na superfície da raiz e, finalmente, dentro da raiz (Kropp & Anderson, 1994). A ausência ou o mal funcionamento dos vários eventos de reconhecimento, essenciais para a compatibilidade, podem resultar na incompatibilidade. Molina & Trappe (1982) analisaram 27 espécies de fungos ectomicorrízicos obtidos de diferentes associações esporocarpo-planta hospedeira. Estes fungos foram estudados quanto a capacidade de formação de ectomicorrizas com 7 espécies de coníferas. Foi observado que os fungos variavam amplamente em sua capacidade de formar micorrizas com as coníferas estudadas e baseando-se nesta variabilidade foram classificados em 3 grupos:

1. Fungos com ampla faixa de hospedeiros e baixa especificidade. Seus esporocarpos usualmente estão associados à diversos hospedeiros no campo. Fungos como *Amanita muscaria*, *Boletus edulis*, *Laccaria lacata*, *Paxillus involutus* e *Pisolithus tinctorius* foram incluídos neste grupo.

2. Fungos com faixa intermediária de hospedeiros, chamados específicos ou limitados nas associações esporocarpo-hospedeiro (*Suillus* sp., *Rhizopogon* sp.)

3. Fungos com estreita faixa de hospedeiros potenciais, capazes de formar ectomicorrizas apenas com hospedeiros específicos ou algumas espécies de um gênero. São limitados nas suas associações esporocarpo-hospedeiro (*Suillus grevillei* específico de plantas do gênero *Larix*).

Molina & Trappe (1982), observaram que as associações específicas não necessariamente limitam as simbioses micorrízicas com outros hospedeiros. Frequentemente, contudo, os fungos específicos mostram melhor desenvolvimento com seu hospedeiro particular, sugerindo uma maior especialização nestas interações. Os fungos com ampla faixa de hospedeiros não apresentaram incompatibilidade com qualquer dos hospedeiros testados, sugerindo que eles devem dividir fatores de compatibilidade ou reconhecimento comuns a muitos hospedeiros ectomicorrízicos. Os fungos especializados

demonstraram freqüentemente reações de incompatibilidade com hospedeiros não associados. O rompimento do córtex pela hifa invasora e a lignificação nas células corticais foram os indicadores mais comuns de incompatibilidade. A reação do hospedeiro sugeriu que os mecanismos de defesa fenólicos são estimulados na planta como nas interações planta-patógeno, indicando similaridades com outras interações entre plantas e microrganismos.

Utilizando micorrizas produzidas *in vitro*, entre *Suillus grevillei* e vários hospedeiros, Duddridge (1986) observou que o fungo considerado específico para espécies hospedeiras do gênero *Larix*, não produziu rede de Hartig em plântulas de *Allocasuarina inophloia* e *Pinus nigra*, embora tenha produzido extenso micélio extracelular. Foram formadas ectomicorrizas em *Pinus sylvestris* e *Pseudotsuga menziesii*, mas análises ultraestruturais mostraram que a interação não era completamente compatível. Em *P. sylvestris* não se formou o manto compacto e a rede de Hartig foi irregular. Em *P. menziesii* houve formação de manto e Rede de Hartig mas haviam anormalidades na interface fungo-planta hospedeira, ou seja, havia um certo grau de incompatibilidade entre os simbiontes. A célula vegetal adjacente ao fungo se mostrou espessada e com depósitos eletrodensos (provavelmente fenólicos) e, em alguns locais, havia sinais de degradação ou lise fúngica na rede de Hartig. A lignificação da parede celular vegetal, a deposição de compostos fenólicos e a formação de papila nas células hospedeiras foram observadas em interações incompatíveis entre simbiontes ectomicorrízicos (Duddridge, 1987). Reações descritas como características de incompatibilidade entre fungos micorrízicos e planta hospedeiras foram, mais tarde, também descritas em *Pisolithus tinctorius*, fungo considerado como de ampla faixa de hospedeiros (Molina & Trappe, 1982). Lei et al (1990) desenvolveram estudos histoquímicos para avaliar com maior profundidade as alterações presentes nos diversos estágios do processo da infecção de eucalipto por dois isolados de *P. tinctorius*: o isolado 445 de eucalipto e o isolado 270 de *Pinus*. As interações entre as raízes de eucalipto e o isolado 445 de *P. tinctorius* foram

caracterizadas pelo acúmulo de fibrilas , provavelmente glicoproteínas, na interface entre os simbios. A atividade da fosfatase ácida, foi também encontrada ao longo do plasmalema fúngico e da célula vegetal. Na simbiose formada com o isolado 270, ao contrário, a região de contato com o hospedeiro não mostrou a formação de fibrilas nos primeiros quatro dias após a inoculação e a célula vegetal reagiu à presença do isolado fúngico produzindo espessamentos de parede morfológicamente similares aos descritos nas interações com fungos patogênicos. As glicofibrilas que ligam as células radiculares às hifas do fungo foram descritas como um dos processos que ocorrem após o reconhecimento entre os simbios ectomicorrízicos altamente compatíveis. A glicoproteína fibrilar tinha provavelmente origem fúngica, uma vez que fibrilas similares estavam presentes entre as hifas do manto fúngico formado por *P. tinctorius*.

Aparentemente existem graus variáveis de incompatibilidade entre os fungos ectomicorrízicos e as várias plantas hospedeiras. As reações de incompatibilidade podem ser bastante visíveis e definidas, como nas interações entre *Suillus grevillei* e *A. inophloia* ou *P. nigra* (Dudridge, 1986), ou podem ocorrer em níveis mais discretos, observando-se alterações no padrão de funcionamento da simbiose, atividade enzimática ou alterações visíveis ao microscópio eletrônico e que levam a diferenças na efetividade, como observado por Lei et al (1990).

Os mecanismos de controle da incompatibilidade podem ocorrer em cada estágio do ciclo de vida do fungo e fatores da planta podem ter papel importante no controle de alguns destes eventos (Anderson, 1988). A presença de substâncias antimicrobianas de origem vegetal ou a falta de nutrientes nos exsudatos radiculares pode limitar a germinação dos esporos. A ausência de uma estrutura de reconhecimento na superfície da raiz limita a adesão. (Anderson, 1988). A regulação ocorre inicialmente na rizosfera, depois na superfície da raiz e finalmente dentro da raiz (Kropp & Anderson, 1994). Embora o momento em que ocorre o reconhecimento e a determinação da

incompatibilidade ou compatibilidade da interação ainda deva ser investigado, aparentemente, os estágios iniciais da interação, quando ocorre o reconhecimento entre os dois simbioses são passos importantes para o desenvolvimento de uma simbiose compatível e eficiente (Malajczuk et al, 1990).

A elucidação dos fatores necessários à compatibilidade pode levar a possibilidades ilimitadas de interferência no processo normal da simbiose ou nas características do fungo e/ou do hospedeiro buscando a obtenção de simbioses mais efetivas. Diversos estudos vêm sendo feitos com o objetivo de conseguir uma melhor compreensão do processo simbiótico, incluindo a investigação da efetividade de diferentes combinações entre fungos e plantas, comparação de processos específicos como fotossíntese e consumo de carboidratos durante a simbiose, o estudo da seqüência exata do processo de infecção e colonização micorrízica para determinar as diferenças existentes entre as simbioses compatíveis e incompatíveis e o estudo dos fatores que levam ao reconhecimento entre simbioses para o desenvolvimento de simbioses altamente eficientes.

2.3 Aspectos ultraestruturais da simbiose ectomicorrízica.

Para a compreensão dos fatores necessários ao estabelecimento da simbiose, é necessário, antes de mais nada, conhecer o processo de desenvolvimento da simbiose nas raízes. Os primeiros dados foram obtidos por Nylund & Unestam (1982) que estudaram o processo de formação de micorrizas *in vitro* usando o fungo *Piloderma croceum* em associação com *Picea abies*. Para isto, plântulas foram cultivadas em tubos de ensaio especiais aos quais foi adicionado o inóculo de micélio fúngico. Fotografias ao microscópio eletrônico de transmissão e ao microscópio ótico foram feitas em diferentes estágios do processo de infecção e colonização micorrízica para a verificação das alterações morfológicas e histológicas em cada fase do desenvolvimento. O processo de micorrização foi então dividido em vários estágios incluindo: 1.

Crescimento do fungo fora da raiz, estimulado por metabólitos vegetais; 2. Formação de um manto de hifas em torno da raiz; 3. Penetração intercelular por uma única hifa fúngica; 4. Alteração da morfologia do fungo formando a rede de Hartig; 5. Extensão do tecido fúngico extraradicular formando manto e rizomorfos. Neste trabalho não foram observadas quaisquer reações da planta à infecção micorrízica. Não foram observadas as alterações comuns em invasões dos tecidos vegetais por fungos fitopatogênicos tais como tanificação, espessamento de parede, formação de papila, necrose das células vegetais ou desorganização e morte das células fúngicas. A falta de reações visíveis do hospedeiro à penetração fúngica foi interpretada como um indício de que o hospedeiro não nota imediatamente a presença do fungo. A infecção micorrízica foi considerada um processo controlado pela planta hospedeira onde interações existentes entre os dois simbiossiontes seriam responsáveis pelas variações na estrutura das diferentes micorrizas. Não foram feitas, no entanto, investigações mais detalhadas da reação do hospedeiro à infecção, tais como, produção de fitoalexinas, fenólicos, enzimas como quitinase, etc. Harley & Smith (1983) descrevem o processo de infecção ectomicorrízica de forma semelhante. Segundo esses autores o passo inicial da infecção seria o crescimento do micélio fúngico na rizosfera onde carboidratos essenciais, vitaminas e aminoácidos seriam liberados pelas raízes. Algum fator específico reconhecido pelo fungo poderia estar também sendo liberado pela raiz estimulando seu crescimento na rizosfera de plantas hospedeiras. Em seguida ocorreria a penetração das células epidérmicas do tecido radicular e a penetração intercelular nas células do córtex formando a rede de Hartig. Na superfície exterior da raiz, as hifas fúngicas formam um tecido pseudoparenquimatoso denominado manto. O fato de que a formação do manto ocorre em raízes de plantas capazes de formar ectomicorrizas e não em todas as plantas foi discutida como uma forma de reconhecimento entre o fungo e a planta. Por outro lado, a formação da rede de Hartig ocorre em uma região específica da raiz anterior à região de crescimento meristemático onde se inicia a maturação

celular denominada zona de infecção micorrízica (ZIM) (Marks & Foster, 1973). Isto indica também alguma forma de reconhecimento de uma tecido específico mais adequado à penetração e colonização. Possivelmente as proteínas e enzimas fúngicas no ápice da hifa seriam capazes de complexar ou inibir as enzimas do hospedeiro responsáveis pela polimerização dos componentes da parede celular. As enzimas polimerizadas seriam inibidas assim como a formação da parede celular, tornando possível a liberação dos carboidratos constituintes da parede para o fungo (Harley & Smith, 1983). Essa interação entre as enzimas fúngicas e vegetais seria também uma forma de reconhecimento que distinguiria entre um fungo micorrízico e não micorrízico, no entanto, essas hipóteses ainda não foram verificadas. Horan et al (1988) usaram uma técnica mais apurada denominada técnica do papel sanduíche (Chilvers et al, 1986) para obter inoculação simultânea de ápices radiculares e produzir micorrizas em desenvolvimento sincrônico. Essa técnica facilitou o seqüenciamento dos estágios da infecção em eucalipto por dois fungos micorrízicos: *P. tinctorius* e *Paxillus involutus*. Procurou-se agora, uma vez determinado o processo de micorrização, verificar as variações entre duas micorrizas produzidas por fungos de espécies diferentes. A micorrização de eucalipto pelas duas espécies fúngicas ocorreu na mesma velocidade e na mesma proporção, embora os dois fungos crescessem em meio artificial em velocidades diferentes. Foram observadas, após um dia, evidências de interação química entre o fungo e o hospedeiro. Após dois dias, a formação do manto se iniciou na coifa (Cap) da raiz e aos quatro dias todas as características anatômicas das ectomicorrizas estavam presentes, incluindo a rede de Hartig. Um importante aspecto observado foi que, embora a técnica do papel sanduíche tenha tornado o inóculo igualmente disponível a todas as partes do sistema radicular, o crescimento denso e a adesão da hifa ocorreu apenas em torno da coifa. A formação da rede de Hartig pela penetração da hifa entre as células epidérmicas ocorreu após a adesão e formação do manto, no estágio final de infecção. A chamada zona de infecção micorrízica (ZIM) descrita por Marks &

Foster (1973) é descrita por Horan et al (1988) como a região que se estende do ápice até o ponto onde rede de Hartig se forma. Não existe formação micorrízica ao longo dos tecidos já diferenciados. Dessa forma, no ápice, o crescimento fúngico é controlado pela proximidade às células jovens da coifa. As células da coifa produzidas posteriormente ao meristema encontram as hifas em crescimento do manto circundante e se tornam progressivamente invadidas. Estas células são consumidas pelas hifas, que delas se alimentam, e em seguida reinfectam a raiz na zona de alongamento e diferenciação anterior ao meristema apical. O comportamento semelhante de dois fungos micorrízicos de espécies diferentes indicam um processo de controle do desenvolvimento micorrízico independente dos padrões de crescimento e desenvolvimento característicos do fungo e portanto um sistema de regulação peculiar à simbiose.

2.4 Mecanismos de regulação da simbiose

A incompatibilidade é observada antes e depois da invasão do hospedeiro pelo fungo. Muitas vezes a planta hospedeira permite o crescimento do fungo sobre a superfície da raiz mas não a formação de estruturas de penetração e colonização (Kropp & Anderson, 1994). O papel de flavonóides e outros compostos fenólicos, lecitinas e oligossacarídeos no reconhecimento entre os organismos foi verificado em outras simbioses e possivelmente podem estar envolvidos no reconhecimento em simbioses ectomicorrízicas (Anderson, 1988). O aumento da germinação de esporos na rizosfera, na presença de exsudatos radiculares envolve mais que o fornecimento de nutrientes. Estudos com (*Brady*)*Rhizobium* e *Agrobacterium* mostram que certos compostos fenólicos estimulam os microrganismos a colonizar a planta induzindo a expressão de genes que regulam outros genes induzindo fatores essenciais para a colonização (Anderson, 1988). A detecção dos flavonóides envolve sistemas receptor-ativador que levam à expressão de genes bacterianos relacionados à maquinaria necessária à colonização do tecido vegetal (Kropp &

Anderson, 1994). As espécies de (*Brady*)*Rhizobium* têm grandes plasmídeos (plasmídeos SYM) que carregam os genes requeridos para a simbiose. Estes genes foram agrupados em categorias funcionais, sendo os genes NOD aqueles necessários para os eventos iniciais da nodulação do hospedeiro (Lynn & Chang, 1990), designados Nod D, A, B, C. Mutações nestes genes produzem cepas incapazes de induzir respostas típicas do hospedeiro como "hair curling", formação do cordão de infecção e morfogênese inicial do nódulo. Para sua expressão, os genes Nod ABC requerem os produtos dos genes Nod D e um fator específico presente nos exsudatos radiculares das plantas hospedeiras. Os fatores da planta necessários são descritos como flavonas e flavanonas, compostos fenólicos presentes nos exsudatos vegetais (Mulligan & Long, 1985; Lynn & Chang, 1990). Estes compostos podem apresentar efeitos estimulantes e inibitórios à nodulação, dependendo da espécie de (*Brady*)*Rhizobium* em questão. A variedade de compostos fenólicos presente nos exsudatos e a sensibilidade diferencial das cepas de (*Brady*)*Rhizobium* determina a especificidade da interação com a planta hospedeira (Siqueira et al, 1991a). Produtos dos genes Nod D das várias espécies de (*Brady*)*Rhizobium* diferem uns dos outros de forma a conferir respostas específicas às várias classes de flavonóides e exsudatos radiculares. Os genes Nod D são portanto determinantes da nodulação hospedeiro-específica (Spaink et al, 1987; Horvath et al, 1987).

Para *Agrobacterium tumefaciens*, várias espécies de compostos fenólicos liberados pelos ferimentos nas plantas, foram caracterizados como indutores da expressão dos genes VIR (genes de virulência). Os compostos fenólicos α -hidroxi acetosyringone e acetosyringone foram identificados como os principais indutores dos genes VIR liberados de células de fumo danificadas. (Lynn & Chang, 1990; Siqueira et al, 1991b). Em outras interações planta-microrganismos patogênicos, várias classes de compostos fenólicos vegetais exibem amplo espectro de atividade antimicrobiana contra patógenos e vários outros microrganismos (Siqueira et al, 1991b), sendo considerados parte dos

mecanismos de defesa da planta. No entanto, estes compostos tem sido também designados como fatores de reconhecimento das plantas por sistemas simbióticos. Chakraborty et al (1992) verificaram, em estudos *in vitro*, que a porcentagem de germinação de clamidosporos de *Fusarium udum* em contato com exsudatos radiculares da cultivar susceptível de *Cajanus cajan* era cerca de três vezes maior que nos exsudatos radiculares do cultivar resistente. A natureza diferencial das substâncias químicas nos exsudatos radiculares pode exercer influência inicial sobre o microrganismo e selecionar o hospedeiro para infecção. De forma semelhante, muitos produtos fúngicos e vegetais já foram implicados como fatores chave na determinação da compatibilidade na simbiose micorrízica, incluindo compostos voláteis, hormônios, lecitinas e componentes vegetais e fúngicos com potencial antimicrobiano (Harley & Smith, 1983; Anderson, 1988). Em fungos endomicorrízicos foi observado que os flavonóides vegetais estimulam a germinação de esporos e crescimento micelial de *Gigaspora gigantea in vitro* (Baptista & Siqueira, 1994) e a colonização micorrízica de raízes de trevo por *Glomus sp* (Siqueira et al, 1991a). Vários trabalhos demonstram que, na simbiose endomicorrízica, sinais são trocados na rizosfera entre o fungo e a planta hospedeira (Gianinazzi-Pearson et al, 1989; Nair et al, 1991; Siqueira et al, 1991a; Lei et al, 1991; Giovannetti et al, 1996; Vierheilig et al, 1998). Em seguida, sinais dentro das raízes influenciam a formação de arbúsculos, a taxa de transferência de carboidratos da planta para o fungo e a taxa de crescimento do fungo dentro da raiz (Becard & Piché, 1989; Koide & Schreiner, 1992). Ampla variedade de compostos produzidos pelas raízes servem como atrativos, fontes de nutrientes e sinais regulatórios genéticos para os fungos endomicorrízicos antes da infecção. Estudando a interação entre *Gigaspora margarita* e raízes transformadas de cenoura, Becard & Piché (1989) verificaram haver duas fases no desenvolvimento da simbiose em que foram observados mecanismos de estímulo pela raiz. A primeira fase, onde ocorre a germinação do esporo e o crescimento inicial do tubo germinativo, foi estimulada pelos exsudatos radiculares mas foi dependente principalmente

das reservas nutricionais dos esporos. Os exsudatos radiculares exerceram um papel estimulante. A segunda etapa, a partir da formação dos arbúsculos depende exclusivamente da raiz para o fornecimento de nutrientes. Foi demonstrado que as raízes contribuem para o crescimento fúngico por uma ação indutiva e nutricional. Os exsudatos radiculares também demonstraram efeito no aumento da germinação de esporos e do seu crescimento micelial *in vitro*, no aumento da atividade da ATPase no plasmalema e da absorção de fósforo (Lei et al, 1991). Compostos fenólicos flavonóides (flavonas e flavanonas) presentes nos exsudatos radiculares também ativos na indução de genes nod em (*Brady*)*Rhizobium* foram identificados como indutores do desenvolvimento da hifa fúngica a partir dos esporos de fungos endomicorrízicos (Gianinazzi-Pearson et al, 1989). Nair et al (1991) identificaram também outros flavonóides liberados por raízes de plântulas de trevo estimulantes da germinação de esporos, crescimento micelial e colonização das raízes por *Glomus* sp. Mais recentemente, Giovannetti et al (1996) observaram respostas de reconhecimento das raízes pelo fungo *Glomus mosseae*. As substâncias estimulantes presentes nos exsudatos radiculares de *Ocimum basilicum* e *Lactuca sativa* apresentavam baixo peso molecular não sendo descartada a possibilidade de que flavonóides radiculares estivessem envolvidos como sinais nos estágios de pré-infecção. Vierheilig et al (1998) verificaram os efeitos da rizosfera de plântulas de tomate e feijão sobre o crescimento das hifas de *Glomus mosseae*. Em sistemas compartimentalizados, separados por membranas permeáveis às hifas, mas não às raízes, foi observado que exsudatos radiculares solúveis em água estimulavam amplamente as hifas no solo, exercendo um nítido efeito atrativo sobre seu crescimento. Se os metabólitos regulatórios produzidos pelas raízes ou microrganismos da rizosfera também servem como controladores da atividade genética em fungos micorrízicos ainda não foi totalmente demonstrado, mas as observações de seu efeito na germinação de esporos, crescimento das hifas e colonização radicular indica essa possibilidade. Os compostos fenólicos, em

baixas concentrações, parecem ser, como observado em (*Brady*)*Rhizobium* e *Agrobacterium* moléculas sinalizadoras quase universais. Em altas concentrações, no entanto, são antimicrobianas, sugerindo que muitos simbiontes utilizam compostos de defesa do hospedeiro como fatores de reconhecimento (Koide & Schreiner, 1992).

Sinais adicionais são necessários para a formação de apressórios e subsequente penetração (Krop & Anderson, 1994), neste contexto, a adesão pode ser facilitada por eventos de reconhecimento específico. Interações específicas envolvendo a presença de lecitinas podem ser responsáveis pelo reconhecimento durante a adesão. As lecitinas são proteínas com afinidade de ligação a carboidratos específicos. Na simbiose (*Brady*)*Rhizobium*-leguminosas, a introdução de um gene de lecitina de ervilha em raízes de trevo produziu plântulas de trevo noduladas por cepas de *Rhizobium* específicas de ervilha. Esses resultados mostram que a faixa de hospedeiros na simbiose é, em parte, determinada por interações bactéria-lecitinas-raiz (Diáz et al, 1989). Lecitinas foram descritas em associação com hifas do fungo ectomicorrízico *Lactarius* sp indicando que, possivelmente, o reconhecimento e adesão dos fungos ectomicorrízicos às raízes é semelhante ao observado em outras interações simbióticas como (*Brady*)*Rhizobium*-leguminosas, *Agrobacterium*, *Phytophthora*, etc. (Kropp & Anderson, 1994; Reisert, 1981). A observação de fibrilas glicoprotéicas extracelulares na interface entre as hifas fúngicas e as células vegetais na simbiose compatível entre *Pisolithus tinctorius* e *Eucalyptus urophylla* (Lei et al, 1990) pode indicar a presença de interações deste tipo nas simbioses ectomicorrízicas. Este reconhecimento no momento da adesão pode ser determinante para o sucesso da infecção, uma vez que, a formação anormal de apressórios leva a planta a responder com deposição de calose no sítio de penetração das hifas, impedindo a penetração posterior (Molina & Trappe, 1982; Duddridge, 1986). A deposição de calose é um exemplo de resistência induzida em sistemas patogênicos (Krop & Anderson, 1994).

Loci gênicos específicos estão provavelmente envolvidos na penetração da hifa fúngica e no estabelecimento da simbiose e a resposta do fungo aos mecanismos de defesa da planta é também um sítio de interação onde a incompatibilidade pode ser determinada. Estudos em sistemas compatíveis sugerem que as respostas de defesa das plantas podem ser suprimidas ou expressas de maneira seletiva (Kropp & Anderson, 1994). Os mecanismos mecânicos e enzimáticos de penetração na epiderme e no córtex radicular ainda não foram esclarecidos, no entanto, os fungos ectomicorrízicos podem produzir enzimas pectinases e celulasas em cultura (Giltrap et al, 1982; Anderson, 1988; Schwan-Estrada, 1997). O processo de invasão é altamente regulado, mas ainda não se conhecem os sinais que determinam a anatomia da colonização micorrízica nos tecidos corticais da raiz e controlam a expansão das hifas fúngicas.

A penetração da epiderme ou do tecido cortical pode estar regulada por barreiras estruturais pré-formadas ou induzidas (Anderson, 1988). A lignificação da endoderme pode ser responsável por impedir que a hifa dos fungos ectomicorrízicos penetre além do córtex (Münzenberger et al, 1997). Em micorrizas arbusculares, a suberização das células epidérmicas está implicada como barreira pré-formada a penetração (Anderson, 1988). Molina & Trappe (1982) verificaram o acúmulo de compostos fenólicos nos sítios de penetração de isolados incompatíveis de fungos ectomicorrízicos em coníferas e eucalipto. Esses dados lembram os mecanismos de resistência à patógenos fúngicos freqüentes nas plantas (Anderson, 1988) indicando que os mecanismos fenólicos de defesa podem estar relacionados à regulação da simbiose. Em sistemas compatíveis as defesas da planta podem ser suprimidas ou expressas de forma seletiva. Após a penetração, mecanismos de defesa vegetais envolvendo a produção de barreiras químicas e estruturais juntamente com a produção de enzimas antifúngicas pode participar da restrição do desenvolvimento da hifa no tecido radicular.

2.5 Enzimas vegetais relacionadas aos mecanismos de defesa da planta.

Em muitas espécies de plantas, a resposta à infecção por bactérias, vírus e fungos patogênicos ou a vários estresses abióticos é acompanhada pela síntese de uma variedade de proteínas, muitas delas chamadas PR proteínas ou “Pathogenesis related proteins” (Van Loon & Van Kammen, 1970; Niderman et al, 1995). Essas proteínas foram primeiramente descritas por Van Loon & Van Kammen (1970), em folhas de fumo, após a infecção pelo vírus do mosaico do fumo TMV. As PR proteínas não eram detectadas em folhas saudáveis mas tinham sua atividade induzida em folhas inoculadas com o vírus (Liu et al, 1995). Desde então têm sido detectadas em várias espécies vegetais, incluindo mono e dicotiledôneas (Daugrois et al, 1990; Sela-Buurlage et al, 1993; Albrecht et al, 1994; Liu et al, 1995; Ji & Kuc, 1996; Yi & Hwang, 1996; Münzemberger et al, 1997; Vögeli et al, 1998; Mohr et al, 1998). As PR proteínas têm propriedades que as capacitam a resistir ao pH ácido e clivagem proteolítica, permitindo sua atuação em ambientes desfavoráveis como a parede celular e espaços intercelulares (Niderman et al, 1995). Baseando-se primeiramente em propriedades sorológicas e depois em dados de seqüenciamento, as PR proteínas do fumo foram classificadas em 5 grupos principais denominados PR1, PR2, PR3, PR4, PR5. Essas proteínas atraíram a atenção devido à sua possível relação com a resistência das plantas a patógenos uma vez que sua síntese é induzida durante a resistência local ou sistêmica (Niderman et al, 1995). Posteriormente, foram descritos 11 famílias baseando-se na sua homologia de seqüências (Van Loon et al, 1994, citados por Jacobs et al, 1999). Dois grupos tiveram suas funções catalíticas conhecidas: PR2: com atividade de β -1,3-glucanase e PR3: com atividade quitinolítica e de lisozimas (Niderman et al, 1995). Jacobs et al (1999) cita PR2 (β -1,3-glucanases), PR3(Quitinases), PR4(“chitin binding proteins”) e PR5 (“Thaumatococcus-like proteins”). Estas enzimas tiveram demonstrada sua atividade antifúngica em diversos bioensaios *in vitro* sendo que a atividade antifúngica das quitinases e β -1,3-glucanases tem sido demonstrada *in vitro* principalmente

quando combinadas (Benhamou et al, 1990; Daugrois et al, 1990; Schlumbaum et al, 1986; Sela-Buurlage et al, 1993; Ji & Kúc, 1996; Yi & Hwang, 1996; Mohr et al, 1998). Uma vez que os substratos destas enzimas, β -1,3 glucana e quitina, são os principais componentes da parede celular fúngica, sua ação na resistência à penetração e crescimento do fungo nas plantas tem sido considerada importante. Schlumbaum et al (1986), observaram que quitinases purificadas a partir de folhas de feijoeiro inibiam o crescimento de *Trichoderma viridae* *in vitro*. Essa inibição dependia da concentração utilizada da enzima e a inativação da enzima por fervura ou pela combinação com anticorpos específicos bloqueavam sua atividade e o efeito inibitório sobre o crescimento fúngico. Daugrois et al (1990), verificaram a indução da atividade de β -1,3-glucanase e quitinase em interações compatíveis e incompatíveis entre *Colletotrichum lindemuthianum* e cultivares de feijoeiro. A inoculação de diferentes cultivares com *C. lindemuthianum* resultou em um grande aumento da atividade destas enzimas, principalmente nas interações incompatíveis onde o aumento da atividade foi mais rápido. As plantas resistentes mostraram aumento na atividade das duas enzimas 2 e 3 dias após a inoculação, enquanto as plantas susceptíveis apresentaram este aumento apenas após 4 dias. As glucanases induzidas após a inoculação com o patógeno foram diferentes das presentes constitutivamente nas plantas saudáveis. Ji & Kúc (1996), isolaram uma β -1,3-glucanase ácida e 3 isoformas de quitinase de folhas de *Cucumis sativus* L. inoculadas com *Colletotrichum lagenarium*. Essas enzimas foram testadas *in vitro* para verificar seu efeito no crescimento fúngico. A glucanase inibiu significativamente a germinação e o crescimento micelial de *C. lagenarium*. As quitinases A e B não apresentaram efeito, mas a quitinase C inibiu a germinação e o crescimento micelial. A combinação da quitinase C e da glucanase inibiram o crescimento fúngico sinergisticamente causando lise do ápice das hifas e o crescimento anormal do fungo em meio de cultura. Foi proposto que a β -1,3 glucanase e quitinase afetam o crescimento fúngico por lise dos ápices das hifas ou interferindo com o balanço correto entre a síntese

da parede celular fúngica e a hidrólise da parede durante o crescimento da hifa (Ji & Kúc, 1996). Os resultados sugeriram que combinações de isoformas específicas destas duas enzimas são importantes, afetando o crescimento do fungo sinergisticamente. A degradação da quitina ou da β -1,3-glucana na parede fúngica expõem o outro componente e desta forma facilita a degradação e modificações da estrutura da parede (Ji & Kúc, 1996). Benhamou et al (1990), localizaram a atividade da quitinase em raízes de tomate usando antisoro marcado, em áreas onde a parede celular vegetal estava em contato com as hifas de *Fusarium oxysporum radices lycopersici*. Grande quantidade da enzima foi localizada na superfície da célula fúngica, principalmente nas áreas onde a parede se mostrava alterada, indicando que a atividade da quitinase foi precedida pela ação hidrolítica da glucanase. Também neste trabalho, verificou-se que o acúmulo da quitinase ocorreu mais cedo nas interações incompatíveis que nas compatíveis. Foi discutida a importância da β -1,3-glucanase no patossistema tomate-*Fusarium Lycopersi* como liberadora de glucanas importantes na elicitação da produção da quitinase. Esse mecanismo tem sido verificado na elicitação de vários genes vegetais relacionados às reações de defesa da planta. Estes genes são ativados por β -1,3-glucanas fúngicas liberados através da ação da β -1,3-glucanase (Ryan & Farmer, 1991).

A comparação das enzimas extraídas das diversas plantas e órgãos vegetais tem levado à identificação e descrição de isoformas diferentes. Graham & Sticklen (1994) descrevem, em uma revisão abrangente, diversas classes de quitinases vegetais com características distintas. Muitas das quitinases tem sua atividade regulada de acordo com a fase de desenvolvimento da planta, aparecendo em determinados órgãos apenas em certos estágios do desenvolvimento e com importância em processos específicos (polinização, reprodução sexual, etc.). A β -1,3-glucanase, por sua vez, apresenta papel importante na degradação da calose nos tubos crivados e uma variedade de hormônios vegetais controlam a produção desta enzima. Aparentemente o sítio de ligação do etileno na célula vegetal induz um aumento

da atividade da glucanase de maneira similar à que regula a abscisão, amadurecimento, inibição do alongamento das células, síntese de peroxidase e floração. Por outro lado, citocininas, auxinas e giberelinas inibem a indução da β -1,3-glucanase em feijoeiro (Abeles & Forrence, 1970). Vögeli et al (1998) verificaram também a indução da quitinase e glucanase em folhas primárias de feijoeiro pelo etileno e a regulação coordenada das duas enzimas ao nível de síntese de mRNA. Essa regulação foi descrita como sendo importante para a maximização da efetividade das enzimas nas reações de defesa da planta. No entanto, de todas as isoformas presentes constitutivamente nas plantas, apenas a indução de algumas delas exerce efeito na restrição do desenvolvimento de fungos patogênicos (Sela-Buurlage et al, 1993). Jacobs et al (1998) descreveram a indução de diferentes cDNAs de proteínas relacionadas a patogênese em videira infectada por oídio (*Uncinula necator*) ou tratadas com etefon (etileno). Nas plantas tratadas com etefon foram detectadas isoformas de quitinases e glucanases diferentes daquelas detectadas nas plantas inoculadas com oídio. Por outro lado, foram detectadas em folhas, quitinases diferentes das detectadas em frutos. As quitinases e glucanases são classificadas em diversas isoformas de acordo com sua estrutura, homologia de seqüências de aminoácidos, ponto isoelétrico, etc. (Graham & Sticklen, 1994). As quitinases (EC 3.2.1.14) isoladas das plantas são, na maioria, endoquitinases e algumas são exoquitinases. As endoquitinases hidrolisam a quitina a partir de pontos no interior da cadeia e as exoquitinases hidrolisam a quitina a partir das extremidades. As quitinases podem ainda ser ácidas ou básicas, com pH ótimo para atividade geralmente ácido. São produzidas constitutivamente nas plantas em nível baixo e induzidas com o aumento nos níveis de mRNA, sendo reguladas na transcrição. As quitinases são incluídas em 3 classes amplas: A classe I é constituída de quitinases básicas, usualmente localizadas nos vacúolos celulares. Têm atividade específica mais alta que as quitinases da classe II e são, geralmente, responsáveis pela maior parte da atividade quitinolítica no material vegetal. As quitinases de classe II são ácidas e não têm

a capacidade de se ligar à molécula de quitina como as quitinases de classe I, apresentando portanto, menor atividade específica. Não possuem extensão C-terminal na molécula e portanto não ficam retidas ao vacúolo, apresentando atividade extracelular. A quitinase III não apresenta relação sorológica com as quitinases I e II e a quitinase IV inclui várias quitinases com similaridades estruturais entre si e diferentes das quitinases de classe I. As quitinases de classe I, localizadas no vacúolo, podem ser acumuladas e liberadas rapidamente e em grande quantidade quando ocorre lise da célula vegetal. A capacidade de se ligar à quitina e sua alta atividade específica permite intensificar o efeito de sua liberação rápida aumentando o seu efeito fungistático ou fungicida. As quitinases de classe II, geralmente ácidas e extracelulares têm baixo peso molecular, resistência á proteases e baixa atividade. Em fumo, as quitinases de classe II têm apenas 20 % da atividade das quitinases básicas. Um possível papel para essas quitinases na defesa vegetal é atuar como moléculas sinalizadoras liberando elicitores da hifa invasora e atuando na primeira linha de defesa. Neste contexto, essas quitinases tem função mais importante na indução da atividade antifúngica das células vegetais circundantes do que na destruição das células fúngicas (Graham & Sticklen, 1994). Sela-Buurlage et al (1993), observaram que as isoformas de quitinase e β -1,3-glucanase de classe I vacuolares de plântulas de fumo, foram mais ativas contra *Fusarium solani*, resultando em lise das extremidades das hifas e inibição de seu crescimento *in vitro*, atuando sinergisticamente. As isoformas de classe II, ao contrário, não exibiram atividade antifúngica.

A ação das quitinases e β -1,3 glucanases sobre o micélio fúngico libera oligossacarídeos que funcionam como elicitores nas células vegetais levando à ativação de outros mecanismos locais ou sistêmicos de resistência das plantas. A produção de fitoalexinas, substâncias antimicrobianas produzidas nas plantas em resposta à infecção, é ativada em resposta a liberação de elicitores de origem fúngica (elicitores exógenos) ou da própria planta (elicitores endógenos). Os elicitores são moléculas complexas podendo

englobar carboidratos, glicoproteínas, polipeptídeos, enzimas ou lipídeos produzidos ou liberados durante a interação entre os simbiontes (Pascholati & Leite, 1994). Elicitores que induzem respostas de hipersensibilidade na planta hospedeira tem sido isolados a partir de alguns fungos ectomicorrízicos e sua atividade demonstrada em hospedeiros incompatíveis e em plantas não hospedeiras (Duddridge, 1987). Segundo Coleman & Anderson (1985), citados por Duddridge (1987), os elicitores fúngicos podem estar envolvidos na especificidade de fungos ectomicorrízicos, estimulando uma resposta de defesa da planta hospedeira apenas em interações incompatíveis.

As β -1,3-glucanases, baseando-se em sua estrutura primária, são também classificadas em 3 classes (Sela-Buurlage et al, 1993). A classe I contém isoformas básicas vacuolares e a classe II, apresenta isoformas ácidas extracelulares que são sorologicamente relacionadas e com identidade em sua estrutura primária de aproximadamente 50% (Linthorst et al, 1990). A glucanase de classe III foi descrita como proteína ácida extracelular com cerca de 50% de homologia com as isoformas da classe II. Yi & Hwang (1996) identificaram diversas isoformas de quitinase e β -1,3 glucanases em hipocótilos e folhas de soja após inoculação com isolado compatível ou incompatível de *Phytophthora megasperma f.sp.glycinea*. Algumas isoformas de β -1,3-glucanases eram expressas constitutivamente e outras se acumulavam somente após inoculação ou em órgãos específicos da planta. A infecção com *P. megasperma* induziu a atividade de isoformas específicas de quitinase, diferentes das isoformas induzidas após tratamento com $HgCl_3$. Os resultados sugeriram que a infecção por *P. megasperma* e o stress químico funcionariam de formas diferentes dependendo do órgão da planta analisado. O acúmulo de β -1,3-glucanases e quitinases foi mais pronunciado nas interações compatíveis que nas incompatíveis, mesmo se tratando da interação com um fungo oomiceto, que não contém quitina nas paredes celulares. Esses resultados indicam a possibilidade de uma resposta inespecífica da planta à penetração fúngica. Yi & Hwang (1996) chamam a atenção para o fato de que, neste tipo de estudo, é

importante distinguir as proteínas através da separação por eletroforese em gel. Esse procedimento permite a análise de respostas diferenciais dadas pela produção de isoenzimas específicas, uma vez que o ensaio colorimétrico não distingue as isoformas de β -1,3-glucanases e quitinases que podem estar associadas à funções metabólicas diferentes durante a infecção. Algumas isoformas exibiram, neste trabalho, altos níveis de atividade durante a patogênese, enquanto outras aparentemente contribuíram para a expressão de sintomas apenas na fase final do processo de infecção. Aparentemente a infecção patogênica e o stress químico induzem isoformas diferentes de β -1,3-glucanases e quitinases em soja (Yi & Hwang, 1996) e o mesmo processo pode estar ocorrendo nas interações simbióticas.

Diferenças entre as respostas das plantas à infecção por microrganismos patogênicos e simbioses foram observadas subsequente. Liu et al (1995) verificaram a produção de PR-proteínas em algodão inoculado com os fungos micorrízicos arbusculares *Glomus mosseae* e *Sclerocystis sinuosa* e com o fungo patogênico *Verticillium dahliae*. Através da eletroforese em gel de poliacrilamida, 11 PR-proteínas foram detectadas. O número de PR proteínas foi maior nas plantas inoculadas com *V. dahliae* e com fungos micorrízicos. Mohr et al (1998) verificaram a resposta de raízes de feijoeiro a infecção por *Glomus mosseae* e pelo patógeno *Fusarium solani f.sp. phaseoli*. A infecção por *G. mosseae* provocou poucas alterações na expressão dos genes da quitinase, β -1,3-glucanase e fenilalanina amoníase (enzima ligada à síntese de fitoalexinas) quando comparadas às plantas não inoculadas. Nas interações com patógenos, uma grande indução da expressão dos genes da quitinase e fenilalanina amoníase foi observada. Foi verificada pouca alteração na atividade total de β -1,3-glucanase mas houve forte indução nos níveis de transcrição da β -1,3-glucanase de classe II.

Em interações compatíveis, onde o microrganismo vive e se replica no tecido hospedeiro, a eliciação de respostas de defesa é evitada ou, se as respostas de defesa são induzidas, presumivelmente elas são toleradas

ou inativadas. Aparentemente os simbioss e os patógenos empregam estratégias diferentes para lidar com as defesas da planta. Embora os fungos patogênicos rapidamente provoquem a indução dos mecanismos de defesa, eles podem ser insensíveis aos compostos de defesa induzidos, podem se adaptar a eles ou inativá-los. Possivelmente, a ação proteolítica sobre as quitinases é parte da estratégia dos patógenos para inativar as defesas das plantas (Lange et al, 1996) e a incapacidade de *Glomus mosseae* em ativar estes mesmos mecanismos nas plântulas de feijão, pode indicar que estes fungos não produzem elicitores ou produzem supressores das respostas de defesa da planta (Mohr et al, 1998). Aparentemente, os fungos endomicorrízicos não induzem as repostas de defesa das plantas como verificado em diversos estudos envolvendo outras enzimas de defesa como a peroxidase e a fenilalanina amônia-liase.

As peroxidases (EC 1.11.1.7: H₂O₂ oxidoreductase) são comuns nas plantas. Oxidam uma variedade de compostos fenólicos e tem sido implicadas em muitos processos fisiológicos diferentes, como incorporação de compostos fenólicos nas paredes celulares e lignificação (Gaspar et al, 1991 citado por Münzenberger et al, 1997). A atividade da peroxidase é também alta em tecidos meristemáticos e em ativo crescimento, onde ocorre grande quantidade de células em divisão e a formação de novas paredes celulares. Esta envolvida em muitos processos no metabolismo das células vegetais, localizada principalmente nos vacúolos e nas paredes celulares (Schloss et al, 1987; Spanu & Bonfante-Fasolo, 1988). A peroxidase promove o enrijecimento da parede celular através da oxidação de compostos fenólicos, protegendo os polissacarídeos da parede contra o ataque de enzimas (Pascholati & Leite, 1994). Nas interações planta-patógeno, compostos como fenóis, lignina e suberina são acrescentados à parede celular atuando como barreira física contra o ataque microbiano (Pascholati & Leite, 1994). Em consequência, aumentos na atividade da peroxidase estão freqüentemente presentes após

interações planta-patógeno, indicando que esta enzima está envolvida na indução da resistência vegetal.

Spanu & Bonfante-Fasolo (1988) verificaram um aumento na atividade da peroxidase em raízes de *Allium porrum* inoculadas com *Glomus versiforme*. A maior atividade foi observada durante os estágios iniciais da penetração fúngica. Após o estabelecimento da infecção, no entanto, a atividade foi reduzida aos mesmos níveis das raízes não inoculadas. Este aumento na atividade da peroxidase foi atribuído a uma reação do hospedeiro ao início da infecção, ou a uma irritação inespecífica. Quando o fungo começou a se desenvolver intracelularmente, a redução na atividade da peroxidase indicou que não houve resposta de defesa da planta e a interação foi totalmente compatível. Em outro experimento, Spanu et al (1989), verificaram que a atividade da quitinase em raízes de plântulas de *A. porrum* inoculadas com *G. versiforme* foi também alta nos primeiros 20 dias após a inoculação. Todavia, após 60 a 90 dias, quando a simbiose estava completamente estabelecida, as raízes inoculadas apresentavam atividade enzimática muito menor que as plantas não inoculadas. Na primeira fase da simbiose as raízes respondem com uma típica reação de stress contra patógenos mas na segunda etapa, a atividade da quitinase foi reduzida. A possibilidade da produção de inibidores ou a adsorção das enzimas a proteínas fúngicas pareceu uma boa explicação para a redução na atividade enzimática. Outra possível explicação seria a repressão da quitinase por uma alteração da concentração de hormônios nas raízes. Estes trabalhos descritos sugerem que o fungo endomicorrízico inicia respostas de defesa nas plantas e que depois elas são suprimidas (Koide & Schreiner, 1992). Resultados semelhantes foram obtidos por Lambais & Mehdy (1993) na simbiose entre plântulas de feijão e *Glomus intraradices*. A atividade de duas isoformas da endoquitinase foi aumentada nos estágios iniciais da interação e suprimida, principalmente no período de maior crescimento intraradicular das hifas. Segundo Lambais & Mehdy (1995), a expressão diferencial de genes relacionados às defesas vegetais pode contribuir para o

controle do crescimento e desenvolvimento das micorrizas arbusculares. Além das endoquitinases foi verificada a supressão da atividade da β -1,3-glucanase e chalcona isomerase. Comparando ainda a atividade das enzimas de defesa vegetal em diferentes condições nutricionais relativas à concentração de fósforo, Lambais & Mehdy (1998) verificaram que plântulas crescidas em presença de altas concentrações de fósforo, condições não favoráveis à simbiose endomicorrízica, apresentavam alta atividade de endoquitinases ácidas em células contendo arbúsculos. A alta atividade da quitinase nestas condições pode inibir o desenvolvimento ou reduzir a longevidade dos arbúsculos. A β -1,3-glucanase, ao contrário, apresentou maior atividade nas células contendo arbúsculos, em plantas crescidas em baixa concentração de fósforo. Foi sugerida a possível função da β -1,3-glucanase como facilitadora da penetração intracelular do fungo, degradando parcialmente a parede celular vegetal (Lambais & Mehdy, 1995).

Na maioria dos casos, os fungos micorrízicos arbusculares apresentam uma reação semelhante à incompatível transitoriamente, com a indução de vários genes relacionados à defesa, incluindo endoquitinases. Essa fase é seguida por uma supressão geral, sistêmica destes genes nos níveis de atividade enzimática e na transcrição de mRNA. Essa supressão facilita a reação compatível de longa duração predominante (Lambais & Mehdy, 1995). Volpin et al (1995) constataram a supressão dos níveis de isoflavonóides (Formononetina e Medicarpina) e do mRNA de enzimas relacionadas à síntese de fitoalexinas, a fenilalanina amônia-liase, chalcona isomerase e isoflavona redutase, após a infecção de raízes de alfafa por *Glomus intraradices*. As quantidades relativas de mRNA da fenilalanina amônia-liase foram duplicadas entre 14 e 18 dias após a inoculação e depois caíram cerca de 75%, para níveis mais baixos que nas plantas não inoculadas. Esses resultados confirmam que a colonização das raízes induz as respostas de defesa e subseqüentemente suprime a resposta, sendo a supressão regulada ao nível de transcrição do mRNA. Outras estratégias para evitar as defesas das plantas

foram descritas em sistemas patogênicos. Mohr et al (1998) demonstrou que o processamento proteolítico da quitinase é parte de uma estratégia de inativação das defesas da planta em interações compatíveis entre feijão e *Fusarium solani*. Os mecanismos pelos quais a expressão dos genes vegetais é modulada nas interações micorrízicas ainda não foram compreendidos mas dois possíveis mediadores de mecanismos de sinalização são os fitohormônios e moléculas supressoras. Uma possibilidade é que os fungos micorrízicos arbusculares causem uma alteração no balanço de fitohormônios nas raízes levando à regulação dos genes relacionados à defesa específicos da simbiose. Os níveis de auxinas, citocininas, etileno e ácido abscísico têm se mostrado alterados em raízes micorrizadas e essas alterações podem modular a expressão dos genes vegetais relacionados às enzimas de defesa da planta.

2.6 Compatibilidade entre isolados de *Pisolithus tinctorius* e a planta hospedeira.

Recentemente, a simbiose entre isolados de *Pisolithus tinctorius* e eucalipto tem se mostrado útil no estudo dos fatores que levam a compatibilidade. Malajczuk et al (1990) procuraram comparar o processo de formação micorrízica em eucalipto por dois isolados do fungo *P. tinctorius*: Um isolado de eucalipto e um isolado de *Pinus*. Os isolados de eucalipto iniciaram a colonização dois dias após a inoculação enquanto os isolados de *Pinus* iniciaram a colonização apenas sete dias após a inoculação. Essas observações indicaram que existem graus variáveis de compatibilidade entre os isolados e a planta hospedeira, implicando em um tipo de especificidade importante para o sucesso da formação micorrízica. Aparentemente, os eventos associados com os processos de reconhecimento entre os dois simbiontes levaram à discriminação entre os dois isolados e ao desenvolvimento diferencial da simbiose. Lei et al (1990) desenvolveram estudos histoquímicos para avaliar com maior profundidade as alterações presentes nos diversos estágios do processo da infecção de eucalipto pelos dois isolados de *P.*

tinctorius: o isolado 445 de eucalipto e o isolado 270 de *Pinus*. As interações entre as raízes de eucalipto e o isolado 445 de *P. tinctorius* foram caracterizadas pelo acúmulo de fibrilas, provavelmente glicoproteínas, na interface entre os simbios. A atividade da fosfatase ácida, foi também encontrada ao longo do plasmalema fúngico e da célula vegetal. Na simbiose formada com o isolado 270, ao contrário, a região de contato com o hospedeiro não mostrou a formação de fibrilas nos primeiros quatro dias após a inoculação e a célula vegetal reagiu à presença do isolado fúngico produzindo espessamentos de parede morfológicamente similares aos descritos nas interações com fungos patogênicos. As glicofibrilas que ligam as células radiculares às hifas do fungo foram descritas como um dos processos que ocorrem após o reconhecimento entre os simbios ectomicorrízicos altamente compatíveis. Discute-se o papel de compostos de superfície como polissacarídeos, glicoproteínas e fosfatases ácidas da parede celular como moléculas intermediadoras do reconhecimento entre os simbios que estimulariam o desenvolvimento posterior de uma interação efetiva ou não. Embora esses autores não tenham realizado estudos específicos a respeito dessas moléculas mediadoras, foi observado que diferenças intraespecíficas existem entre os fungos ectomicorrízicos antes classificados como possuidores de ampla faixa de hospedeiros e justifica a necessidade de trabalhos que expliquem, a nível molecular, as falhas de programas de inoculação que usaram simbios supostamente compatíveis (Lei et al, 1990).

O papel de substâncias específicas presentes na hifa fúngica ou na célula vegetal no reconhecimento entre os simbios vem sendo estudado nos trabalhos mais recentes. Sauter & Hager (1989) verificaram que uma fração da parede celular do fungo micorrízico *Amanita muscaria*, aumentou a atividade da quitinase em suspensão de células de *Picea abies* (L.). A atividade da quitinase foi também aumentada nas raízes de *Picea abies* após incubação com extratos fúngicos. Foi sugerido que a quitinase liberada das células como parte dos mecanismos de defesa ajudariam a degradar

parcialmente a parede celular fúngica facilitando dessa forma a troca de metabólitos e íons entre os simbioses. Embora este último aspecto não tenha sido comprovado, Sauter & Hager (1989) demonstraram que um elicitor fúngico foi efetivo em induzir uma resposta bioquímica na planta que foi importante para o desenvolvimento da simbiose, ou seja, houve o reconhecimento de um elicitor específico.

Schwan-Estrada (1997) observou variações nos padrões de atividade de enzimas celulolíticas nas raízes de *Eucalyptus urophylla* em interação com o isolado compatível (isolado de eucalipto - 1604) e incompatível (isolado de *Pinus* - 185) do fungo ectomicorrízico *P. tinctorius*. A maior produção de enzimas celulolíticas, endo e exo β -1,4 glucanases e β -glucosidase, ocorreu na interação com o isolado de eucalipto (1604) 12 horas após a inoculação. A atividade das enzimas celulolíticas foi menor na interação com o isolado 185, ocorrendo 24 horas (endo β -1,4 glucanase) e 48 horas (exo β -1,4 glucanase e β -glucosidase) após a inoculação. O atraso na produção de enzimas celulolíticas na simbiose incompatível foi atribuída possivelmente à necessidade de ativação de mecanismos de indução enzimática e à necessidade de algum fator de reconhecimento específico. O estímulo da produção de enzimas celulolíticas nos estágios iniciais da interação, provavelmente corresponderiam a etapa de penetração fúngica no sistema radicular da planta hospedeira.

Albrecht et al (1994a) demonstraram a indução da atividade da quitinase em raízes de *Eucalyptus globulus* durante a colonização pelo fungo ectomicorrízico *P. tinctorius*. Durante a colonização micorrízica, a atividade da quitinase é estimulada entre 12 a 18 horas após a inoculação e permanece em níveis maiores por sete dias independente das condições de cultura. A intensidade da atividade da quitinase relacionou-se à intensidade da agressão fúngica. Comparando-se padrões eletroforéticos da quitinase induzida por isolados fúngicos mais ou menos compatíveis com eucalipto, verificou-se que uma forte estimulação da quitinase ocorria nas interações bem sucedidas, que

evoluíram rapidamente para a infecção micorrízica e formação de estruturas simbióticas bem diferenciadas. Esse estímulo diferencial era aparentemente controlado pela natureza dos elicitores fúngicos ou pela quantidade de elicitores liberados mais que pelo próprio processo de infecção. A atividade da quitinase contribuiu para a infecção, ou por facilitar a troca de metabólitos, conforme sugerido por Sauter & Hager (1989) ou por atuar em moléculas vegetais endógenas, sendo requerida para a diferenciação de tecidos ectomicorrízicos específicos como a formação e diferenciação de raízes secundárias, o alongamento radial das células corticais, etc. O papel da quitinase como indutor de diferenciação e organogênese nas plantas foi proposto recentemente por De Jong et al (1993). O papel da quitinase na infecção micorrízica, no entanto, ainda não foi avaliado, assim como a sensibilidade dos fungos ectomicorrízicos a esta enzima. As atividades da quitinase e peroxidase foram também avaliadas em raízes de *Eucalyptus bicostata* durante a colonização por *Pisolithus* sp. (Albrecht et al, 1994b). Dez isolados fúngicos, variando de colonizadores ruins a bons colonizadores foram selecionados para representar um gradiente de agressividade micorrízica. A indução da atividade de peroxidases e quitinases esteve fortemente relacionada à agressividade do isolado fúngico. Apenas bons colonizadores, ou seja, isolados que formavam micorrizas diferenciadas rapidamente, induziram uma resposta forte na planta. Dessa forma, concluiu-se que essas enzimas não são responsáveis pela baixa colonização radicular apresentada pelos isolados menos agressivos. Ao contrário, parecem favorecer uma maior colonização pelos isolados mais eficientes. As enzimas peroxidase e quitinase são induzidas por estresses bióticos e abióticos, no entanto seu efeito sobre os fungos ectomicorrízicos não foi determinado. Discutiu-se o papel da quitinase como possível indutora da diferenciação e organogênese de estruturas ectomicorrízicas e da peroxidase como importante para a deposição de barreiras de lignina e outros polímeros fenólicos que serviriam como barreira física contra o crescimento excessivo do fungo no córtex radicular, além de poder também participar ativamente dos

processos de diferenciação de estruturas relacionadas à simbiose. Em um estudo semelhante, a atividade quitinolítica em raízes de *Pinus* e eucalipto foi avaliada por Hodge et al (1995) após a inoculação das plantas com o fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* e os fungos patogênicos *Heterobasidium annosum* e *Phytophthora cinnamomi*. Os níveis de β -N-acetilglucosaminidase foram também avaliados. A β -N-acetilglucosaminidase hidrolisa as unidades N,N'-diacetilquitobiose resultantes da hidrólise da quitina pela exoquitinase liberando a N-acetilglucosamina. A atividade dessa enzima tem várias funções, incluindo o processamento da parede em fungos e plantas, a nutrição fúngica e o processamento de glicoproteínas. Dessa forma, embora não seja uma quitinase, é parte de um sistema quitinolítico binário requerido para a hidrólise da quitina a seus monômeros constituintes. As raízes de *Pinus* e eucalipto, ao contrário do observado nos estudos anteriores, apresentaram aumento na atividade da β -N-acetilglucosaminidase, endoquitinase e exoquitinase apenas quando inoculadas com *H. annosum*. Não houve resposta à inoculação de *P. tinctorius* ou *P. cinnamomi*. Foi discutida a importância da β -N-acetilglucosaminidase como enzima necessária aos mecanismos de defesa da planta e o efeito indutor de *H. annosum* devido ao alto conteúdo de quitina de sua parede celular. A inexistência de efeito elicitor de *P. tinctorius* foi explicada por uma possível baixa atividade metabólica do micélio durante os experimentos, o que levou a resultados discordantes dos trabalhos anteriores.

Buscando localizar na interface ectomicorrízica o sítio de ação de algumas das enzimas cuja atividade é estimulada durante a simbiose, Hodge et al (1996) procuraram testar uma variedade de estratos fluorogênicos para sua habilidade em localizar a atividade quitinolítica em ectomicorrízicas formadas pelo fungo *Fagus sylvatica*. A atividade da exoquitinase e β -N-acetilglucosaminidase foi largamente associada ao fungo e detectadas no manto, na rede de Hartig e secretadas extracelularmente pelo fungo ectomicorrízico. No entanto, comparações com os trabalhos anteriores assim como discussões em torno do significado dos resultados obtidos não foram conclusivas.

Com relação à atividade da peroxidase e o acúmulo de compostos fenólicos, diversos trabalhos demonstram sua importância na regulação da simbiose ectomicorrízica, no entanto, poucos estudos foram feitos utilizando a interação *P. tinctorius*-Eucalipto. Strobel & Sinclair (1991) demonstraram que plântulas de *Pseudotsuga menziensis* inoculadas com *Laccaria bicolor* apresentavam resistência à inoculação posterior do patógeno *Fusarium oxysporum*. A resistência foi correlacionada à produção de infusões flavonólicas marron-amareladas nas células corticais como resultados da ação da peroxidase sobre os flavonóis em processo semelhante à lignificação. Em ectomicorrizas formadas entre *Pinus sylvestris* e *Laccaria laccata*, no entanto, não foi observada alteração na atividade da peroxidase entre planta inoculadas e não inoculadas (Ronald & Soderhall, 1985). Ling-Lee et al (1977), contudo já havia detectado, através do estudo histoquímico de raízes de *Eucalyptus fastigata* micorrizadas e não micorrizadas, o acúmulo de compostos fenólicos nas células epidérmicas e no córtex externo como uma resposta à presença do fungo simbiote. Münzenberger et al (1990) estudaram o acúmulo de compostos fenólicos solúveis e insolúveis em raízes de *Picea abies* inoculadas com *Lactarius deterrinus* e com *Laccaria amethystea*. Foi verificada uma menor quantidade de compostos fenólicos solúveis nas plantas micorrizadas em relação às não inoculadas. Concluiu-se que estes compostos solúveis, de baixo peso molecular podiam ter sido imobilizados por polimerização em resposta à presença do simbiote fúngico possibilitando que os níveis de compostos fenólicos polimerizados observados em análises histoquímicas, sejam aumentados como visualizado por Ling-Lee et al (1977). Weiss et al (1997) encontrou, ao contrário, aumentos na concentração de compostos fenólicos solúveis (Catechina e epicatechina) e compostos fenólicos ligados à parede celular, durante os estágios iniciais do desenvolvimento da simbiose ectomicorrízica entre *Larix decidua* e *Suillus tridentinus* ou *Boletinus cavipes*. As diferenças observadas em relação aos resultados dos outros trabalhos foram justificadas pelo uso de interações distintas entre plantas hospedeiras e fungos

ectomicorrízicos e diferenças de compatibilidade entre os simbioses. Münzemberger et al (1997) verificaram que raízes de *Picea abies* e *Larix decidua* micorrizadas apresentavam menor atividade da peroxidase que as plantas não inoculadas. Foram descritas 5 isoenzimas da peroxidase em *Larix decidua* e 8 em *Picea abies*. Isoenzimas específicas com ponto isoelétrico 4,5; 6,2; 5,8 e 6,0 foram quase completamente suprimidas. A supressão específica de peroxidases sugere que o simbionte atua modificando as respostas de defesa da planta. Neste estudo, no entanto, só foram estudadas micorrizas completamente formadas, e nada se pode dizer dos estágios iniciais do seu desenvolvimento. O papel de hormônios vegetais produzidos pelos fungos ectomicorrízicos durante o seu desenvolvimento nas raízes foi considerado como possível fator de supressão na atividade das peroxidases, uma vez que estas são suprimidas em presença de auxinas. A redução na atividade da peroxidase, aparentemente está associada à supressão de algumas isoenzimas. Segundo Weiss et al (1997), a extensão da colonização dos tecidos radiculares durante o desenvolvimento da simbiose micorrízica pode ser controlada por um aumento nos níveis de fenilpropanóides como flavanonas e compostos fenólicos ligados à parede celular. Estes compostos podem aumentar o efeito da barreira química contra o ataque fúngico, reduzindo a digestibilidade da parede celular. A lignificação ou a suberização, promovidas através da ação da peroxidase, pode completar essa proteção. Weiss et al (1999) analisaram ainda o acúmulo de fenilpropanóides em *Abies alba*, *Picea abies*, *Pinus strobus*, *Pinus sylvestris* e *Pseudotsuga menziesii*. Foi observado que a colonização pelo simbionte fúngico se correlacionou com o padrão de distribuição dos fenilpropanóides nas raízes, sugerindo que estes compostos exercem um papel essencial na restrição do crescimento fúngico dentro da raiz.

Muitos dos resultados obtidos são ainda isolados e muitas vezes contraditórios. Maiores estudos se mostram necessários com o objetivo de elucidar o papel específico de cada uma das enzimas ativadas nos diversos estágios do desenvolvimento da simbiose, qual o sítio de ação dessas enzimas,

quais os elicitores fúngicos ou vegetais responsáveis pela sua indução na raiz, que produtos da ação dessas enzimas são ativos na regulação da simbiose, e onde essas substâncias atuam na interface ectomicorrízica. Estas são algumas das questões ainda não respondidas. Além disso, estudos moleculares sobre a regulação da simbiose estão apenas no início e diversas substâncias incluindo oligossacarídeos, lecitinas, compostos fenólicos, glicoproteínas, etc. podem ainda vir a ser envolvidos no processo. O conhecimento de quais são as substâncias ativas e importantes em cada estágio da colonização ectomicorrízica permitirá a compreensão da simbiose, diferenciação dos isolados ou espécies mais efetivos para cada situação ou hospedeiro e a possibilidade de melhoramento ou modificação genética de isolados e/ou hospedeiros com vistas a obter simbiontes mais adaptados ou mais efetivos para um objetivo particular.

3. ATIVIDADE DAS ENZIMAS VEGETAIS β -1,3 GLUCANASE, QUITINASE E PEROXIDASE NA SIMBIOSE ENTRE DOIS ISOLADOS DE *Pisolithus tinctorius* E *Eucalyptus urophylla* IN VITRO.

3.1 Resumo

A colonização das raízes pelos fungos ectomicorrízicos resulta em inúmeros benefícios para a planta hospedeira, no entanto, existem diferentes graus de compatibilidade entre os simbiossiontes. Nas interações incompatíveis, a planta reage à presença do fungo com reações semelhantes às observadas nas interações com fitopatógenos. Não se sabe em que momento ocorre a determinação da incompatibilidade, mas estudos feitos com isolados de *P. tinctorius* compatíveis e incompatíveis com *E. urophylla* têm buscado determinar os fatores necessários para o desenvolvimento de simbioses eficientes.

Este trabalho procurou determinar se existem alterações na atividade das enzimas β -1,3-glucanase, quitinase e peroxidase em plântulas de *E. urophylla* inoculadas com um isolado compatível (1604) e incompatível (185) de *P. tinctorius*. As raízes das plântulas de *E. urophylla*, não inoculadas e inoculadas com cada um dos isolados de *P. tinctorius*, foram coletadas após 6, 12, 24 e 72 horas da inoculação. Foi verificada a atividade das enzimas β -1,3-glucanase, quitinase e peroxidase e, nestes mesmos períodos, foi feita a dosagem do ergosterol nos tecidos para avaliar a biomassa fúngica presente nas raízes.

A infecção e colonização das raízes pelo isolado 1604 foi mais rápida que as apresentadas pelo isolado 185. Não foram observadas alterações na atividade da β -1,3-glucanase. A atividade da quitinase foi reduzida 72 horas

após a inoculação com o isolado 1604 e a atividade da peroxidase foi reduzida nas plantas inoculadas com qualquer dos isolados. A atividade da peroxidase foi induzida, transitoriamente, 6 horas após a inoculação com o isolado 1604. No entanto esta indução não reduziu seu desenvolvimento nas raízes.

3.2 Summary: CHITINASE, β -1,3-GLUCANASE E PEROXIDASE ACTIVITIES IN *E. urophylla* ROOTS INOCULATED WITH TWO ISOLATES OF *P. tinctorius* IN VITRO.

Specificity is not generally observed in mycorrhizal associations but different degrees of compatibility between the symbionts may occur. In incompatible interactions, the plant reacts against infection with structural and biochemical defenses like in the pathogenic interactions. Recently, interactions between *P. tinctorius* and *E. urophylla* have been used in studies of the factors involved in compatibility.

This study investigated the initial stages of ectomycorrhizal infection in compatible and incompatible interactions between *P. tinctorius* and *E. urophylla* to determine the plant reaction. *E. urophylla* seedlings were inoculated with a compatible (1604) and a incompatible (185) isolate of *P. tinctorius* and enzymatic activities of β -1,3-glucanase, chitinase and peroxidase were evaluated at 6, 12, 24 and 72 hours after inoculation. Simultaneously, ergosterol analysis was made to measure fungal colonization. Isolate 1604 infected and colonized roots faster than isolate 185, confirming its compatibility with *E. urophylla*. β -1,3-glucanase activity did not change during the course of infection, but chitinase was reduced 72 hours after inoculation with isolate 1604. Peroxidase activity was reduced on the roots of inoculated plants, but plants inoculated with isolate 1604 had an induction of its activity at 6 hours after inoculation. This induction did not reduce colonization by the isolate 1604.

3.3 Introdução

Em muitas espécies de plantas, a resposta à infecção por bactérias, vírus e fungos patogênicos ou a vários estresses abióticos é acompanhada pela síntese de uma variedade de proteínas, muitas delas chamadas PR proteínas ou “Pathogenesis related proteins” (Van Loon, 1985; Niderman et al, 1995). Dois grupos de PR proteínas, com suas funções catalíticas conhecidas, PR2: com atividade de β -1,3-glucanase e PR3: com atividade quitinolítica e de lisozimas (Niderman et al, 1995), tiveram demonstrada sua atividade antifúngica em diversos bioensaios *in vitro* principalmente quando combinadas (Benhamou et al, 1990; Daugrois et al, 1990; Schlumbaum et al, 1986; Sela-Buurlage et al, 1993; Ji & Kúć, 1996; Yi & Hwang, 1996; Mohr et al, 1998). Uma vez que os substratos destas enzimas, β -1,3 glucana e quitina, são os principais componentes da parede celular fúngica, sua ação na resistência à penetração e crescimento do fungo nas plantas tem sido considerada importante. Foi proposto que a β -1,3 glucanase e a quitinase afetam o crescimento fúngico por lise dos ápices das hifas ou interferindo com o balanço correto entre a síntese da parede celular fúngica e a hidrólise da parede durante o crescimento da hifa (Ji & Kúć, 1996). Além disso, a ação das quitinases e β -1,3 glucanases sobre o micélio fúngico libera oligossacarídeos que funcionam como elicitores nas células vegetais levando à ativação de outros mecanismos locais ou sistêmicos de resistência das plantas.

Em interações compatíveis, onde o microrganismo vive e se replica no tecido hospedeiro, a elicitação de respostas de defesa é evitada ou, se são induzidas, presumivelmente elas são toleradas ou inativadas. Os simbioses e os patógenos empregam estratégias diferentes para lidar com as defesas da planta. Embora os fungos patogênicos rapidamente provoquem a indução dos mecanismos de defesa, eles podem ser insensíveis aos compostos de defesa induzidos, podem se adaptar a eles ou inativá-los. Aparentemente, os fungos endomicorrízicos não induzem as repostas de defesa das plantas

como verificado em diversos estudos envolvendo enzimas de defesa como a peroxidase, a β -1,3-glucanase e a fenilalanina amônia-liase.

As peroxidases (H_2O_2 óxido-redutases) são comuns nas plantas. Oxidam uma variedade de compostos fenólicos e têm sido implicadas em muitos processos fisiológicos, como incorporação de compostos fenólicos nas paredes celulares e lignificação (Gaspar et al, 1991 citado por Münzenberger et al, 1997). A peroxidase promove o enrijecimento da parede celular através da oxidação de compostos fenólicos, protegendo os polissacarídeos da parede contra o ataque de enzimas. Nas interações planta-patógeno, compostos como fenóis, lignina e suberina são acrescentados à parede celular atuando como barreira física contra o ataque microbiano (Pascholati & Leite, 1994). Em consequência, aumentos na atividade da peroxidase estão freqüentemente presentes após interações planta-patógeno, indicando que esta enzima está envolvida na indução da resistência vegetal. Spanu & Bonfante-Fasolo (1988) verificaram um aumento na atividade da peroxidase em raízes de *Allium porrum* inoculadas com *Glomus versiforme*. A maior atividade foi observada durante os estágios iniciais da penetração fúngica. Após o estabelecimento da infecção, no entanto, a atividade foi reduzida aos mesmos níveis das raízes não inoculadas. Este aumento na atividade da peroxidase foi atribuído a uma reação do hospedeiro ao início da infecção, ou a uma irritação inespecífica. Resultados semelhantes foram obtidos por Lambais & Mehdy (1993) na simbiose entre plântulas de feijão e *Glomus intraradices*. A atividade de duas isoformas da quitinase foi aumentada nos estágios iniciais da interação e suprimida, principalmente no período de maior crescimento intraradicular das hifas. Segundo Lambais & Mehdy (1995), a expressão diferencial de genes relacionados às defesas vegetais pode contribuir para o controle do crescimento e desenvolvimento das micorrizas arbusculares. Algumas estratégias para evitar as defesas das plantas foram descritas em sistemas patogênicos. Mohr et al (1998) demonstrou que o processamento proteolítico da quitinase é parte de uma estratégia de inativação das defesas da planta em interações compatíveis entre feijão e *Fusarium*

solani. No entanto, os mecanismos pelos quais a expressão dos genes vegetais é modulada nas interações micorrízicas ainda não foram compreendidos. Dois possíveis mediadores de mecanismos de sinalização são os fito-hormônios e moléculas supressoras.

Recentemente, a simbiose entre isolados de *Pisolithus tinctorius* e eucalipto tem sido utilizada no estudo dos fatores que levam à compatibilidade. Malajczuk et al (1990) procuraram comparar o processo de formação micorrízica em eucalipto por dois isolados do fungo *P. tinctorius*: um isolado de eucalipto e um isolado de *Pinus*. Os isolados de eucalipto iniciaram a colonização dois dias após a inoculação enquanto os isolados de *Pinus* iniciaram a colonização apenas sete dias após a inoculação. Em função das diferenças de compatibilidade entre estes dois isolados de *P. tinctorius* e eucalipto, estas interações têm se mostrado úteis no estudo das diferenças entre interações compatíveis e incompatíveis buscando determinar os fatores necessários à compatibilidade da simbiose. Albrecht et al (1994a) demonstraram a indução da atividade da quitinase em raízes de *Eucalyptus globulus* durante a colonização pelo fungo ectomicorrízico *P. tinctorius*. Durante a colonização micorrízica, a atividade da quitinase é estimulada entre 6 a 12 horas após a inoculação e permanece em níveis maiores por sete dias independente das condições de cultura. A intensidade da atividade da quitinase relacionou-se à intensidade da agressão fúngica. Comparando-se padrões eletroforéticos da quitinase induzida por isolados fúngicos mais ou menos compatíveis com eucalipto, verificou-se que uma forte estimulação da quitinase ocorria nas interações bem sucedidas, que evoluíram rapidamente para a infecção micorrízica e formação de estruturas simbióticas bem diferenciadas. As atividades da quitinase e peroxidase foram também avaliadas em raízes de *Eucalyptus bicostata* durante a colonização por *Pisolithus* sp. (Albrecht et al, 1994b). Dez isolados fúngicos, variando de ruins a bons colonizadores foram selecionados para representar um gradiente de agressividade micorrízica. A indução da atividade de peroxidases e quitinases

esteve fortemente relacionada à agressividade do isolado fúngico. Apenas bons colonizadores, ou seja, isolados que formavam micorrizas diferenciadas rapidamente, induziram uma resposta forte na planta. Discutiu-se o papel da quitinase como possível indutora da diferenciação e organogênese de estruturas ectomicorrízicas. A peroxidase foi considerada importante para a deposição de barreiras de lignina e outros polímeros fenólicos que serviriam como barreira física contra o crescimento excessivo do fungo no córtex radicular, além de poder também participar ativamente dos processos de diferenciação de estruturas relacionadas à simbiose.

Muitos dos resultados obtidos são ainda isolados e muitas vezes contraditórios (Albrecht et al, 1994 a,b; Hodge et al 1995, 1996). Maiores estudos se mostram necessários para elucidar o papel específico de cada uma das enzimas ativadas nos diversos estágios do desenvolvimento da simbiose. Portanto, este trabalho tem como objetivos determinar a atividade enzimática da quitinase, β -1,3-glucanase e peroxidase na simbiose entre *P. tinctorius* e *E. urophylla*, nos estágios iniciais da interação, visando verificar alterações importantes em função da compatibilidade ou incompatibilidade da simbiose.

3.4 Material e métodos

Foram utilizados os isolados de *P. tinctorius* 1604 (isolado de basidiocarpo associado a *Eucalyptus grandis*) e 185 (isolado de basidiocarpo associado a *Pinus taeda*). O isolado 185, mantido no Laboratório de Patologia Florestal do Departamento de Fitopatologia, Entomologia e Zoologia Agrícola - ESALQ, USP, foi obtido da coleção do Dr. D. H. Marx, do USDA Forest Service - Forestry Sciences Laboratory, Athens, Georgia - EUA.

Todos os isolados foram cultivados em placas de petri contendo o meio Melin-Norkrans (MNM) (Marx, 1969), modificado segundo Wong & Fortin (1989) e incubados a 27°C durante 30 dias. Para o preparo do inóculo, um disco do micélio fúngico foi retirado e colocado em placa de petri com 9 cm de diâmetro contendo meio BDA (agar batata dextrose) coberto com uma folha de

papel de filtro esterilizada. Após 30 dias de crescimento, a 27°C, no escuro, o papel de filtro, coberto com o micélio, foi retirado e utilizado para inocular as raízes das plântulas de *E. urophylla* segundo a técnica do papel sanduíche (Chilvers et al, 1986).

Foram utilizadas sementes de *E. urophylla* fornecidas pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) - ESALQ, Piracicaba. As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 30 segundos e lavadas com água destilada esterilizada. Após a desinfestação, as sementes foram germinadas em placas de petri, contendo meio Pachlewsky modificado segundo Albrecht et al (1994a), por 5 dias, em fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuro a 22°C. As sementes contaminadas foram eliminadas e as plântulas foram transferidas assepticamente para as placas de crescimento. Nesta etapa, as plântulas permaneceram por 30 dias em placas de petri com 9 cm de diâmetro, contendo meio Pachlewsky coberto com papel de filtro esterilizado (uma planta por placa). Para evitar o ressecamento, outra folha de papel de filtro estéril foi colocada sobre as raízes. As plântulas foram mantidas em fotoperíodo 16 horas de luz/8 horas de escuro a 22°C. Todas as placas foram envolvidas em filme plástico e as plantas contaminadas neste período foram eliminadas.

Após 30 dias de incubação, cada plântula foi inoculada através da cobertura das raízes, assepticamente, com o papel de filtro onde foram crescidos previamente os isolados fúngicos, como descrito por Chilvers et al (1986). As plântulas controle, não inoculadas, tiveram suas raízes cobertas com papel de filtro estéril.

As raízes de *E. urophylla* foram coletadas 0, 6, 12, 24 e 72 horas após a inoculação. As amostras foram pesadas, e congeladas imediatamente em "freezer" a -20°C.

Cada amostra foi avaliada quanto à colonização das raízes e quanto à atividade das enzimas quitinase, β -1,3 glucanase e peroxidase. Para cada período de coleta das raízes foram feitas 5 repetições em delineamento

inteiramente casualizado. Cada repetição constou de 4 placas com uma plântula por placa, totalizando 20 plântulas por tratamento. As raízes das 4 plântulas de cada repetição foram coletadas e misturadas para obtenção de material suficiente para as avaliações bioquímicas.

A colonização radicular foi quantificada pela dosagem do ergosterol presente nas raízes, segundo o método de Salmonowicz & Nilund (1988). O padrão de comparação entre a dosagem de ergosterol e a quantidade de micélio foi obtida pela quantificação do ergosterol em cultura pura dos isolados 185 e 1604 em meio MNM líquido, cultivados a 27°C por 30 dias. O micélio foi filtrado em papel de filtro Watman nº 41 e seco em estufa a 40-45°C até peso constante. A quantificação do ergosterol foi feita em 10, 20, 30 e 40 mg do micélio, para elaboração da curva padrão peso do micélio x µg de ergosterol/500 µl (**Apêndice 1**).

Para a dosagem de ergosterol nas raízes de *E. urophylla* e no micélio fúngico, estes materiais foram macerados em almofariz contendo ác. pirogálico e 4 ml de etanol 95°. Após duas horas de repouso, o material foi saponificado com KOH 60% em banho maria (90°C) por 30 minutos no escuro. O sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo onde foi lavado duas vezes com hexana. Toda hexana retirada foi misturada e evaporada em banho maria a 60°C. O ergosterol obtido neste processo foi ressuspenso em 1 ml de metanol, filtrado em filtro de seringa 0.45µm e dosado em cromatógrafo HPLC equipado com coluna para detecção de ergosterol (Supelcosil LC-18, 15,0 cm x 4,6 mm) a 282 nm e fluxo de 1 ml de metanol/min. Os resultados obtidos (**Apêndice 2**) foram comparados à curva padrão para a obtenção dos valores em mg de micélio/grama de peso fresco da raiz.

Para obtenção do extrato protéico, amostras de raízes e micélio foram homogeneizadas em almofariz de porcelana com 4,0 ml do tampão de extração, fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) (Albrecht et al, 1994). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 20000g por 25 minutos a 4°C.

A avaliação da atividade da quitinase foi feita através da liberação de fragmentos solúveis de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta - "CM-Chitin-RBV" (Wirth & Wolf, 1990). A mistura da reação foi composta de 200 µl do extrato protéico, 600 µl do tampão de extração e 200 µl do substrato "CM-Chitin-RBV" (2,0 mg/ml). Após a incubação por 20 minutos a 40°C, a reação foi paralisada com a adição de 200 µl de HCl 1,0 M e, em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 5000g e 4°C. A absorbância do sobrenadante a 550 nm foi determinada tendo-se tampão de extração na cubeta de referência. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância/min/mg de proteína da amostra, descontando-se os valores de absorbância do controle (800 µl de tampão e 200 µl do substrato "CM-Chitin-RBV").

A atividade das β -1,3 glucanases foi determinada pela quantificação colorimétrica da glicose liberada a partir da laminarina através do uso da hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico (HAPHB) (Lever, 1972).

A mistura da reação foi composta de 100 µl de tampão de extração, 200 µl do extrato protéico e 200 µl de laminarina (4,0 µg/ml) (Abeles & Forrence, 1970). A mistura foi incubada a 40°C por uma hora e, em seguida, foram acrescentados 1,5 ml de HAPHB (0,5 g dissolvidos em 10 ml de HCl 0,5 M, acrescidos de 50 ml de NaOH 0,5 M). A mistura foi aquecida a 100°C por 5 minutos e resfriada em gelo até 30 °C. Foram avaliadas as absorbâncias das amostras a 410 nm contra tampão de extração, subtraindo-se o valor correspondente ao controle (amostras idênticas não incubadas a 40°C). Foram feitas 3 replicatas das amostras e duas das amostras de referência (brancos), sendo utilizados os valores médios para os cálculos. As leituras de absorbância foram comparadas com a curva padrão de concentrações de glicose em função da absorbância: $y = 0,0518 + 0,0325x$ ($r^2 = 0,9950$) (Stangarlin, 1995). Os resultados foram expressos em µg de glicose/min/mg de proteína.

A atividade da peroxidase foi determinada através do método espectrofotométrico direto (Hammerschmidt et al, 1982). A mistura da reação

foi composta por 2,9 ml de uma solução contendo 250 µl de guaiacol e 306 µl de peróxido de hidrogênio em 100 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0) e 100 µl do extrato protéico. A cubeta de referência constou de 3 ml da solução de guaiacol e 100 ml do tampão fosfato de sódio. A reação foi acompanhada em espectrofotômetro a 470 nm por 5 minutos e os resultados foram expressos em Δ de unidades de absorbância/min/mg de proteína.

A atividade enzimática das amostras foi determinada em função do seu conteúdo total de proteínas determinado de acordo com o método de Bradford (1976). Foram misturados 0,8 ml do extrato protéico e 0,2 ml do reagente de Bradford concentrado. Após 5 minutos foi feita a absorbância a 595 nm e a concentração de proteínas de cada amostra foi expressa em equivalentes µg de soro albumina bovina em 0,8 ml de amostra, determinada utilizando-se uma curva padrão de concentrações variando de 0 a 25 µg de albumina bovina/0,8 ml, $y = 0,0382 + 0,0524x$ ($r^2 = 0,9997$) (Stangarlin, 1995). Foram feitas 2 replicatas por amostra e utilizados os valores médios nos cálculos.

3.5 Resultados e discussão

Após a inoculação das plântulas de *E. urophylla*, com os dois isolados de *P. tinctorius*, foi possível verificar visualmente a agregação mais rápida do micélio do isolado 1604 (isolado de eucalipto) às raízes. Em 24 horas as raízes se apresentavam cobertas pelas hifas, assim como o papel de filtro em torno, evidenciando algum tipo de reconhecimento entre as raízes e as hifas (**Figura 3.1**). Nas plântulas inoculadas com o isolado 185 de *P. tinctorius*, só foi possível a observação de hifas aderidas às raízes após 72 horas. Essa observação foi feita também por Malajczuk et al (1990) que, estudando as raízes inoculadas sob microscópio estereoscópico, verificaram que as raízes de *E. urophylla* inoculadas com *P. tinctorius*, isolado de eucalipto, iniciavam a colonização entre 3 e 6 horas após a inoculação e as hifas envolviam completamente as raízes após 3 dias. As plântulas inoculadas com *P. tinctorius*

isolado de *Pinus* só se tornavam micorrizadas após 7 dias da inoculação. Essa observação indica que fatores de reconhecimento provavelmente estão presentes nos estágios iniciais do desenvolvimento destas ectomicorrizas, ainda durante seu crescimento assimbiótico e na adesão.

A detecção bioquímica da biomassa fúngica nas raízes, evidenciou também, a micorrização mais rápida e abundante das raízes de *E. urophylla* pelo isolado 1604 (**Figura 3.2**). O isolado 185 apresentou um desenvolvimento mais lento, iniciando o maior crescimento da biomassa fúngica a partir de 72 horas após a inoculação (**Figura 3.2**). O aumento da velocidade do seu crescimento na raiz após 72 horas sugere que até este período um fator importante está atuando na redução de sua agressividade. Aparentemente, este fator não atuou sobre o isolado 1604, que ao contrário, mostrou um desenvolvimento rápido desde seu primeiro contato com a raiz, estabelecendo uma relação linear entre a produção de biomassa fúngica na raiz e o tempo.

Analisando-se as equações relativas a biomassa fúngica na raiz, verifica-se que após 96 horas da inoculação, os isolados 185 e 1604 se desenvolveram em ritmo semelhante na raiz. O isolado 1604 apresentou um aumento de biomassa, entre 96 e 144 horas, de 11,23 mg/g de raiz e o isolado 185, de 10,43 mg/g de raiz. Aparentemente a fase inicial do desenvolvimento destes fungos na raiz são determinantes para o atraso no desenvolvimento do isolado 185.

Figura 3.1 Crescimento do micélio de *P. tinctorius* nas raízes de *E. urophylla* 24 horas após a inoculação. **A e B** - Plântulas inoculadas com o isolado 185 (incompatível). Com a retirada do papel (B), verifica-se que o micélio não está aderido às raízes. **C e D** - Plântulas inoculadas com o Isolado 1604 (compatível), verifica-se grande quantidade de micélio aderido às raízes e ao papel de filtro (D) (setas).

Figura 3.2 Quantidade de micélio de *P. tinctorius*, isolados 1604 (□) (compatível) ($F=0,02$) e 185 (Δ) (incompatível) ($F=0,002$), presente em raízes de *E. urophylla* e testemunha (○), representada por raízes não inoculadas ($F=0,43$).

Valores basais, relativos à dosagem de ergosterol, foram observados nas raízes não inoculadas (**Apêndice 1**). Estes valores, no entanto, foram muito baixos e não mostraram alteração significativa em função do tempo. Possivelmente eles se referem a alguma substância com espectro semelhante ao ergosterol ou a alguma contaminação durante o processo de extração. Como as quantidades foram muito baixas e não significativas, não foram consideradas nos resultados (**Figura 3.2**).

Vários fatores podem estar atuando na fase inicial do desenvolvimento da simbiose levando à diferenças de comportamento entre os dois isolados em contato com as raízes de *E. urophylla*. Segundo Kropp & Anderson (1994) a incompatibilidade pode ser observada antes e depois da invasão do hospedeiro pelo fungo. Exsudatos radiculares atuam na rizosfera (Nair et al, 1991; Siqueira et al, 1991a; Giovannetti et al, 1996; Vierheilig et al, 1998), sítios específicos para adesão às raízes e barreiras químicas contra a penetração atuam na superfície da raiz (Molina & Trappe, 1982; Duddridge, 1987; Kropp & Anderson, 1994) e mecanismos estruturais e bioquímicos como as enzimas vegetais de defesa, atuam no tecido radicular após a penetração (Münzenberger et al, 1997; Weiss, 1999).

A atividade das enzimas β -1,3-glucanases e quitinases não sofreu alterações significativas nas raízes de *E. urophylla* em função do tempo decorrido após a inoculação. Não houve diferenças significativas entre as plântulas inoculadas e a testemunha não inoculada (**Figura 3.3 e 3.4**). Estes resultados diferem dos obtidos por Albrecht et al (1994a) que verificaram a indução da atividade da quitinase em raízes de *Eucalyptus globulus* durante a colonização por *P. tinctorius*. Essa indução ocorreu 6 horas após a inoculação, permaneceu alta por 7 dias e foi maior nas plantas inoculadas com os isolados mais agressivos, onde a colonização foi mais rápida. No entanto, a metodologia utilizada por estes autores permitiu a identificação de duas isoformas da quitinase (eletroforese em gel de poliacrilamida) e apenas a segunda, com menor atividade e maior mobilidade no gel foi induzida. Albrecht et al (1994b) também verificaram a indução da atividade desta mesma isoenzima da quitinase em plântulas de eucalipto inoculadas com vários isolados de *P. tinctorius* 12 a 18 horas após o contato inicial. Desta forma, uma isoenzima específica de baixa atividade foi induzida e não o total das quitinases das raízes.

Figura 3.3 Atividade da β -1,3-glucanase em raízes de *E. urophylla* não inoculadas (O) e inoculadas com os isolados 185 (incompatível) (Δ) e 1604 (compatível) ($\square$) de *P. tinctorius*. Valores médios, resultados de dois experimentos (A e B). Não houveram variações estatisticamente significativas em função do tempo de acordo com o teste F para análise de variância.

Figura 3.4 Atividade da quitinase em raízes de *E. urophylla* inoculadas com os isolados 185 (Δ) (incompatível) e 1604 (□) (compatível) de *P. tinctorius* e em raízes não inoculadas (O). Valores médios. Não houveram variações estatisticamente significativas em função do tempo de acordo com teste F para análise de variância.

A detecção de aumento da atividade de uma isoenzima da quitinase (provavelmente uma quitinase extracelular)(Graham & Sticklen, 1994) torna claro que a dosagem colorimétrica da atividade da quitinase total não permitirá a visualização destas alterações específicas. A dosagem colorimétrica permite apenas a determinação da atividade das quitinases como um todo, portanto, a presença de quitinases vacuolares, existentes em maior quantidade e com maior atividade (Graham & Sticklen, 1994) tornará impossível a visualização de isoenzimas específicas. Provavelmente este é o motivo de não terem sido obtidos resultados semelhantes. Métodos analíticos que permitam o estudo de isoenzimas específicas tornarão mais claras as alterações decorrentes da interação, conforme sugerido por Yi & Hwang (1996).

Figura 3.5 Atividade da quitinase em raízes de *E. urophylla* 72 horas após a inoculação. Tes - raízes não inoculadas. Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente segundo o teste de Tukey ($P=0,05$). Nível de significância ($F=0,012$).

Foi observada uma redução significativa na atividade da quitinase nas plantas inoculadas, em relação à testemunha, 72 horas após a inoculação (**Figura 3.5**). Essa redução foi observada também em interações entre plantas e fungos endomicorrízicos. Spanu et al (1989) observaram uma redução na atividade da quitinase em *A. porrum* inoculado com *G. versiforme*. Lambais & Mehdy (1993, 1995) observaram a redução da atividade a quitinase e β -1,3-glucanase. Essas reduções na atividade ocorreram após o estabelecimento da simbiose e foi considerada a possibilidade da produção de substâncias inibidoras ou supressoras dos mecanismos de defesa da planta visando a manutenção de uma simbiose compatível. O papel de fitohormônios produzidos ou induzidos na planta pelo fungo simbionte foi sugerido como um possível fator regulador da atividade das PR proteínas. Outros mecanismos utilizados pelos fungos patogênicos como a produção de proteases (Lange et al, 1996) que destroem as quitinases na planta hospedeira compatível, devem

ainda ser investigados em simbioses ectomicorrízicas. O estudo da transcrição de genes das PR proteínas nas raízes inoculadas pode determinar se a supressão ocorre através da ação direta sobre a enzima ou através da regulação da transcrição genética, como observado nas simbioses endomicorrízicas (Lambais & Mehdy, 1995).

A atividade da peroxidase foi reduzida significativamente nas plantas inoculadas com os dois isolados de *P. tinctorius* em dois experimentos consecutivos (**Figuras 3.6 e 3.7**). Essa redução na atividade foi maior 72 horas (**Figura 3.8**) após a inoculação e, em um dos experimentos, verificou-se ainda uma atividade significativamente maior da peroxidase nas plantas inoculadas com o isolado 1604 (**Figura 3.8**). Este aumento da atividade foi observado 6 horas após a inoculação, no entanto, após este período, a tendência foi de redução da atividade. A produção de supressores, proteases, hormônios vegetais e inibidores pode ser responsável pela redução na atividade como observado em sistemas endomicorrízicos e fitopatogênicos (Spanu et al, 1989; Lange et al, 1996). O aumento da atividade da peroxidase no início da interação (6 horas após a inoculação) pode ser uma reação da planta à penetração inicial do fungo na raiz. Aparentemente a planta inicia uma reação de defesa que não é mantida, permitindo o estabelecimento da simbiose.

A partir de 12 horas, a redução na atividade é constante enquanto o fungo se desenvolve rapidamente na raiz, como visualizado através da determinação da biomassa fúngica (**Figura 3.2**). Aumentos na atividade da peroxidase foram também verificados por Albrecht et al (1994b). Estes aumentos foram observados 24 horas após a inoculação e embora os mesmos métodos tenham sido usados na determinação da atividade da peroxidase, Albrecht et al (1994b) não observaram a redução na atividade após este período e sim um aumento da atividade correlacionado positivamente com o aumento na biomassa fúngica na raiz. Albrecht et al (1994b) utilizaram como planta hospedeira *Eucalyptus globulus bicostata* e diversos isolados de *Pisolithus sp.*

Figura 3.6 Atividade da peroxidase em raízes de *E. urophylla* inoculadas com os isolados 185 (Δ) (incompatível) e 1604 ($\square$) (compatível) de *Pisolithus tinctorius* e em raízes não inoculadas (O), (Primeiro experimento). As variações em função do tempo foram estatisticamente significativas apenas para as plantas inoculadas com o isolado 1604 ($F=0,03$).

Figura 3.7 Atividade da peroxidase em raízes de *E. urophylla* inoculadas com os isolados 185 (Δ) (incompatível) e 1604 (□) (compatível) de *Pisolithus tinctorius* e em raízes não inoculadas (O), (Segundo experimento). As variações em função do tempo foram estatisticamente significativas para as plantas inoculadas com o isolado 1604 ($F=0,02$) e 185 ($F=0,004$). As plantas não inoculadas não apresentaram alterações significativas em função do tempo.

Figura 3.8 Atividade da peroxidase em raízes de *E. urophylla* inoculadas com os isolados 185 e 1604 de *P. tinctorius* e em plantas não inoculadas (Tes), 6 e 72 horas após a inoculação. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($P=0,01$). 6 horas ($F= 0,006$; $DMS=2,76$), 72 horas ($F = 0,00029$; $DMS = 1,20$).

Possivelmente estas interações se comportaram de maneira diferente da simbiose entre *E. urophylla* e *P. tinctorius*. Experimentos comparativos se mostram necessários para a elucidação destes aspectos da simbiose ectomicorrízica. No presente trabalho, o aumento inicial da atividade da peroxidase seguido da redução da atividade a níveis mais baixos que os observados nas plantas não inoculadas é semelhante ao observado nas simbioses ectomicorrízicas onde a reação inicial da planta é suprimida quando a simbiose se estabelece (Spanu & Bonfante-Fasolo, 1988).

Embora não tenham sido detectadas alterações na atividade da β -1,3-glucanase neste trabalho, a atividade da peroxidase e da quitinase mostrou tendência à redução com o desenvolvimento da simbiose, possivelmente por supressão dos mecanismos de defesa da planta mediada pelo fungo simbionte. A adição de grande quantidade de micélio às raízes através da técnica do papel sanduíche (Chilvers et al, 1986) (**Figura 3.1**), pode contribuir para um maior acréscimo de produtos fúngicos como hormônios, elicitores e supressores que podem atuar na inibição da atividade destas enzimas.

3.6 Conclusões

O isolado 1604 de *P. tinctorius* apresentou infecção e colonização das raízes mais rápidas que as apresentadas pelo isolado 185, indicando uma maior compatibilidade com *E. urophylla*.

O crescimento do isolado 185 nas raízes de *E. urophylla* foi muito lento até 72 horas. Em seguida foi acelerado, indicando que existe algum fator, presente nos estágios iniciais da interação, exercendo uma inibição sobre seu desenvolvimento.

Não houve alterações na atividade da β -1,3-glucanase durante o estabelecimento da simbiose. No presente trabalho, não foi possível verificar relação entre a atividade desta enzima e a micorrização.

A redução na atividade da quitinase nas raízes 72 horas após a inoculação, indica um efeito inibitório da micorrização sobre esta enzima, principalmente pelo isolado compatível.

A atividade da peroxidase foi aumentada nas primeiras 6 horas da interação com o isolado 1604, mais agressivo, indicando haver uma relação entre a atividade desta enzima e a simbiose com o isolado compatível. Possivelmente, ocorre uma reação inicial da planta à penetração que, no entanto, não se mantém. Após esta indução, ocorre a inibição da atividade da enzima até 72 horas indicando uma relação positiva entre o aumento da biomassa fúngica nas raízes e a inibição da atividade da peroxidase. Essa

inibição ocorre também nas raízes inoculadas com o isolado 185, não dependendo, portanto da compatibilidade ou não do fungo simbiote. É possível que haja produção de inibidores por este fungos.

4. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE A INFECÇÃO ECTOMICORRÍZICA POR DOIS ISOLADOS DE *Pisolithus tinctorius* EM *Eucalyptus Urophylla* IN VITRO.

4.1 Resumo

Devido à grande variedade fisiológica e morfológica entre os fungos ectomicorrízicos, é possível observar variações no seu comportamento durante o estabelecimento da simbiose.

Este trabalho teve como objetivos caracterizar as etapas da infecção micorrízica por dois isolados de *P. tinctorius* em *E. urophylla*, além de verificar a ocorrência de defesas estruturais e bioquímicas na planta. Plântulas de *E. urophylla* foram inoculadas com os isolados de *P. tinctorius* obtidos de eucalipto (1604) ou de *Pinus* (185). Após 0, 12, 24, 72, 96 e 120 horas da inoculação com cada um dos isolados, foi efetuada a dosagem de compostos fenólicos no tecido radicular. Nestes mesmos períodos foram feitos cortes anatômicos das raízes para verificar o desenvolvimento da infecção. Os cortes histológicos não evidenciaram reações estruturais de defesa das plantas nestes períodos testados. No entanto, foi observada colonização mais rápida pelo isolado 1604, o qual iniciou a adesão à raiz 24 horas após a inoculação. O isolado 185 só foi observado na raiz após 96 horas.

A dosagem de compostos fenólicos mostrou variação significativa durante a infecção pelo isolado 185 e maior concentração nas raízes inoculadas com este isolado após 96 horas da inoculação. Porém, este acúmulo não impediu a continuidade de seu desenvolvimento na raiz. Neste trabalho não foi observada relação entre o atraso na infecção pelo isolado 185 e a produção de compostos fenólicos pelas raízes.

4.2 Summary: PHENOLIC COMPOUND PRODUCTION DURING ECTOMYCORRHIZAL INFECTION OF *Eucalyptus urophylla* ROOTS BY TWO ISOLATES OF *Pisolithus tinctorius* IN VITRO.

Physiological and structural diversity of ectomycorrhizal fungi can lead to differences in their behaviour during root infection and colonization. In incompatible interactions, the plant react against infection with structural and biochemical defenses, including production of antifungal compounds like phenolics.

This study investigated the initial stages of ectomycorrhizal infection in compatible and incompatible interactions between *P. tinctorius* and *E. urophylla* to determine the plant reaction. *E. urophylla* seedlings were inoculated with a compatible (1604) or an incompatible (185) isolate of *P. tinctorius*. Extration of phenolic compounds was carried out at 0,12, 24, 72, 96 and 120 hours after inoculation. At the same time, root samples were collected, processed and embedded in glycol methacrylate resin. Sections were studied under ligh microscopy.

Ectomycorrhiza was formed on eucalyptus roots by 96 hours after inoculation with isolate 185 and by 24 hours in plants inoculated with isolate 1604. Structural reactions was not observed by light microscopy. On the other hand, a higher concentration of phenolic compounds in roots inoculated with the isolate 185 was observed 96 hours after inoculation. Although only plants inoculated with isolate 185 showed significative differences in phenolic concentration at the various infection stages, the accumulation of phenols could not be associated to the delay in infection.

4.3 Introdução

Os fungos micorrízicos são de grande importância para o desenvolvimento e a nutrição das plantas superiores. Em relações simbióticas

com diversas espécies vegetais, são capazes de penetrar e colonizar o córtex radicular, formando uma rede micelial que se espalha no solo e absorve água e nutrientes minerais, translocando-os para a raiz (Harley & Smith 1983). No entanto, em virtude da grande variabilidade fisiológica e morfológica existente entre os fungos ectomicorrízicos é possível esperar variações no seu comportamento durante o estabelecimento da simbiose, provocando respostas nas plantas que variam desde uma simbiose bastante eficiente até a ausência de efeitos ou a ocorrência de efeitos deletérios ao crescimento (Harley & Smith 1983).

Embora existam poucas evidências de especificidade entre plantas hospedeiras e fungos micorrízicos, observa-se que pode haver uma maior ou menor compatibilidade nas interações ectomicorrízicas. Nas relações incompatíveis, a planta mostra respostas de defesa que incluem deposição de compostos fenólicos, formação de papila, espessamento das paredes celulares, entre outras. A reação da planta limita o desenvolvimento da simbiose e, conseqüentemente, impede sua efetividade (Molina & Trappe, 1982; Duddridge 1987). Não se sabe ainda em que momento ocorre o reconhecimento entre os simbiossiontes e a determinação da incompatibilidade ou compatibilidade da simbiose ectomicorrízica, mas, provavelmente, os estágios iniciais da interação são os passos principais para o desenvolvimento de uma simbiose eficiente (Malajczuk et al. 1990).

Malajczuk et al. (1990) compararam o processo de formação micorrízica em eucalipto por dois isolados do fungo *Pisolithus tinctorius*, sendo um de eucalipto e outro de *Pinus*. Os isolados de eucalipto iniciaram a colonização dois dias após a inoculação, enquanto os isolados de *Pinus* iniciaram a colonização apenas após sete dias. Aparentemente, os eventos associados com os processos de reconhecimento entre os dois simbiossiontes levaram à discriminação entre os dois isolados e ao desenvolvimento diferencial da simbiose. Lei et al. (1990) conduziram estudos histoquímicos para avaliar as alterações presentes nos diversos estágios do processo de infecção de

eucalipto pelos dois isolados de *P. tinctorius*: o isolado 445 de eucalipto e o isolado 270 de *Pinus*. Foi observado que existem diferenças intraespecíficas entre os fungos ectomicorrízicos, antes classificados como possuidores de ampla faixa de hospedeiros (Molina & Trappe, 1982). Isto justifica a necessidade de trabalhos que expliquem as falhas de programas de inoculação que usaram simbiontes supostamente compatíveis (Lei et al. 1990). Maiores estudos sobre o processo de colonização ectomicorrízica e das reações da planta à infecção são ainda necessários para que se determine em que etapa do desenvolvimento micorrízico se iniciam as reações de incompatibilidade e quais processos se manifestam nas interações compatíveis e incompatíveis, fornecendo as bases para se determinar os fatores necessários ao desenvolvimento de interações micorrízicas mais eficientes. Este trabalho teve como objetivos caracterizar as etapas da infecção micorrízica em interações compatíveis e incompatíveis entre *P. tinctorius* e *E. urophylla* e verificar a ocorrência de defesas estruturais e bioquímicas na planta.

4.4 Material e métodos

Foram utilizados os isolados de *P. tinctorius* 1604 (isolado a partir de *Eucalyptus grandis*) e 185 (isolado a partir de *Pinus taeda*). O isolado 185 foi obtido do USDA Forest Service - USA. Os fungos foram cultivados em meio MNM (Marx, 1969) modificado segundo Wong & Fortin (1989), incubados a 27°C, no escuro, por 30 dias. O inóculo foi preparado crescendo-se os fungos a 27°C, por 30 dias em placas de petri com meio BDA coberto com papel de filtro, segundo a técnica do papel sanduíche (Chilvers et al, 1986). Após o crescimento, o papel de filtro coberto com o micélio foi retirado assepticamente e utilizado na inoculação das plântulas.

Foram utilizadas sementes de *E. urophylla* fornecidas pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), ESALQ, Piracicaba. As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (1 % de cloro ativo), lavadas com água destilada esterilizada e germinadas em placas de petri contendo meio

Pachlewsky modificado (Albrecht et al, 1994a). Após 5 dias, as plântulas livres de contaminantes, foram transferidas assepticamente para placas de petri de 9 cm de diâmetro contendo meio Pachlewsky coberto com papel de filtro (uma planta por placa). As placas foram mantidas em fotoperíodo de 16 horas de luz/ 8 horas de escuro por 30 dias a 22°C e em seguida as plântulas foram inoculadas segundo a técnica do papel sanduíche (Chilvers et al, 1986). As raízes foram coletadas para as análises histológicas e dosagem de compostos fenólicos totais após 0, 12, 24, 72, 96 e 120 horas da inoculação. Todo o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado.

Para os cortes histológicos foram coletados 10 segmentos de raízes laterais de segunda ordem de cada plântula. Os segmentos foram cortados em partes com cerca de 2 mm de comprimento e fixados em solução de Kamovsky (Kamovsky, 1965) por 24 horas. Após a fixação, as amostras foram desidratadas em série etílica até etanol 100% e infiltradas em resina glicol metacrilato da Reichert-jung. Foram incluídos 4 segmentos por bloco de resina totalizando 4 repetições por tratamento. Foram cortadas seções com 2µm de espessura em micrótomo rotativo e coradas com azul de astra e fuccina básica (Alves de Brito e Alquini, 1996) ou com azul de toluidina (Sakai, 1973), visando as análises histológicas. A coloração com azul de astra e fuccina básica permitiu a visualização de tecidos celulósicos (corados em azul) e tecidos lignificados (corados em vermelho). A coloração com azul de toluidina permitiu a visualização dos tecidos lignificados e suberizados, corados em azul-esverdeado, e dos tecidos não lignificados, corados em púrpura. Foram preparadas 2 lâminas com cada coloração, cada uma contendo 10 seções (10 replicatas). As lâminas foram analisadas para detecção de alterações histológicas que demonstrassem a compatibilidade ou incompatibilidade de cada isolado de *P. tinctorius* em interação com *E. urophylla*. Foram feitas fotomicrografias dos materiais preparados.

A dosagem de compostos fenólicos totais foi feita segundo a metodologia descrita por Bray & Thorpe (1954). Cada amostra foi composta por

raízes de 4 plântulas em 4 repetições, totalizando 16 plantas por tratamento. Todas as amostras foram homogeneizadas em 3 ml de metanol 80% acidificado e centrifugadas por 5 minutos a 12000g. O sobrenadante foi evaporado em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40°C e o resíduo foi ressuspensão em 1 ml de metanol. A mistura da reação foi composta de 150 µl do extrato metanólico, 1,5 ml de carbonato de sódio a 2% e 150 µl do reagente Folin-Ciocalteu 2 N. Após 30 minutos foi feita a leitura da absorbância a 750 nm em espectrofotômetro. O branco foi composto de 150 µl de metanol, 1,5 ml de carbonato de sódio 2% e 150 µl do reagente Folin-Ciocalteu 2 N.

Os dados obtidos foram utilizados para o cálculo em µg de ácido clorogênico por mg de tecido fresco através da curva padrão obtida a partir de concentrações de ác. clorogênico em água destilada variando de 50 a 450 µg/ml em função da absorbância a 750 nm, $y = 0,0004 + 0,0029x$ ($r^2 = 0,9983$) (Stangarlin, 1995).

4.5 Resultados e discussão

Os cortes realizados a partir dos tratamentos não inoculados (testemunha), de 0 a 120 horas, apresentaram características anatômicas semelhantes: epiderme unisseriada provida de pêlos radiculares, parênquima cortical com cerca de três camadas de células não lignificadas, seguido pela endoderme (**Figura 4.1**). A raiz é protostélica, podendo ser triarca ou tetraarca.

Nos tratamentos onde foi inoculado o isolado de *Pinus* (185), a presença do micélio fúngico aderido à raiz só foi observada a partir de 96 horas após a inoculação (**Figura 4.2**). Em 12, 24 e 72 horas, não foi observada, em nenhuma das repetições, a presença do isolado 185 bem como nenhuma alteração na estrutura anatômica da raiz. Em 96 horas, a presença do micélio fúngico mostrou-se relacionada a um maior acúmulo de substâncias fenólicas nas regiões de contato entre micélio e as células epidérmicas (**Figura 4.2**). A 120 horas, o manto já estava bastante desenvolvido (**figura 4.4A**).

Nos tratamentos onde foi inoculado o isolado de eucalipto (1604) observou-se a presença do micélio fúngico aderido à superfície da epiderme a partir de 24 horas após a inoculação (**Figura 4.3A**). Não foram observadas, no entanto, quaisquer alterações histológicas características de reações de defesa, tais como lignificação de tecidos, acúmulo de substâncias fenólicas ou papilas. A partir de 72 horas após a inoculação (**Figura 4.3B,C,D**) observou-se a formação de um manto fúngico em torno das raízes, onde o micélio entrou em contato íntimo com a superfície da epiderme (**Figura 4.3D**).

A dosagem de compostos fenólicos nas raízes não evidenciou diferenças significativas nas plantas inoculadas com o isolado 1604 e na testemunha (**Figura 4.5**). Apenas as plantas inoculadas com o isolado 185 apresentaram alterações significativas na concentração de compostos fenólicos durante os períodos testados (**Figura 4.6**). Em 96 horas após a inoculação, verificou-se que as raízes inoculadas com o isolado 185 apresentaram um acúmulo significativamente maior de compostos fenólicos (μg de ácido clorogênico/ mg de tecido fresco) em relação à testemunha não inoculada (**Figura 4.7**).

A comparação entre as ectomicorrizas formadas em *E. urophylla* pelos isolados de eucalipto e de *Pinus* indica que a adesão à raiz, início da formação do manto e penetração na epiderme ocorre mais rapidamente na interação com o isolado de eucalipto. Nas raízes inoculadas com o isolado 1604,

Figura 4.1 Cortes transversais de raízes de *E. urophylla* não inoculadas com *P. tinctorius*, coletadas após 12 horas (A), 24 horas (B), 72 horas (C), e 96 horas (D). A, B e C, coloração com azul de astra/fuccina básica (tecidos lignificados corados em vermelho - setas). D, coloração com azul de toluidina (tecidos lignificados ou suberizados corados em azul - setas). (A - 20 X, barra = 36 μ m; B, C, D - 40 X, barra = 18 μ m).

Figura 4.2 Cortes transversais de raízes de *E. urophylla* inoculadas com o isolado **185** de *P. tinctorius* 96 horas após a inoculação. **A, B** - As setas indicam as hifas de *P. tinctorius*. Coloração com azul de astra/fuccina básica, (100X, barra = 7,2 μm). **C** - As setas indicam deposição de compostos fenólicos na epiderme. Coloração com azul de toluidina, (40X, barra=18 μm), **D** - O mesmo corte de C, (100X, barra = 7,2 μm).

Figura 4.3 Cortes transversais de raízes de *E. urophylla* inoculadas com o isolados **1604** de *P. tinctorius*. Coloração com azul de astral/fuccina básica.

A - raízes 24 horas após inoculação. A seta indica a presença de hifas em torno da raiz. (40X, barra = 18 μ m), **B** - Raízes 72 horas após inoculação. Abundância de hifas em torno das raízes, (20X barra = 36 μ m), **C** - Raízes 96 horas após a inoculação, (20X, barra = 36 μ m). **D** - raízes 120 horas após inoculação (100X, barra = 7,2 μ m).

Figura 4.4 Cortes transversais de raízes de *E. urophylla*. **A** - Raízes inoculadas com o isolado 185, 120 horas após inoculação. Observa-se grande quantidade de micélio em torno das raízes. Coloração com azul de toluidina, (40X, barra = 18 μm). **B** - Raízes inoculadas com o isolado 1604 de *P. tinctorius* 120 horas após a inoculação. Presença de alterações nos pelos radiculares e penetração intercelular das hifas na epiderme (setas). Coloração com azul de astral/fuccina básica, (100X, barra = 7,2 μm).

é possível observar a presença de micélio fúngico aderido à raiz 24 horas após a inoculação e formação de micélio espesso em até 72 horas. Na interação com o isolado 185, a formação de manto só ocorre após 96 horas da inoculação. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Lei et al. (1990), onde, após a inoculação de raízes de *E. urophylla* com *P. tinctorius* isolados de *Pinus* e de eucalipto, foi observado que os isolados de eucalipto formavam manto com 2 a 3 camadas de hifas 2 dias após a inoculação. O isolado de *Pinus* só formava manto após 4 dias. Estes resultados demonstram a existência de diferenças intraespecíficas entre os isolados de *P. tinctorius* quanto à rapidez de formação de ectomicorrizas. Estas diferenças são peculiares à simbiose pois, em meio de cultura, o isolado 185 tem um crescimento cerca de 2 vezes mais rápido que o isolado 1604 (**Apêndice 3**).

Quanto a rapidez de adesão, penetração e desenvolvimento da estrutura ectomicorrízica, Burgess et al. (1994), comparando 20 isolados diferentes de *P. tinctorius*, observaram que a extensão do desenvolvimento ectomicorrízico se relaciona positivamente com o potencial do fungo em beneficiar a planta hospedeira. Em geral, quanto mais rápido era o desenvolvimento das micorrizas, maior era o estímulo ao crescimento *in vivo*. Desta forma fica clara a vantagem da inoculação com isolados compatíveis para as plantas e a importância desta diferença de compatibilidade para a efetividade da simbiose.

O fator que leva à diferença de agressividade entre os dois isolados, no entanto, ainda não foi determinado. Neste trabalho, durante as fases iniciais de contato entre os fungos ectomicorrízicos e a planta (12, 24, 72 horas) não foram observadas alterações estruturais nas células vegetais caracterizando mecanismos de defesa, tais como lignificação, espessamento de paredes, formação de papilas ou o acúmulo de compostos fenólicos em resposta à penetração do isolado incompatível. A produção de compostos fenólicos foi

Figura 4.5 Valores médios relativos a dosagem de compostos fenólicos em raízes de *E. urophylla* inoculadas com os isolados 185 (Δ) e 1604 (□) de *P. tinctorius* e em raízes não inoculadas (O). Apenas as raízes inoculadas com o isolado 185 apresentaram alterações significativas na dosagem de compostos fenólicos totais em função do tempo (figura 4.6).

Figura 4.6 Variação na concentração de compostos fenólicos totais em raízes de *E. urophylla* inoculadas com o isolado 185 de *P. tinctorius* ($F=0,008$).

Figura 4.7 Dosagem de compostos fenólicos no período de 96 horas após a inoculação em raízes de *E. urophylla* inoculadas com os isolados 185 e 1604 de *P. tinctorius*. Raízes não inoculadas (TES). Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P=0,01$), ($F=0,002$).

observada na interação com o isolado 185 após 96 horas da inoculação (**Figuras 4.2 e 4.7**). No entanto, o manto continuou a se desenvolver e atingiu crescimento semelhante ao observada no isolado 1604 120 horas após a inoculação. Verificou-se, na interação com o isolado 185, apenas um atraso no início do desenvolvimento da simbiose. Esse atraso, verificado *in vitro*, onde o fungo é colocado em contato direto com a raiz, pode, em condições ambientais normais, ser um fator importante na restrição do desenvolvimento micorrízico determinando a baixa efetividade da simbiose. A dosagem de fenólicos totais, indicando aumento significativo após 96 horas da inoculação, foi restrita a este período, relacionado ao início da penetração do isolado 185 e não se manteve a 120 horas. Lei et al. (1990) verificaram a reação das células vegetais à

presença do isolado fúngico incompatível também após 4 dias da inoculação. Segundo os autores, foi observada a formação de espessamentos de paredes, ao nível ultraestrutural, semelhantes aos observados em interações planta-patógeno.

O acúmulo de compostos fenólicos na planta hospedeira parece ter papel importante na compatibilidade ectomicorrízica. A lignificação de paredes celulares, a deposição de compostos fenólicos e a formação de papila foi observada previamente em interações entre simbiontes incompatíveis. Duddridge (1987) descreve a interação entre *Suillus grevillei* (fungo ectomicorrízico específico de plantas do gênero *Larix*) e diversas espécies vegetais, incluindo *Pinus nigra*, *Pinus sylvestris* e *Pseudotsuga menziesii*. Nestas interações incompatíveis foram observadas anormalidades na interface fungo - planta consideradas sinais de incompatibilidade, incluindo espessamento de parede, depósito de fenólicos e lise na rede de Hartig. Essas alterações, no entanto, ocorreram entre um fungo considerado específico, de faixa restrita de hospedeiros e espécies vegetais distintas. *P. tinctorius*, diferentemente, é um fungo considerado de ampla faixa de hospedeiros (Duddridge, 1986; Molina & Trappe, 1982) e é compreensível que as reações da planta a dois isolados desta espécie sejam mais discretas.

Os eventos iniciais do desenvolvimento da simbiose, ocorridos até 72 horas após a inoculação, parecem ser responsáveis pela rápida adesão e crescimento na superfície da raiz pelo isolado 1604. Neste período, não se verifica qualquer aumento na produção de compostos fenólicos e este fator não pode explicar porque o isolado 185 tem sua adesão e crescimento inibidos e o isolado 1604 é favorecido. Provavelmente, algum tipo de reconhecimento permitiu ou estimulou o desenvolvimento deste fungo e inibiu o isolado 185. Quando ocorreu a penetração, posteriormente, a planta reagiu ao isolado 185 através do aumento na concentração de fenólicos, fator este que pode ter dificultado, mas não impediu o seu desenvolvimento.

Fenóis antibióticos podem ser formados em resposta ao ingresso de patógenos e ser parte dos mecanismos de resposta ativa ou, por outro lado, ocorrer constitutivamente nas plantas e funcionar como inibidores pré-formados associados à resistência de plantas não hospedeiras (defesa constitutiva ou pré-formada) (Pascholati & Leite, 1994). Nas raízes de eucalipto não inoculadas, foi verificada a presença de fenóis constitutivos localizados na epiderme e endoderme. Estas plantas mostram, também na testemunha, níveis elevados de fenóis. De forma semelhante, Ling-Lee et al. (1977) verificaram que muitas células epidérmicas de raízes não inoculadas de *Eucalyptus fastigata* acumulam consideráveis quantidades de materiais fenólicos. Fenóis foram também detectados na endoderme e camadas corticais mais externas em raízes micorrizadas e não micorrizadas. Não foi comprovado o efeito dos fenóis constitutivos sobre o crescimento e desenvolvimento dos isolados 185 e 1604 de *P. tinctorius*, mas a tolerância a estes fenóis poderia ser um fator determinante das diferenças entre os dois fungos. Estudos recentes têm demonstrado que fenólicos vegetais induzem genes catabólicos em muitos microrganismos, assim como genes requeridos para formar associações ativas com plantas. Bactérias dos gêneros (*Brady*)*Rhizobium* e *Agrobacterium* são exemplos desse fenômeno porque os genes envolvidos na formação de nódulos e na transformação de plantas são induzidos por moléculas fenólicas vegetais específicas. Os produtos destas vias agem diretamente ou indiretamente como sinais para a planta hospedeira e para o microrganismo, levando à interações patogênicas ou simbióticas. É possível que compostos fenólicos produzidos pelas raízes de eucalipto exerçam importante papel nas interações com estes fungos ectomicorrízicos (Peters & Verma 1990). Não deve, portanto, ser descartada a possibilidade de que compostos fenólicos ou outras substâncias presentes e/ou liberadas pelas raízes tenham efeito determinante no reconhecimento entre os simbioss e na determinação da compatibilidade ou incompatibilidade entre a planta hospedeira e os fungos ectomicorrízicos.

4.6 Conclusões

O isolado 185 necessitou de um tempo maior para iniciar a colonização das raízes de *E. urophylla* que o isolado 1604, indicando a maior compatibilidade do isolado 1604 de *P. tinctorius* com *E. urophylla*.

Apenas as raízes inoculadas com o isolado 185 mostraram alterações significativas na dosagem de compostos fenólicos nos períodos testados, induzindo alguma reação de defesa na planta hospedeira.

O atraso na adesão das hifas do isolado 185 às raízes não pode, no entanto, ser explicada pela produção de compostos fenólicos ou alterações bioquímicas e estruturais nas raízes. O acúmulo de compostos fenólicos só foi observado após a penetração do isolado 185.

A produção de compostos fenólicos nas raízes não impediu a penetração e a formação de manto pelo isolado 185.

5. EFEITO DE EXSUDATOS E COMPOSTOS FENÓLICOS RADICULARES NO CRESCIMENTO ASSIMBIÓTICO DE DOIS ISOLADOS DE *Pisolithus tinctorius*.

5.1 Resumo

A penetração e colonização das raízes das plantas pelos fungos ectomicorrízicos pode trazer inúmeros benefícios ao seu crescimento. No entanto, devido a grande variabilidade entre estes fungos, podem ocorrer variações na resposta da planta hospedeira à simbiose. Geralmente, não se observa especificidade na simbiose micorrízica mas existem vários graus de compatibilidade entre os fungos e as plantas hospedeiras. Os mecanismos de reconhecimento que levam a maior ou menor compatibilidade do fungo com a planta podem ocorrer em vários estágios do desenvolvimento da simbiose. As substâncias antimicrobianas presentes nas raízes e nos exsudatos radiculares já foram implicadas na resistência das plantas à penetração de fitopatógenos e no reconhecimento em diversas interações simbióticas e patogênicas, podendo exercer papel importante também em interações ectomicorrízicas.

Este trabalho teve por objetivos determinar o efeito de exsudatos radiculares de *E. urophylla* e *P. caribaea* e de compostos fenólicos radiculares de *E. urophylla* sobre o crescimento assimbiótico de dois isolados de *P. tinctorius*. Foram utilizados os isolados 185 (obtido de *Pinus*) e 1604 (obtido de eucalipto). Plântulas de *E. urophylla* e *P. caribaea* foram crescidas em placas de petri por 30 dias. Em seguida, foram retiradas e as mesmas placas utilizadas para o crescimento dos isolados de *P. tinctorius*. Para avaliar o efeito dos compostos fenólicos radiculares, estes foram extraídos das raízes de plântulas de *E. urophylla* e, em seguida, misturados ao meio de cultura para o

crescimento dos isolados de *P. tinctorius*. Foi observado que os exsudatos radiculares de *E. urophylla* foram estimulantes ao crescimento do isolado 185 de *P. tinctorius*, mas os exsudatos de *P. caribaea* foram inibitórios ao crescimento do isolado 1604. Os compostos fenólicos radiculares de *E. urophylla* não tiveram efeito sobre o isolado 1604, mas foram inibitórios ao crescimento do isolado 185.

5.2 Summary: ROLE OF ROOT EXUDATES AND PHENOLIC COMPOUNDS ON *IN VITRO* GROWTH OF TWO ISOLATES OF *P. tinctorius*.

Ectomycorrhizal symbiosis can cause many benefits to host plants. Nevertheless, there is high variability between ectomycorrhizal fungi and plant reaction to symbiosis. Specificity is not generally observed in mycorrhizal association but there are different degrees of compatibility between the symbionts. The Mechanisms that lead to compatibility are unknown and can occur at different stages of symbiosis development. Many substances in plant exudates and in the root have already been implicated in resistance to fungal penetration and in other interactions between plant and microorganisms and they may be important in ectomycorrhizal interactions. This study investigated the effect of root exudates and root phenolic compounds on *in vitro* growth of two isolates of *P. tinctorius*, isolate 185 (isolated from *Pinus taeda*) and isolate 1604 (isolated from *Eucalyptus grandis*). *P. caribaea* and *E. urophylla* seedlings were grown in petri dishes for 30 days. Thereafter, plants were removed and *P. tinctorius* isolates were grown on the same medium. *E. urophylla* root phenolics were extracted and mixed to culture medium to evaluate their effect on *P. tinctorius* growth. The results showed that *P. caribaea* and *E. urophylla* root exudates stimulated isolate 185 and that isolate 1604 was inhibited by *P. caribaea* exudates. The *E. urophylla* phenolic compounds inhibited growth of isolate 185 and had no effect on isolate 1604. These results show that, probably, root exudates and phenolic compounds may be important on the compatibility between *P. tinctorius* and its host plants.

5.3 Introdução

A penetração e colonização das raízes pelos fungos ectomicorrízicos resulta em modificações na fisiologia, bioquímica e nutrição da planta hospedeira, podendo trazer inúmeros benefícios ao seu crescimento. No entanto, fungos ectomicorrízicos diferentes podem afetar a planta hospedeira de formas distintas. Algumas diferenças entre os fungos ectomicorrízicos incluem: especificidade ao hospedeiro, adaptabilidade ecológica do fungo, capacidade de absorção e translocação de nutrientes, produção de reguladores de crescimento, interações com outros organismos do solo etc. A variação ecotípica dentro de uma espécie fúngica pode ser tão pronunciada como as diferenças entre as espécies. Trappe (1977) afirmou que comparações entre muitos isolados de uma mesma espécie provavelmente revelaria que certos ecotipos se comportam melhor que outros. Realmente, tem sido verificadas, recentemente, diferenças na compatibilidade entre isolados de *Pisolithus tinctorius* e *Eucalyptus urophylla* (Malajczuk et al, 1990). Embora a maioria dos fungos ectomicorrízicos tenham um baixo grau de especificidade, simbioses diferentes podem variar na sua habilidade de aumentar a absorção de nutrientes pelo hospedeiro em diferentes condições. Essas diferenças na efetividade podem ser um reflexo da maior ou menor compatibilidade entre o fungo e a planta hospedeira. Segundo Koide & Schreiner (1992), a compatibilidade entre fungos micorrízicos e a planta é definida como a competência dos dois simbiontes em formar uma simbiose completamente funcional. Uma simbiose funcional é aquela em que o fungo penetra a raiz hospedeira, onde metabólitos são trocados e onde a propagação do fungo é efetuada. Aparentemente existem graus variáveis de incompatibilidade entre os fungos ectomicorrízicos e as várias plantas hospedeiras (Molina & Trappe, 1982).

Os mecanismos de controle da incompatibilidade podem ocorrer em cada estágio do ciclo de vida do fungo e fatores da planta podem ter papel importante no controle de alguns destes eventos (Anderson, 1988). A

presença de substâncias antimicrobianas de origem vegetal ou a falta de nutrientes nos exsudatos radiculares pode limitar a germinação dos esporos. A ausência de uma estrutura de reconhecimento na superfície da raiz limita a adesão. (Anderson, 1988). A regulação ocorre inicialmente na rizosfera, depois na superfície da raiz e finalmente dentro da raiz (Kropp & Anderson, 1994). O momento em que ocorre o reconhecimento e a determinação da incompatibilidade ou compatibilidade da interação ainda deve ser investigado. Aparentemente, os estágios iniciais da interação, quando ocorre o reconhecimento entre os dois simbioses são passos importantes para o desenvolvimento de uma simbiose compatível e eficiente (Malajczuk et al, 1990).

Segundo Harley & Smith (1983), o passo inicial da infecção seria o crescimento do micélio fúngico na rizosfera onde carboidratos essenciais, vitaminas e aminoácidos seriam liberados pelas raízes. Algum fator específico reconhecido pelo fungo poderia estar também sendo liberado pela raiz estimulando seu crescimento na rizosfera de plantas hospedeiras. Em seguida ocorreria a penetração das células epidérmicas do tecido radicular e a penetração intercelular nas células do córtex formando a rede de Hartig. A incompatibilidade é observada antes e depois da invasão do hospedeiro pelo fungo. Muitas vezes a planta hospedeira permite o crescimento do fungo sobre a superfície da raiz mas não a formação de estruturas de penetração e colonização (Kropp & Anderson, 1994). O papel de flavonóides e outros compostos fenólicos, lecitinas e oligossacarídeos no reconhecimento entre os organismos foi verificado em outras simbioses e possivelmente podem estar envolvidos no reconhecimento em simbioses ectomicorrízicas (Anderson, 1988). O aumento da germinação de esporos na rizosfera, na presença de exsudatos radiculares envolve mais que o fornecimento de nutrientes. Estudos com (*Brady*)*Rhizobium* mostram que certos compostos fenólicos estimulam os microrganismos a colonizar a planta induzindo a expressão de genes que regulam outros genes e fatores essenciais para a colonização (Anderson, 1988).

A detecção dos flavonóides envolve sistemas receptor-ativador que levam à expressão de genes bacterianos relacionados à maquinaria necessária à colonização do tecido vegetal (Kropp & Anderson, 1994). Para sua expressão, os genes que controlam o processo de nodulação (genes Nod ABC), requerem os produtos dos genes Nod D e um fator específico presente nos exsudatos radiculares das plantas hospedeiras. Os fatores da planta necessários são descritos como flavonas e flavanonas, compostos fenólicos presentes nos exsudatos vegetais (Mulligan & Long, 1985; Lynn & Chang, 1990). A variedade de compostos fenólicos presente nos exsudatos e a sensibilidade diferencial das cepas de (*Brady*)*Rhizobium* determina a especificidade da interação com a planta hospedeira (Siqueira et al, 1991). De forma semelhante, muitos produtos fúngicos e vegetais já foram implicados como fatores chave na determinação da compatibilidade na simbiose micorrízica, incluindo compostos voláteis, hormônios, lecitinas e componentes vegetais e fúngicos com potencial antimicrobiano (Harley & Smith, 1983; Anderson, 1988). Em fungos endomicorrízicos foi observado que os flavonóides vegetais estimulam a germinação de esporos e crescimento micelial de *Gigaspora gigantea in vitro* (Baptista & Siqueira, 1994) e a colonização micorrízica de raízes de trevo por *Glomus sp* (Siqueira et al, 1991b). Vários trabalhos demonstram que, na simbiose endomicorrízica, sinais são trocados na rizosfera entre o fungo e a planta hospedeira (Gianinazzi-Pearson et al, 1989; Nair et al, 1991; Siqueira et al, 1991; Lei et al, 1991; Giovannetti et al, 1996; Vierheilig et al, 1998). Ampla variedade de compostos produzidos pelas raízes servem como atrativos, fontes de nutrientes e sinais regulatórios genéticos para os fungos endomicorrízicos antes da infecção. Mais recentemente, Giovannetti et al (1996) observaram respostas de reconhecimento das raízes pelo fungo *Glomus mosseae*. As substâncias estimulantes presentes nos exsudatos radiculares de *Ocimum basilicum* e *Lactuca sativa* apresentavam baixo peso molecular não sendo descartada a possibilidade de que flavonóides radiculares estivessem envolvidos como sinais nos estágios de pré-infecção. Vierheilig et al (1998)

verificaram os efeitos da rizosfera de plântulas de tomate e feijão sobre o crescimento das hifas de *Glomus mosseae*. Foi observado que exsudatos radiculares solúveis em água estimulavam amplamente o crescimento das hifas no solo, exercendo um nítido efeito atrativo sobre seu crescimento. Os compostos fenólicos, em baixas concentrações, parecem ser, como observado em (*Brady*)*Rhizobium* e *Agrobacterium* moléculas sinalizadoras quase universais. Em altas concentrações, no entanto, são antimicrobianas, sugerindo que muitos simbiossiontes utilizam compostos de defesa do hospedeiro como fatores de reconhecimento (Koide & Schreiner, 1992).

Considerando as dificuldades encontradas no ambiente desfavorável do solo, entre a germinação dos esporos e a adesão às raízes da planta hospedeira, torna-se clara a importância dos fatores estimulantes liberados nos exsudatos radiculares para o desenvolvimento da simbiose. Por outro lado, a determinação da importância destes compostos na formação da simbiose entre *P. tinctorius* e *E. urophylla* pode tornar claro um dos aspectos importantes da compatibilidade entre plantas hospedeiras e fungos ectomicorrízicos. Com base nestes pressupostos, este trabalho teve como objetivo verificar a atividade de exsudatos radiculares de *E. urophylla* e de compostos fenólicos constitutivos das raízes sobre o crescimento assimbiótico de isolados de *P. tinctorius*.

5.4 Material e métodos

Foram utilizadas sementes de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, fornecidas pelo Instituto Florestal de São Paulo (Piracicaba - SP) e de *Eucalyptus urophylla*, fornecidas pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) - ESALQ, Piracicaba - SP. As sementes de *P. caribaea* foram desinfestadas com peróxido de hidrogênio 30% por 30 minutos e lavadas em água destilada estéril, conforme descrito por Wong & Fortin (1989). As sementes de *E. urophylla* foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 30 segundos e lavadas com água destilada esterilizada. Após a

desinfestação, as sementes foram germinadas em placas de petri contendo meio Pachlewsky modificado (Albrecht et al, 1994), mantidas em fotoperíodo de 16 horas de luz/ 8 horas de escuro a 22 °C por 5 dias. As plântulas livres de contaminantes foram transferidas assepticamente para placas de petri de 9 cm de diâmetro contendo o mesmo meio de cultura coberto com papel de filtro esterilizado. Foram transferidas 2 plântulas por placa e seu sistema radicular foi coberto com uma segunda folha de papel de filtro para evitar o ressecamento. Todas as placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em câmara com fotoperíodo de 16 horas de luz/ 8 horas de escuro, a 22°C, por 30 dias. As placas controle foram preparadas da mesma forma, sem a adição das plantas.

Foram utilizados os isolados de *P. tinctorius* 1604 (isolado de basidiocarpo associado a *Eucalyptus grandis*) e 185 (isolado de basidiocarpo associado a *Pinus taeda*). O isolado 185 foi obtido do USDA Forest Service - USA. Os fungos foram cultivados em meio MNM (Marx, 1969) modificado segundo Wong & Fortin (1989) e incubados no escuro, a 27°C por 30 dias.

Após o crescimento, as plântulas de *E. urophylla* e *P. caribaea*, foram retiradas assepticamente de todas as placas e um disco do micélio com 0,5 cm de diâmetro dos dois isolados foram adicionados as placas totalizando 30 repetições para cada um dos tratamentos. Foram avaliados os diâmetros das colônias dos isolados 1604 e 185 crescidos nas placas onde se desenvolveram previamente plântulas de *P. caribaea*, *E. urophylla* e controle (sem plantas). Todas as placas foram mantidas a 27°C, no escuro, por 30 dias e foram feitas avaliações do crescimento a cada 5 dias (185) e 10 dias (1604). Todo o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado.

A extração e dosagem dos compostos fenólicos totais foi feita de acordo com metodologia de Bray & Thorpe (1954). Foram utilizadas para extração 16 plântulas de *E. urophylla* crescidas por 30 dias nas mesmas condições descritas anteriormente. Amostras de raízes retiradas de cada 4 plântulas, livres de contaminantes, foram homogeneizadas em almofarizes de porcelana com 3 ml de metanol 80% acidificado. O extrato foi centrifugado por

5 minutos a 12000g e o sobrenadante foi evaporado em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40°C. Os resíduos das 4 amostras foram ressuspensos em 1 ml de água destilada e misturados compondo um só extrato (4ml). Para dosagem dos compostos fenólicos, a mistura da reação foi composta de 150 µl do extrato obtido, 1,5 ml de carbonato de sódio 2% e 150 µl do reagente Folin-Ciocalteu 2 N. Após 30 minutos foi feita a leitura da absorbância a 750 nm em espectrofotômetro. Como referência foi utilizada uma amostra de 150 µl de água destilada, 1,5 ml de carbonato de sódio e 150 µl de reagente Folin-Ciocalteu. A quantidade de fenólicos totais foi obtida em µg de ácido clorogênico/ml através da curva padrão de concentrações de ác. clorogênico (50 a 450 µg/ml) em água destilada em função da absorbância a 750 nm, $y = 0,0004 + 0,0029x$ ($r^2 = 0,9983$) (Stangarlin, 1995). Foi obtida uma concentração final de 420 µg de ác. clorogênico/ml de água destilada em 4 ml de extrato. Este extrato foi utilizado no bioensaio seguinte.

Foram utilizados os isolados de *P. tinctorius* 185 e 1604 mantidos como descrito acima. Um disco do micélio com 0,5 cm de diâmetro foi colocado no centro de placas de petri de 9 cm de diâmetro contendo meio BDA (agar batata dextrose) misturado aos compostos fenólicos extraídos das raízes de *E. urophylla* na concentração de 5 µg de ác. clorogênico por ml de meio. Os compostos fenólicos foram filtrados assepticamente em filtro de seringa 0,2 µm e misturados à quantidade total do meio de cultura fundido a 40 °C em câmara asséptica. O controle foi obtido misturando-se ao meio de cultura água destilada esterilizada. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos: isolado 1604 e isolado 185 crescidos em meio com compostos fenólicos e controles. Foram feitas 12 repetições para cada tratamento.

5.5 Resultados e discussão

Os exsudatos liberados pelas raízes das plântulas de *P. caribaea* e *E. urophylla* mostraram efeitos estimulantes sobre o crescimento do isolado 185 de *P. tinctorius* (isolado de Pinus) (**Figuras 1 e 2**). O efeito estimulante dos exsudatos radiculares de *E. urophylla* foi maior que o dos exsudatos de *P. caribaea*. A maior produção de raízes pelas plântulas de *E. urophylla* possivelmente levou a uma maior exsudação de açúcares e outros fatores com efeito estimulante sobre o crescimento. Este efeito pode ter sido muito importante, uma vez que foi utilizado o meio Pachlewky, pobre em açúcares (0,9 g/l), tornando o efeito de substâncias nutricionais liberadas no meio bastante significativo. Segundo Nylund & Unestan (1982) & Harley & Smith (1983), o crescimento do fungo ectomicorrízico fora da raiz, estimulado por metabólitos vegetais, é a primeira etapa para o desenvolvimento da simbiose. Para Harley & Smith (1983) o passo inicial da infecção ocorre com o crescimento do micélio fúngico na rizosfera, onde carboidratos essenciais, vitaminas, aminoácidos e sais minerais são liberados pelas raízes. O isolado 185 de *P. tinctorius* (isolado de basidiocarpo de *P. taeda*) é considerado incompatível para espécies hospedeiras de eucalipto Malajczuk et al (1990), onde seu desenvolvimento é mais lento que o do isolado 1604. No entanto, nesta etapa, não foram observados efeitos inibitórios dos exsudatos radiculares de *E. urophylla*, nem efeitos estimulantes maiores dos exsudatos radiculares de *P. caribaea*. A incompatibilidade entre o isolado 185 e raízes de eucalipto deve estar se manifestando em outra etapa da interação.

Figura 5.1 Efeito de exsudatos radiculares de *P. caribaea* (Δ) e *E. urophylla* ($\square$) sobre o crescimento micelial do isolado 185 de *P. tinctorius* em meio Pachlewsky. Testemunha (O): meio sem exsudatos radiculares.

Figura 5.2 Efeito de exsudatos radiculares de *P. caribaea* e *E. urophylla* sobre o crescimento micelial do isolado 185 de *P. tinctorius*. Testemunha (TEST), meio sem exsudatos radiculares. Avaliação aos 20 dias de incubação. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,01$). $F=0,00001$.

Para o isolado 1604 de *P. tinctorius* (isolado de basidiocarpo de *Eucalyptus grandis*), apenas os exsudatos radiculares de *E. urophylla* apresentaram efeitos estimulantes sobre o crescimento. Os exsudatos radiculares das plântulas de *P. caribaea* mostraram efeitos inibitórios sobre seu crescimento em meio Pachlewsky (Figuras 3 e 4). Estas observações indicam haver um fator inibitório importante para a determinação da compatibilidade entre os isolados de *P. tinctorius* na interação com *P. caribaea*. Este fator pode ser decisivo durante o crescimento do fungo na rizosfera, afetando a colonização das raízes de *Pinus* pelo isolado 1604 de *P. tinctorius*. Aparentemente o isolado 185, incompatível com *E. urophylla* não sofre este efeito inibitório o que tornaria maiores as suas chances de colonizar as raízes

de *Pinus*. Estes resultados indicam a necessidade de maiores estudos sobre a compatibilidade entre plântulas de *Pinus* e os isolados 185 e 1604 de *P. tinctorius* para constatar a existência de reações de incompatibilidade e determinar a importância de cada etapa do desenvolvimento na simbiose ectomicorrízica. Aparentemente, a fase de crescimento assimbiótico do fungo ectomicorrízico na rizosfera pode ser um fator importante para o desenvolvimento destas simbioses e os exsudatos radiculares podem ser importantes da determinação da compatibilidade.

Figura 5.3 Efeito de exsudatos radiculares de *P. caribaea* (Δ) e de *E. urophylla* (□) sobre o crescimento micelial do isolado 1604 de *P. tinctorius* em meio Pachlewsky. Testemunha (O): meio sem exsudatos radiculares.

Figura 5.4 Efeito de exsudatos radiculares de *P. caribaea* e *E. urophylla* sobre o crescimento micelial do isolado 1604 de *P. tinctorius* em meio Pachlewsky. Avaliação aos 40 dias de incubação. Testemunha (TEST), meio sem exsudatos radiculares. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,01$). $F = 0,01$.

O papel dos exsudatos radiculares no reconhecimento foi descrito em várias relações planta-microrganismos (Siqueira et al, 1991a,b; Kropp & Anderson, 1994). Segundo Kropp & Anderson, (1994), a incompatibilidade pode ser observada antes e após a invasão do hospedeiro pelo fungo. Em outros sistema simbióticos o papel de flavonóides e outros compostos fenólicos, lecitinas e oligossacarídeos no reconhecimento entre os organismos tem sido descritos (Anderson, 1988). Os exsudatos radiculares são importantes para o estabelecimento de interações específicas entre Brady(Rhizobium) e leguminosas (Mulligan & Long, 1985; Lynn & Chang, 1990) e em endomicorizas tem efeito estimulante ou inibitório sobre a germinação de esporos e crescimento micelial do fungo (Nair et al, 1991; Giovannetti et al, 1996; Baptista

& Siqueira, 1994; Vierheilig et al, 1998). Os resultados deste trabalho indicam que o efeito de fatores presentes nos exsudatos radiculares podem também exercer papel importante na determinação da compatibilidade entre fungos ectomicorrízicos e seus hospedeiros específicos, merecendo estudos mais detalhados.

Os compostos fenólicos das raízes de plântulas de *E. urophylla* apresentaram efeitos inibitórios significativos sobre o crescimento do isolado 185 de *P. tinctorius* (Figuras 5.5, 5.6 e 5.8). Nenhum efeito, no entanto, foi observado sobre o crescimento do isolado 1604 (Figuras 5.7, 5.8).

Figura 5.5 Efeito de compostos fenólicos totais extraídos de raízes de *E. urophylla* sobre o crescimento do isolado 185 de *P. tinctorius*. Meio BDA contendo compostos fenólicos (5 µg/ml) (▲), meio sem compostos fenólicos (Δ).

Figura 5.6 Efeito de compostos fenólicos totais (5 µg/ml) extraídos de raízes de *E. urophylla* sobre o crescimento do isolado 185 de *P. tinctorius*. TES: Testemunha sem compostos fenólicos. Valores com a mesma letra não diferem entre si segundo o teste de Tukey ($P=0,01$).

Em virtude de seus efeitos inibitórios sobre o crescimento micelial do isolado 185 de *P. tinctorius*, considerado incompatível com *E. urophylla* (Malajczuk et al, 1990), e da ausência de efeitos sobre o isolado 1604, compatível, os compostos fenólicos de *E. urophylla* podem ter um efeito importante na determinação da compatibilidade entre estes simbioses. Embora não tenham sido verificados efeitos inibitórios dos exsudatos radiculares de *E. urophylla* sobre o isolado 185, esta inibição poderia se manifestar na adesão ou penetração do fungo na raiz explicando assim o motivo do atraso no seu desenvolvimento quando comparado com o isolado 1604. A maior tolerância do isolado 1604 a estes compostos pode explicar sua adesão e penetração mais rápida observada nas raízes de *E. urophylla* (Malajczuk et al, 1990).

Os compostos fenólicos constitutivos são uma importante barreira contra a penetração de patógenos nas plantas (Ride, 1978). A concentração

utilizada neste experimento (5 µg/ml) representa a concentração total extraída em uma miligrama de raízes de *E. urophylla*. No entanto, esta concentração pode ser muito maior se estiver localizada apenas na epiderme e endoderme ou nos pontos de penetração do fungo e neste caso poderia representar um fator muito limitante ao seu desenvolvimento. Muitos fungos, no entanto, desenvolvem a capacidade de metabolizar os compostos fenólicos produzidos pelas plantas, escapando aos seus mecanismos de defesa (Ride, 1978). Isto pode explicar como, após decorridos 3 a 4 dias, o isolado 185 de *P. tinctorius* consegue penetrar e se desenvolver na raiz (Malajczuk, 1990). O atraso na adesão e penetração no entanto, pode representar, no ambiente desfavorável do solo, um fator muito mais limitante ao desenvolvimento da simbiose do que em interações produzidas e mantidas *in vitro*.

Figura 5.7 Efeito de compostos fenólicos totais extraídos de raízes de *E. urophylla* sobre o crescimento do isolado 1604 de *P. tinctorius*. Meio BDA contendo compostos fenólicos (5 µg/ml) (FENOL) (●), meio sem compostos fenólicos (TES) (Δ). As duas curvas são praticamente iguais.

Figura 5.8 Crescimento micelial dos isolados 185 e 1604 de *P. tinctorius* em meio agar batata dextrose (BDA), suplementado com compostos fenólicos extraídos de raízes de *E. urophylla* (5 $\mu\text{g/ml}$) (F). Controle (C), sem adição de compostos fenólicos.

5.6 Conclusões

Os exsudatos radiculares de *P. caribaea* e *E. urophylla* exibem efeito estimulante sobre o crescimento assimbiótico do isolado 185 de *P. tinctorius*. Apenas os exsudatos radiculares de *E. urophylla* têm efeito estimulante sobre o crescimento assimbiótico do isolado 1604 de *P. tinctorius*. Os exsudatos radiculares de *P. caribaea* têm efeito inibitório sobre o seu crescimento.

Os compostos fenólicos radiculares de *E. urophylla* apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento assimbiótico do isolado 185 de *P. tinctorius* e não apresentaram efeito sobre o crescimento do isolado 1604.

O efeito diferencial dos exsudatos e dos compostos fenólicos radiculares de *E. urophylla* e dos exsudatos radiculares de *P. caribaea* indica que é possível que estas substâncias exerçam papel no reconhecimento entre os simbiossiontes, atuando também na determinação da compatibilidade entre os isolados de *P. tinctorius* e as plantas hospedeiras.

6. CONCLUSÕES GERAIS

O isolado 1604 de *P. tinctorius* se mostrou mais compatível com as plântulas de *E. urophylla*. A adesão, penetração e crescimento das hifas nas raízes ocorreu mais rapidamente do que nas plântulas inoculadas com o isolado 185.

As fases iniciais do desenvolvimento da simbiose, até 72 horas, determinaram o atraso na adesão, penetração e crescimento do isolado 185 de *P. tinctorius* nas raízes de *E. urophylla*. A partir de 96 horas, o isolado 185 desenvolveu-se mais rapidamente nas raízes, aparentemente tendo superado os fatores inibitórios presentes no início da interação.

A atividade da β -1,3-glucanase nas raízes não sofreu alterações devido a simbiose. A atividade da quitinase foi reduzida nas plantas inoculadas com o isolado 1604 e a atividade da peroxidase foi também reduzida nas plantas inoculadas com os dois isolados. Aparentemente, não existe relação entre a compatibilidade do isolado de *P. tinctorius* e a inibição na atividade da peroxidase.

A atividade da peroxidase apresentou um aumento na fase inicial (até 6 horas) da interação com o isolado 1604. Aparentemente houve uma reação transitória de defesa da planta à penetração do fungo que foi rapidamente inibida.

As raízes inoculadas com o isolado 185 apresentaram um acúmulo temporário de compostos fenólicos, indicando também uma reação de defesa à penetração do fungo. Este aumento, no entanto, não se manteve e não impediu seu crescimento nas raízes. A produção de compostos fenólicos também não

foi responsável pelo atraso no desenvolvimento do isolado 185, pois só ocorreu após a penetração.

Os exsudatos radiculares de *P. caribaea* e *E. urophylla* foram estimulantes sobre o crescimento assimbiótico do isolado 185 de *P. tinctorius* mas os exsudatos de *P. caribaea* inibiram o crescimento do isolado 1604. Já os compostos fenólicos radiculares das plântulas de *E. urophylla* inibiram o crescimento assimbiótico do isolado 185 de *P. tinctorius*. Este efeito diferencial dos exsudatos e compostos fenólicos radiculares torna possível que eles desempenhem um papel importante na determinação da compatibilidade entre os isolados de *P. tinctorius* e as plântulas hospedeiras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F.B.; FORRENCE, L.E. Temporal and hormonal control of β -1,3 glucanase in *Phaseolus vulgaris*.L. **Plant Physiology**, v.45, p. 395-400, 1970.
- ALBRECHT, C.; ASSELIN, A.; PICHÉ, Y.; LAPEYRIE, F. Chitinase activities are induced in Eucalyptus globulus roots by ectomycorrhizal or pathogenic fungi, during early colonization. **Physiologia Plantarum**, v. 91, p.104-110, 1994a.
- ALBRECHT, C.; BURGESS, T.; DELL, B.; LAPEYRIE, F. Chitinase and peroxidase activities are induced in eucalyptus roots according to aggressiveness of australian ectomycorrhizal strains of *Pisolithus* sp. **New Phytologist**, v. 127, p. 217-222, 1994b.
- ALVES DE BRITO, C.J.F.; ALQUINI, Y. A new method for staining botanical embedded in glycol methacrilate (GMA). **Arquives of Biological Tecnology**, v. 39, n. 4, p.949-951, 1996.
- ANDERSON, A.J. Mycorrhizae - Host specificity and recognition. **Phytopathology**, v. 78, n.3, p.375-378, 1988.
- BAPTISTA, M.J.; SIQUEIRA, J.O. Efeito de flavonóides na germinação de esporos e no crescimento assimbiótico do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora gigantea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.6, n. 2, p.127-134, 1994.
- BÉCARD, G.; PICHÉ, Y. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. **New Phytologist**, v. 112, p.77-83, 1989.

- BENHAMOU, N.; JOOSTEN, M.H.A.J.; DE WIT, P.J.G.M. Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Plant Physiology**, v.92, p.1108-1120, 1990.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAY, H. G.; THORPE, W. V. Analysis of phenols compounds of interest in metabolism. **Methods in Biochemistry Analysis**, v. 1, p. 1194-1196, 1954.
- BURGESS, T.; DELL, B.; MALAJCZUK, N.. Variation in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated on *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **New Phytologist**, v. 127, p.731-739, 1994.
- CASTELLANO, M.A. Current status of outplanting studies using ectomycorrhiza-inoculated forest trees. In: PFLEGER, F.L. & LINDERMAN, R.G. (ed.). **Mycorrhizae and Plant Health**. APS Press, St Paul, Minnesota, 1994. p. 261-281.
- CHAKRABORTY, A.; SAHA, A. K.; SEN GUPTA, P. Germination of chlamydospores of *Fusarium udum* adjacent to the roots of pigeonpea. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, n.9, p.927-929, 1992.
- CHILVERS, G.A.; DOUGLASS, P.A.; LAPEYRIE, F.F. A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. **New Phytologist**, v. 103, p.397-402, 1986.
- DAUGROIS, J.H.; LAFITTE, C.; BARTHE, J.P.; TOUZE, A. Induction of β -1,3-glucanase in compatible and incompatible interactions between *Colletotrichum lindemuthianum* and bean cultivars. **Journal of Phytopathology**, v.130, p.225-234, 1990.

- DE JONG AJ ; CORDEWENER,J.; LO SCHIAVO,F.; TERZI,M.
VANDEKERCKHOVE,J.; VAN KAMMEN,A.; DE VRIES,S.C.L A plant carrot
somatic embryo mutant is rescued by chitinase. **Plant Cell**, v.4, p.425-433,
1992.
- DÍAZ, C.L.; MELCHERS, L.S; HOOYKAAS, P.J.J.; LUGTENBERG, B.J.J.;
KIJNE, J.W. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the
Rhizobium-legume symbiosis. **Nature**, v.338, p.579-581, 1989.
- DUDDRIDGE, J.A. The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. III.
Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevillei*
(Klotzsch)Sing. and a number of ectomycorrhizal hosts in vitro, in the
absence of exogenous carbohydrate. **New Phytologist**, v. 103, p.457-464,
1986.
- DUDDRIDGE,J.A. Specificity and recognition in ectomycorrhizal associations.
In: PEGG,G.F. & AYRES P.G. (ed.). **Fungal Infection of plants**. British
Mycological Society Symposium 13. Cambridge, 1987.
- GIANINAZZI-PEARSON, V.; BRANZANTI, B.; GIANINAZZI, S. *In vitro*
enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-
arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids.
Symbiosis, v.7, p.243-255, 1989.
- GILTRAP,N.J.; LEWIS,D.H. Catabolite repression of the synthesis of pectin-
degrading enzymes by *Suillus luteus* (L. ex. fr.) S.F. Gray and *Hebeloma*
oculatum bruchet. **New Phytologist**,v. 90, p.485-493, 1982.
- GIOVANNETTI, M.; SBRANA, C.; CITERNESI, A. S.; AVIO, L. Analysis of
factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by
arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.133, p.65-71, 1996.
- GRAHAM, L.; STICKLEN, M.B. Plant chitinases. **Canadian Journal of Botany**,
v.72, p.1057-1083, 1994.

- HAMMERSCHMIDT, T.R.; NUCLES,E.M.; KUC,J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, p. 73-82,1982.
- HARLEY,J.L.; SMITH,S.E. **Mycorrhizal Symbiosis**. London: Academic Press, 1983. 483p.
- HODGE, A.; ALEXANDER,I.J.; GOODAY,G.W.; WILLIAMSON,F.A. Localization of chitinolytic activities in *Fagus sylvatica* mycorrhizas. **Mycorrhiza**, v. 6, p.181-187, 1996.
- HODGE,A.; ALEXANDER,I.J.; GOODAY,G.W. Chitinolytic activities of Eucalyptus pilularis and Pinus sylvestris root systems challenged with mycorrhizal and pathogenic fungi. **New Phytologist**, v. 131, p. 255-261, 1995.
- HORAN,D.P.; CHILVERS,G.A. & LAPEYRIE, F.F. Time sequence of the infection process in eucalypt ectomycorrhizas. **New Phytologist**, v. 109, p.451-458, 1988.
- HORVATH, B.; BACHEM, W.B.; SCHELL, J.; KONDOROSI, A. Host-Specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant-signal, interacting with the nod D gene product. **Embo Journal**, v.6, p.841-848, 1987.
- JACOBS, A. K.; DRY, I. B.; ROBINSON, S.P. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. **Plant Pathology**, v.48, p.325-336, 1999.
- JENSEN,W.A. **Botanical Histochemistry**. San Francisco: W.A. Freeman and Co.,1962.
- JI, C.; KUC, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, p.257-265, 1996.
- KARNOVSKY,M.J. A formaldeide-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p.137 A, 1965.

- KOIDE, R.T.; SCHREINER, R.P. Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.557-581, 1992.
- KROPP, B.R.; ANDERSON, A.J. Molecular and genetic approaches to understanding variability in mycorrhizal formation and functioning. In: PFLEGER, F.L. & LINDERMAN, R.G. (ed.) **Mycorrhizae and Plant Health**. APS Press, St Paul, Minnesota, 1994. p. 309-336.
- LAMBAIS, M.; MEHDY, M. C. Spatial distribution of chitinases and β -1,3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions. **New Phytologist**, v.140, p.33-42, 1998.
- LAMBAIS, M.; MEHDY, M.C. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. **Canadian Journal of Botany**, v.73, suppl. 1, p. s533-s540, 1995.
- LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Suppression of endochitinase, β -1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.6, n.1, p.75-82, 1993.
- LANGE, J.; MOHR, U.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T.; VÖGELI-LANGE, R. Proteolytic processing of class IV chitinase in the compatible interaction of bean roots with *Fusarium solani*. **Plant Physiology**, v.111, p. 1135-1144, 1996.
- LEI, J.; BÉCARD, G.; CATFORD, J.G.; PICHÉ, Y. Root factors stimulate ^{32}P uptake and plasmalemma ATPase activity in vesicular-arbuscular fungus, *Gigaspora margarita*. **New Phytologist**, v.118, p.289-294, 1991.
- LEI, J.; LAPEYRIE, F.; MALAJCZUK, N.; DEXHEIMER, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers) Coker & Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake in vitro. II. Ultrastructural and biochemical changes at the early stage of mycorrhiza formation. **New Phytologist**, v. 116, p. 115-122, 1990.

- LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v. 47, p.273-279, 1972.
- LING-LEE, M.; CHILVERS, G.A.; ASHFORD, A.E. A histochemical study of phenolic materials in mycorrhizal and uninfected roots of *Eucalyptus fastigata* Deane and Maiden. **New Phytologist**, v. 78, p. 313-328, 1977.
- LINTHORST, H.J.M.; BOL, J.E.; CORNELISSEN, B.J.C. Plant pathogenesis related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p.113-138, 1990.
- LIU, R. -J.; LI, H. -F.; SHEN, C. -Y.; CHIU, W. -F. Detection of pathogenesis-related proteins in cotton plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.47, p.357-363, 1995.
- LYNN, D.G.; CHANG, M. Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.41, p.497-526, 1990.
- MALAJCZUK, N.; LAPEYRIE, F.; GARBAYE, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. 1. Mycorrhiza formation in model systems. **New Phytologist**, v. 114, p. 627-631, 1990.
- MARKS, G.C.; FOSTER, R.C. Structure, morphogenesis and ultrastructure of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C.; KOSLOWISKI, T.T. (Ed.) **Ectomycorrhizae, Their Ecology and Physiology**. New York: Academic Press, 1973. cap 1, p. 1-41.
- MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, v.59, p.153-163, 1969.
- MOHR, U.; LANGE, J.; BOLLER, T.; WEMKEN, A.; VÖGELI-LANGE, R. Plant defence genes are induced in the pathogenic interaction between bean roots and *Fusarium solani*, but not in the symbiotic interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **New Phytologist**, v.138, p.589-598, 1998.

- MOLINA, R.; TRAPPE, J.M. Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among pacific northwest conifers and fungi. **Forest Science**, v.28, p.423-458, 1982.
- MORTON, P.F.; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zigomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Micotaxon**, v. 37, p. 471-91, 1990.
- MULLIGAN, J. T.; LONG, S. R. Induction of *Rhizobium meliloti* nod C expression by plant exudate requires nod D. **Proceedings of the National Academic of Sciences of United States of America**. v. 82, p. 6609-6613, 1985.
- MÜNZENBERGER, B.; HEILEMANN, J.; STRACK, D.; KOTTKE, I.; OBERWINKLER, F. Phenolic of mycorrhizas and non-mycorrhizal roots of Norway spruce. **Planta**, v. 182, p.142-148, 1990.
- MÜNZENBERGER, B.; OTTER, T.; WÜSTRICH, D.; POLLE, A. Peroxidase and laccase activities in mycorrhizal and non-mycorrhizal fine roots of norway spruce (*Picea abies*) and larch (*Larix decidua*). **Canadian Journal of Botany**, v.75, p.932-938, 1997.
- NAIR, M.G.; SAFIR, G.R.; SIQUEIRA, J.O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. **Applied and environmental microbiology**, v.57, n. 2, p.434-439, 1991.
- NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p. 369-389, 1992.
- NIDERMAN, T.; GENETET, I.; BRUYÈRE, T.; GEES, R.; STINTZI, A.; LEGRAND, M.; FRITIG, B.; MÖZINGER, E. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. **Plant Physiology**, v.108, p.17-27, 1995.

- NYLUND,J.; UNESTAM, T. Structure and Physiology of Ectomycorrhizae. I. The process of mycorrhiza formation in Norway spruce in vitro. **New Phytologist**, v. 91, p. 63-79, 1982.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE,B. Mecanismos bioquímicos de resistência à doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.2, p.1-51, 1994.
- PETERS, N. K.; VERMA, D. P. S. . Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. **Molecular plant-microbe interactions**,v. 3, n.1, p.4-8, 1990.
- REISERT,P.S. Plant cell surface structure and recognition phenomena with reference to symbioses. In: MUGGLETON-HARRIS (Ed.) **International Review of Cytology**, suplement 12, p.71-111, 1981.
- RIDE, J.P. The role of cell wall alterations in resistance to fungi. **Annals of Applied Biology**, v. 89, p. 302-306, 1978.
- RONALD, P. ; SODERHALL, K. Phenylalanine ammonia lyase and peroxidase activity in mycorrhizal short roots of scots pine, *Pinus sylvestris* L. **New Phytologist**, v.101, p.487-494, 1985.
- RYAN, C. A.; FARMER, E. E. Oligossacharide signals in plants: A current assesment. **Annual Review of Planta Physiology and Molecular Biology**, v.42, p. 651-674, 1991.
- SAKAI,W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**. **4S** (5):247-249, 1973.
- SALMANOWICZ,B.; NYLUND,E. High performance liquid chromatography determination of ergosterol as a measure of ectomycorrhiza infection in scots pine. **European Journal of Forest Pathology**, v. 18, p.291-298,1988.
- SAUTER, M.; HAGER,A. The mycorrhizal fungus *Amanita muscaria* induces chitinase activity in roots and in suspension-cultured cells of its host *Picea abies*. **Planta**, v. 179, p. 61-66, 1989.
- SCHLOSS,P.; WALTER, C.; MADER,M. Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, v.170, p.225-229, 1987.

- SCHLUMBAUM, A.; MAUCH, F.; VÖGELI, U.; BOLLER, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, v.324, p.365-367, 1986.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Caracterização enzimática de fungos ectomicorrízicos e o envolvimento de enzimas celulolíticas na simbiose *Eucalyptus urophylla* - *Pisolithus tinctorius*. Piracicaba, 1997. 140 p. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SELA-BUURLAGE, M.B.; PONSTEIN, A.S.; BRES-VLOEMANS, S.A.; MELCHERS, L.S.; VAN DEN ELZEN, P.J. M.; CORNELISSEN, B.J.C. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. **Plant Physiology**, v. 101, p. 857-863, 1993.
- SIQUEIRA, J.O.; SAFIR, G.R.; NAIR, M.G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. **New Phytologist**, v.118, p.87-93, 1991a.
- SIQUEIRA, J.O.; NAIR, M.G.; HAMMERSCHMIDT, R.; SAFIR, G.R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. **Critical Review in Plant Science**, v.10, n.1, p. 63-121, 1991b.
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotecnologia do Solo - Fundamentos e perspectivas**. Brasília, DF, MEC - ESAL - FAEPE - ABEAS, 1988. 235 p.
- SPAINK, H.P.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E.; OKKER, R.J.H.; LUGTENBERG, B.J.J. *Rhizobium* nodulation gene nod D as a determinant of host specificity. **Nature**, v.328, p.337-339, 1987.
- SPANU, P.; BONFANTE-FASOLO, P. Cell-wall-bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. **New Phytologist**, v.109, p.119-124.
- SPANU, P.; BOLLER, T.; LUDWIG, A.; WIEMKEN, A.; FACCIO, A.; BONFANTE-FASOLO, P. Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. **Planta**, v.177, p.447-455, 1989.
- STANGARLIN, J. R. 1995. Caracterização de sítios de infecção de *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs em diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.), com base nos mecanismos de defesa vegetal.

- Piracicaba, 1995. 93p. Tese (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" , Universidade de São Paulo.
- STROBEL, N.E.; SINCLAIR,W.A. Role of flavanolic wall infusions in the resistance induced by *Laccaria bicolor* to *Fusarium oxysporum* in primary roots of douglas-fir. **Phytopathology**, v.81, p.420-425, 1991.
- TRAPPE,J.M. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. **Annual Review of Phytopatology**, v. 15, p. 203-222, 1977.
- VAN LOON, L.C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrilamide disc eletrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'. II. changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. **Virology**, v.40, p. 199-210, 1970.
- VIERHEILIG, H.; ALT-HUG, M.; ENGEL-STREITWOLF, R.; MÄDER, P.; WIEMKEN, A. Studies on the attractional effect of root exudates on hyphal growth of an arbuscular mycorrhizal fungus in a soil compartment-membrane system. **Plant and Soil**, v.203, p.137-144, 1998.
- VÖGELI, U.; MEINS, F.; BOLLER, T. Co-ordinated regulation of chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. **Planta**, v.174, p.364-372, 1988.
- VOLPIN, H.; PHILLIPS, A.; OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfafa roots. **Plant Physiology**, v.108, p.1449-1454, 1995.
- WEISS, M.; MIKOLAJEWSKI,S.; PEIPP,H.; SCHMITT,U.; SCHMIDT,J.; WRAY, V.;STRACK,D. Tissue-specific and development-dependent accumulation of phenylpropanoids in larch mycorrhizas. **Plant Physiology**, v.114, p.15-27, 1997.
- WEISS, M.; SCHMIDT,J.; NEUMANN,D.; WRAY,V.; CHRIST, R.; STRACK, D. Phenylpropanoids in mycorrhizas of the Pinaceae. **Planta**, v.208, p.491-502, 1999.
- WIRTH; WOLF. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lisozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, v.12, p.197-205, 1990.

- WONG, K. K. Y.; FORTIN, J. A. A Petri dish technique for the aseptic synthesis of ectomycorrhizae. **Canadian Journal of Botany**, v. 77, p. 1713-1716, 1989.
- YI , S.Y.; HWANG, B.K. Differential induction and accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in soybean hypocotyls and leaves after compatible and incompatible infection with *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.48.p.179-192, 1996.

APÊNDICE

Apêndice 1. Dosagem do ergosterol nas raízes de *E. urophylla* inoculadas com os isolados 185 (Δ) e 1604 (□) de *P. tinctorius* e nas raízes não inoculadas (O). Os dados referentes às raízes não inoculadas não apresentaram alterações significativas em função do tempo.

Apêndice 2. Curvas padrão mostrando a relação entre o peso seco do micélio de *Pisolithus tinctorius* isolados 185 (Δ) e 1604 (□) e a quantidade de ergosterol presente.

Apêndice 3. Crescimento micelial de isolados dos isolados 185 e 1604 de *P. tinctorius* em meio agar batata dextrose. Placas incubadas no escuro, 27°C, 20 dias de incubação.