**CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS E
O ENVOLVIMENTO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS NA SIMBIOSE**
Eucalyptus urophylla - Pisolithus tinctorius

KÁTIA REGINA FREITAS SCHWAN ESTRADA

Engenheiro Agrônomo

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.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Maio - 1997

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

Estrada, Kátia Regina Freitas Schwan

Caracterização enzimática de fungos ectomicorrízicos e o envolvimento de enzimas celulolíticas na simbiose *Eucalyptus urophylla* - *Pisolithus tinctorius* / Kátia Regina Freitas Schwan Estrada. - Piracicaba, 1997.

135 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia.

1. Celulose 2. Eucalipto 3. Micorriza 4. Simbiose I. Título

CDD 589.2
574.52482

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS E O ENVOLVIMENTO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS NA SIMBIOSE

Eucalyptus urophylla - Pisolithus tinctorius

KÁTIA REGINA FREITAS SCHWAN ESTRADA

Aprovada em: 27.06.1997

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Tasso Leo Krugner

ESALQ/USP

Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

ESALQ/USP

Prof. Dr. Márcio Rodrigues Lambais

ESALQ/USP

Prof. Dr. Breno Leite

UFPR - Curitiba

Prof^a. Dr^a. Elza Maria Frias Martins

Instituto Biológico - SP

Prof. Dr. TASSO LEO KRUGNER

Orientador

“Tu fidelidad es grande
Tu fidelidad incomparable es
Nadie como Tu, bendito Dios,
grande es Tu fidelidad.”

(Miguel Cassina)

“A benignidade do Senhor jamais acaba, as suas
misericórdias não têm fim, renovam-se a cada manhã.
Grande é a sua fidelidade !”
(Lamentações de Jeremias 3: 22-23).

Ao meu marido Leonel,
aos meus pais, Conrado e Joana,
irmãos Rosane, Saul e Kênia Mara e
sobrinhos Éric, Felipe e Vítor,

Dedico

AGRADECIMENTOS

“Como agradecer ao meu Deus o que fez por mim, bênçãos sem medida para demonstrar o Seu Amor por mim. Nem anjos podem expressar a minha eterna gratidão, pelo que sou e o que vier a ser aqui, eu agradeço a Ti.”

Quero agradecer a Deus pelas muitas bênçãos que me concedeu no decorrer deste curso. Bênção de ter tido além de dois Professores Orientadores, dois amigos e profissionais exemplares: Prof. Dr. Sérgio F. Pascholati e Prof. Dr. Tasso Leo Krugner. Muito obrigada por todo estímulo e por toda compreensão!

Como agradecer pelos amigos, que com o passar do tempo se tornaram “chegados como um irmão”? Muito obrigada, José Renato, por ter sido um irmão nesta minha caminhada, por tornar o complicado em simples, por ter confiado e incentivado!. Que Deus lhe abençoe!

E aos amigos que tornaram as horas difíceis em horas amenas, como agradecer? À Marise, Juliana, Gisèle, Cecília, Prof. Hiroshi Kimati, Célia Regina, Antônio Góes, Paulo Chagas, Heloísa, Marco Galli, Roberto Carvalho, Isabel Fancelli e especialmente, à turma do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo: José Renato, Robson, Fabiana, Hélio, Nelson, Márcia, Marilda, Thaís e Everaldo, muito obrigada!

Como agradecer pela ajuda nos trabalhos que Marina, Fernanda, Rodolfo, Edivaldo e Pedro da Silva, deram? Obrigada!

Como agradecer pelos meus pais e pelos meus irmãos que amam, confiam e apoiam independente de qualquer coisa? É difícil agradecer por um amor tão incondicional! Muito obrigada, por mais esta vez, terem apoiado, estimulado, lutado em orações por esta nossa Vitória!

Como agradecer ao Leonel? Obrigada, meu marido, por toda a compreensão, amor, estímulo, apoio, companheirismo e oração!

Como agradecer aos irmãos da Igreja Batista Memorial de Maringá (Max e Jane, Douglas e Marli, Paulo e Ágda, Alcides e Rita, Pr. Ophir e Joana, Ivany e Ozinaldo) pelas orações e estímulo? Que o Senhor nosso Deus possa abençoá-los ricamente!

Agradeço também à Universidade Estadual de Maringá e aos meus colegas do Departamento de Agronomia, por terem me concedido a oportunidade de realizar este curso.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Estrutura de ectomicorriza.....	4
2.2. Interação fungo ectomicorrízico-planta hospedeira.....	5
2.3. Compatibilidade/especificidade na associação ectomicorrízica.....	7
2.4. Componentes estruturais da parede celular do hospedeiro.....	9
2.5. Atividade enzimática.....	11
2.5.1. Celulases: mecanismos de ação, indução e repressão.....	11
2.5.2. Exo e endo β-1,4 glucanases.....	13
2.5.2.1. Exo e endo β-1,4 glucanases de fungos fitopatogênicos.....	16
2.5.2.2. Exo e endo β-1,4 glucanases de fungos micorrízicos.....	18
2.5.3. β-glicosidase.....	20
2.5.4. Xilanase.....	22
2.5.5. Esterase.....	24
2.6. API-ZYM.....	27
2.7. Quantificação de fungos em tecidos vegetais através do ergosterol.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Origem e manutenção dos fungos ectomicorrízicos.....	31

3.2. Caracterização dos isolados de <i>P. tinctorius</i> e <i>Rhizopogon</i> sp, pela capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono....	31
3.3. Determinação da atividade celulolítica.....	32
3.3.1. Atividade de exo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.91).....	32
3.3.2. Atividade de endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4).....	33
3.3.3. Atividade de β -glicosidase (EC 3.2.1.21).....	34
3.4. Atividade de xilanase.(EC 3.2.1.8).....	34
3.5. Dosagem de proteínas totais.....	35
3.6. Caracterização parcial das enzimas celulolíticas dos isolados de <i>P. tinctorius</i> e <i>Rhizopogon</i> sp por cromatografia de filtração em gel	36
3.6.1. Preparo das amostras.....	36
3.6.2. Filtração em gel.....	36
3.7. Caracterização enzimática pelo sistema API-ZYM.....	37
3.8. Caracterização isoenzimática de esterase dos isolados de <i>P. tinctorius</i> e <i>Rhizopogon</i> sp.....	39
3.8.1. Extração de proteínas e preparo das amostras.....	39
3.8.2. Corrida eletroforética e coloração dos géis.....	40
3.9. Atividade celulolítica na associação ectomicorrízica.....	40
3.9.1. Desenvolvimento de ectomicorrizas pela técnica de papel sanduíche.....	40
3.9.2. Atividade celulolítica.....	44
3.10. Determinação da biomassa fúngica e micorrização pela quantificação de ergosterol.....	44
3.11. Microscopia eletrônica de varredura.....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1. Utilização de fontes de carbono.....	46
4.2. Atividade enzimática <i>in vitro</i>	49
4.2.1. Atividade de exo β -1,4 glucanase (avicelase, celobiohidrolase).....	49

4.2.2. Atividade de endo β -1,4 glucanase (carboximetilcelulase - CMCase).....	52
4.2.3. Atividade de β - glicosidase (celobiase).....	56
4.2.4. Atividade de xilanase.....	58
4.3. Caracterização parcial das enzimas celulolíticas.....	61
4.4. Caracterização enzimática pelo sistema API-ZYM.....	64
4.5 Caracterização dos isolados de <i>P. tinctorius</i> e de <i>Rhizopogon</i> sp pelo padrão isoenzimático de esterases.....	66
4.6. Atividade celulolítica na associação ectomicorrízica.....	68
4.6.1. Formação das ectomicorrizas.....	68
4.6.2. Atividade celulolítica.....	69
4.6.3. Caracterização parcial das enzimas celulolíticas na associação ectomicorrízica.....	75
5. CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
APÊNDICE.....	128

LISTA DE FIGURAS

1	Representação esquemática das estruturas de ectomicorriza. c.m: cordão micelial; r.H: rede de Hartig; m: manto.....	05
2	Estrutura conformacional de celulose (Goksoyr & Eriksen, 1980).....	10
3	Etapas da hidrólise da celulose (Ryu & Mandels, 1980).....	14
4	Obtenção de ectomicorrizas em plântulas de <i>E. urophylla</i> , pela técnica de papel sanduíche.....	43
5	Efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento micelial de fungos micorrízicos. <i>P. tinctorius</i> (<i>P.t.</i>) 1603 (A), <i>P.t.</i> 1604 (B), <i>P.t.</i> 1605 (C), isolados de <i>Eucalyptus</i> ; <i>P.t.</i> 185 (D) e <i>Rhizopogon</i> sp (E), isolados de <i>Pinus</i> . Fungos crescidos em meio MNM + 0,3% de extrato de levedura + 1% do carboidrato de interesse. Controle: MNM + 0,3% de extrato de levedura.....	79
6	Produção de exo β-1,4 glucanase por <i>P. tinctorius</i> (<i>P.t.</i>) 1603 (A), <i>P.t.</i> 1604 (B), <i>P.t.</i> 1605 (C), isolados de <i>Eucalyptus</i> ; <i>P.t.</i> 185 (D) e <i>Rhizopogon</i> sp (E), isolados de <i>Pinus</i> . Fungos cultivados em meio MNM acrescido de celulose microcristalina 1% (Avicel), como fonte de carbono. Atividade enzimática determinada por método espectrofotométrico indireto, tendo Avicel como substrato. As barras indicam o erro padrão da média. Os valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).....	80

- 7 Produção de **endo β -1,4 glucanase** por *P. tinctorius* (*P.t.*) 1603 (**A**), *P.t.* 1604 (**B**), *P.t.* 1605 (**C**), isolados de *Eucalyptus*; *P.t.* 185 (**D**) e *Rhizopogon* sp (**E**), isolados de *Pinus*. Fungos cultivados em meio MNM acrescido de celulose nativa 0,5% (CN) e CN + glicose (0,1%), como fontes de carbono. Atividade enzimática determinada por método espectrofotométrico indireto, tendo carboximetilcelulose (CMC) como substrato. As barras indicam o erro padrão da média. (●) CN; (○) CN + glicose. Os valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$)..... 81
- 8 Produção de **endo β -1,4 glucanase** por *P. tinctorius* (*P.t.*) 1603 (**A**), *P.t.* 1604 (**B**), *P.t.* 1605 (**C**), isolados de *Eucalyptus*; *P.t.* 185 (**D**) e *Rhizopogon* sp (**E**), isolados de *Pinus*. Fungos cultivados em meio MNM acrescido de carboximetilcelulose (CMC) 1% e CMC + glicose (0,1%), como fontes de carbono. Atividade enzimática determinada por método espectrofotométrico indireto, tendo CMC como substrato. As barras indicam o erro padrão da média. (■) CMC; (□) CMC + glicose. Os valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$)..... 82
- 9 Produção de **β -glicosidade** por *P. tinctorius* (*P.t.*) 1603 (**A**), *P.t.* 1604 (**B**), *P.t.* 1605 (**C**), isolados de *Eucalyptus*; *P.t.* 185 (**D**) e *Rhizopogon* sp (**E**), isolados de *Pinus*. Fungos cultivados em meio MNM acrescido de celobiose 1%, como fonte de carbono. Atividade enzimática determinada por método espectrofotométrico indireto, tendo p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato. As barras indicam o erro padrão da média. Os valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$)..... 83

- 10 Produção de **xilanase** por *P. tinctorius* (*P.t.*) 1603 (**A**), *P.t.* 1604 (**B**), *P.t.* 1605 (**C**), isolados de *Eucalyptus*; *P.t.* 185 (**D**) e *Rhizopogon* sp (**E**), isolados de *Pinus*. Fungos cultivados em meio MNM acrescido de carboximetilcelulose (CMC) 1%, como fonte de carbono. Atividade enzimática determinada por método espectrofotométrico indireto, tendo xilana carboximetilada marcada com remazol brilhante azul (“CM-xylan-RBB”), como substrato. As barras indicam o erro padrão da média. Os valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05)..... 84

- 11 Separação em Sephacryl S-100 HR de **endo β -1,4 glucanases** de *P. tinctorius* (*P.t.*) 1603 (**A**), *P.t.* 1604 (**B**), *P.t.* 1605 (**C**), *P.t.* 185 (**D**) e *Rhizopogon* sp (**E**), a partir de 1,0 ml de filtrado concentrado (x40) e dialisado de meio de cultura MNM com carboximetilcelulose (CMC) 1%, como fonte de carbono. As frações (1,6 ml) foram coletadas e analisadas por método espectrofotométrico indireto, tendo (CMC) como substrato. Isoenzimas indicadas por algarismos romanos..... 85

- 12 Separação em Sephacryl S-100 HR de **exo β -1,4 glucanases** de *P. tinctorius* (*P.t.*) 1603 (**A**), *P.t.* 1604 (**B**), *P.t.* 1605 (**C**), *P.t.* 185 (**D**) e *Rhizopogon* sp (**E**), a partir de 1,0 ml de filtrado concentrado (x40) e dialisado de meio de cultura MNM com carboximetilcelulose (CMC) 1%, como fonte de carbono. As frações (1,6 ml) foram coletadas e analisadas por método espectrofotométrico indireto, tendo celulose microcristalina (Avicel) como substrato. Isoenzimas indicadas por algarismos romanos..... 86

- 13 Separação em Sephacryl S-100 HR de β -**glicosidases** de *P. tinctorius* (*P.t.*) 1603 (**A**), *P.t.* 1604 (**B**), *P.t.* 1605 (**C**), *P.t.* 185 (**D**) e *Rhizopogon* sp (**E**), a partir de 1,0 ml de filtrado concentrado (x40) e dialisado de meio de cultura MNM com carboximetilcelulose (CMC) 1%, como fonte de carbono. As frações (1,6 ml) foram coletadas e analisadas por método espectrofotométrico indireto, tendo p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato. Isoenzimas indicadas por algarismos romanos..... 87
- 14 Curva de calibração de coluna (23 cm x 1,6 cm) empacotada com gel Sephacryl S-100HR. *Void volume* determinado com *Blue dextran*. Pesos moleculares dos padrões (em kDa): bacitracina - 1,45; aprotinina - 6,5; citocromo C - 14,2; anidrase carbônica - 29,0; soro albumina bovino - 66,0. ($\square$) endo β -1,4 glucanase; ($\circ$) exo β -1,4 glucanase; (Δ) β -glicosidase de *P. tinctorius* 1603..... 88
- 15 **a)** Eletroforese anódica em gel nativo de poliacrilamida de extrato proteico de micélio (M) e filtrado (F) de cultura de *P. tinctorius*, isolados 1603 (A), 1604 (B), 1605(C) e 185(D), e de *Rhizopogon* sp (E). Gel corado com α -naftil acetato para visualização de isoenzimas de α -esterase. ig: interseção entre os géis separador e de corrida. **b)** Representação esquemática das bandas eletroforéticas obtidas. MR: mobilidade relativa..... 89

- 16 Aspecto visual da formação de ectomicorrizas em *E. urophylla*, 10 dias após a inoculação com os isolados de *P. tinctorius* 1604 (**A**, **B** e **C**) e 185 (**D** e **E**). (**F**): testemunha não inoculada. Mic: micorriza; ME: micélio extramatricial; M: manto. Valores das barras em mm..... 90
- 17 Quantidade de micélio de *P. tinctorius* isolados 1604 (-●-) e 185 (-●-) presente em raízes de *E. urophylla*. Testemunha (-●-) representada por raízes de plantas não inoculadas. Barras representam o erro padrão da média..... 91
- 18 Micrografia eletrônica de varredura de raízes de *E. urophylla* inoculadas com *P. tinctorius* 1604 (compatível). Em (**A-F**) observam-se poucas hifas (H) ao redor das raízes e a presença de pontos de penetração (PP), 12 h após a inoculação. Em (**G**) (24 h) ocorre maior crescimento micelial e início de formação de manto em (**H**) (48 h). PR: pelo radicular; GC: grampo de conexão; R: raiz e EH: extremidade da hifa. Barras representam 100 µm em A, D, E, F e 10 µm em B, C, G, H..... 92
- 19 Micrografia eletrônica de varredura de raízes de *E. urophylla*, 6 dias (**A** -detalhe em **B**) e 10 dias (**C** - detalhe em **D**), após a inoculação com *P. tinctorius* 1604. Observa-se a formação de ectomicorriza (MIC), com manto típico (M) e micélio extramatricial (ME). (**E**) e (**F**): cortes transversais de ectomicorrizas com 10 dias. Barras representam 100 µm..... 93

- 20 Micrografia eletrônica de varredura de raízes de *E. urophylla* inoculadas com *P. tinctorius* 185 (incompatível). (A-B) 12 h; (C) 24 h; (D) 48 h após a inoculação. Pontos de penetração (PP) foram observados somente após 48 h (E). Em (F) e (G): presença de micélio extramatricial (ME) e início de formação de manto (M). H e I manto atípico formado aos 10 dias. H: hifa; PR: pelo radicular; GC: grampo de conexão. Barras representam 100 μm em A, C, D, F, H, I e 10 μm em B, E, G..... 94
- 21 Micrografia eletrônica de varredura de raízes não inoculadas de *E. urophylla* com 0 h (A), 2 dias (B) e 10 dias (C). PR: pelo radicular; R: raiz Barras representam 100 μm em A, C; 10 μm em B..... 95
- 22 Atividade de endo β -1,4 glucanase (A), exo β -1,4 glucanase (B) e β -glicosidase (C) em ectomicorrizas formadas por *E. urophylla* e *P. tinctorius* isolados 1604 (-●-) e 185 (-●-). Testemunha não inoculada (-●-). Barras representam o erro padrão da média..... 96
- 23 Separação em Sephacryl S-100 HR de **endo β -1,4 glucanase** de plântulas de *E. urophylla* não inoculadas (testemunha - □), inoculadas com *P. tinctorius* 1604 (□) e *P. tinctorius* 185 (□), a partir de 1,0 ml de homogeneizado de raízes. As frações (1,6 ml) foram coletadas e analisadas por método espectrofotométrico indireto, tendo carboximetilcelulose (CMC) como substrato. Os tempos representam dias após as inoculações para os demais tratamentos. Isoenzimas indicadas por algarismos romanos..... 97

- 24 Separação em Sephacryl S-100 HR de **exo β -1,4 glucanase** de plântulas de *E. urophylla* não inoculadas (testemunha - ○), inoculadas com *P. tinctorius* 1604 (●) e *P. tinctorius* 185 (○), a partir de 1,0 ml de homogeneizado de raízes. As frações (1,6 ml) foram coletadas e analisadas por método espectrofotométrico indireto, tendo celulose microcristalina (Avicel) como substrato. Os tempos representam dias após as inoculações para os demais tratamentos. Isoenzimas indicadas por algarismos romanos..... 98
- 25 Separação em Sephacryl S-100 HR de **β - glicosidase** de plântulas de *E. urophylla* não inoculadas (testemunha - ▲), inoculadas com *P. tinctorius* 1604 (▲) e *P. tinctorius* 185 (▲), a partir de 1,0 ml de homogeneizado de raízes. As frações (1,6 ml) foram coletadas e analisadas por método espectrofotométrico indireto, tendo *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato. Os tempos representam dias após as inoculações para os demais tratamentos. Isoenzimas indicadas por algarismos romanos..... 99

LISTA DE TABELAS

1	Enzimas analisadas pelo sistema API-ZYM, com os respectivos substratos.....	38
2	Massa molecular relativa de isoenzimas de endo β -1,4 glucanase, exo β -1,4 glucanase e β -glicosidase, produzidas <i>in vitro</i> por isolados de <i>P. tinctorius</i> e <i>Rhizopogon</i> sp.....	100
3	Avaliação da atividade enzimática pelo teste API-ZYM de filtrado de culturas de isolados de <i>P. tinctorius</i> e <i>Rhizopogon</i> sp. As enzimas avaliadas nos locais de reação numerados de 1 a 20 (número 1 equivale ao controle, sem substrato) estão especificadas na Tabela 1. Os valores de 0 a 5 representam as notas aplicadas a cada reação, conforme escala de cores do fabricante (Apêndice 4). A coloração resultante indica a presença ou não de atividade enzimática, enquanto que a intensidade da cor quantifica o produto formado.....	101
4	Massa molecular relativa de isoenzimas de endo β -1,4 glucanase, exo β -1,4 glucanase e β -glicosidase de raízes de plântulas de <i>E. urophylla</i> não inoculadas (testemunha) e inoculadas com <i>P. tinctorius</i> (isolados 1604 e 185).....	102

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS E O ENVOLVIMENTO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS NA SIMBIOSE *Eucalyptus urophylla* - *Pisolithus tinctorius*

Autora: KÁTIA REGINA FREITAS SCHWAN ESTRADA

Orientador: Prof. Dr. TASSO LEO KRUGNER

RESUMO

Para que ocorra a formação de uma simbiose ectomicorrízica funcional é necessário que exista um certo grau de compatibilidade entre os simbiontes envolvidos. Entretanto, observa-se que pode ocorrer uma variação no grau de compatibilidade para diferentes isolados de uma mesma espécie fúngica, resultando ou não em uma simbiose funcional. É possível que esta associação diferencial esteja relacionada a algum fator de reconhecimento do hospedeiro ou a diferenças bioquímicas e fisiológicas entre os fungos ectomicorrízicos. Desta forma, o trabalho realizado objetivou caracterizar enzimaticamente *in vitro*, isolados de *Pisolithus tinctorius* associados a *Eucalyptus* sp e a *Pinus taeda*, e de *Rhizopogon* sp obtido de *Pinus* sp, bem como verificar o possível envolvimento de enzimas celulolíticas produzidas por isolados compatível e incompatível de *P. tinctorius* na formação de associação ectomicorrízica com *E. urophylla*.

Isolados de *P. tinctorius* (1603, 1604, 1605 - obtidos de *Eucalyptus* sp, *E. grandis* e *E. saligna*, respectivamente; 185 obtido de *Pinus taeda*) e *Rhizopogon* sp (obtido de *Pinus* sp), foram comparados quanto a: a) capacidade de utilização de fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose, maltose, xilose, celobiose, celulose nativa (CN), carboximetilcelulose (CMC) e

pectina) através do crescimento micelial em meio Melin-Norkrans modificado (MNM) sólido; b) produção de enzimas celulolíticas e de xilanase em meio MNM líquido acrescido de CMC, celulose microcristalina (Avicel) ou celobiose; c) padrão eletroforético de α -esterase; d) enzimaticamente pelo sistema API-ZYM. Para verificar o envolvimento das celulasas na associação ectomicorrízica, plântulas de *E. urophylla*, com 18 dias de idade, foram inoculadas com os isolados 1604 (compatível) ou 185 (incompatível), pela técnica do papel sanduíche. Isoenzimas de endo e exo β -1,4 glucanase e β -glicosidase produzidas *in vitro* e *in vivo* foram caracterizadas por cromatografia de filtração em gel. A micorrização foi acompanhada pela quantificação de ergosterol e por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Os resultados obtidos mostraram que os isolados de *P. tinctorius* podem ser diferenciados quanto à utilização de fontes de carbono, e que o *P. tinctorius* isolado de *Pinus* e o *Rhizopogon* sp apresentam comportamento semelhante. *P. tinctorius* 1604 foi o único isolado incapaz de produzir exo β -1,4 glucanase na presença de Avicel, mas foi o que apresentou maior atividade de endo β -1,4 glucanase na presença de CMC. Com exceção de 1605, o *start* de glicose proporcionou um pequeno estímulo para indução enzimática na presença de CN. Todos os isolados mostraram atividade de β -glicosidade na presença de celobiose e atividade de xilanase na presença de CMC (com exceção de 1603). Também foi possível diferenciar os isolados pelo sistema API-ZYM e pelo padrão eletroforético de α -esterase. O número variado de isoenzimas de exo, endo e β -glicosidase mostrou a ocorrência de um sistema celulolítico diferenciado para os isolados fúngicos. A alta atividade celulolítica observada nas primeiras 12 h após a inoculação de *P. tinctorius* 1604 em *E. urophylla* sugere o envolvimento destas enzimas nos estágios iniciais da micorrização e no maior grau de compatibilidade com a planta hospedeira. No sistema incompatível, a atividade enzimática foi relativamente menor e detectada após 24 h da inoculação. Nesta interação não houve formação de

manto micelial típico ao redor das raízes, e a micorrização avaliada pelo conteúdo de ergosterol e por MEV foi inferior à verificada na interação compatível.

**ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI AND
THE ROLE OF CELLULOLYTIC ENZYMES IN THE *Eucalyptus urophylla* -
Pisolithus tinctorius SYMBIOSIS.**

Author: Kátia Regina Freitas Schwan Estrada

Adviser: Prof. Dr. Tasso Leo Krugner

SUMMARY

During the establishment of an ectomycorrhizal symbiosis fungal penetration occurs and is followed by hyphal colonization into the intercellular cortical regions of the root giving rise the Hartig net. Outside the root the mantle and an extramatrical mycelium are produced. However, a degree of compatibility between the symbionts involved in the association is necessary. There is a variation in the degree of compatibility amongst isolates from the same species leading to functional symbiosis only in some cases. It is possible that this differential association is related to a recognition factor in the host or due to physiological and biochemical differences between ectomycorrhizal fungi. Thus, this work had two main objectives. First, the enzymatic characterization *in vitro* of isolates of *Pisolithus tinctorius* associated with *Eucalyptus* sp and *Pinus taeda* and one isolate of *Rhizopogon* sp from *Pinus* sp. Second, verify the possible role of the cellulolytic enzymes produced by isolates of *P. tinctorius* in the establishment of ectomycorrhizal symbiosis with *E. urophylla*.

Isolates of *P. tinctorius* (1603, 1604, 1605 - in symbiosis with *Eucalyptus* sp, *E. grandis* and *E. saligna*, respectively; 185 in symbiosis with *Pinus taeda*) and *Rhizopogon* sp (associated with *Pinus* sp) were characterized in relation to: (a) their ability to utilize carbon sources (glucose, fructose, sucrose, maltose, xylose, cellobiose, native cellulose (NC), carboxymethylcellulose (CMC) and pectin) based upon mycelial growth in solid

MNM agar medium; (b) production of cellulolytic enzymes and xylanase in liquid MNM medium with CMC, microcrystalline cellulose or cellobiose; (c) native gel separation of α -esterases, (d) enzymatic characterization using the API-ZYM system. To determine the role of cellulases in the ectomycorrhizal symbiosis, 18 days old seedlings of *E. urophylla* were inoculated with isolates 1604 (compatible) or 185 (incompatible) of *P. tinctorius* using the sandwich paper technique. Isoenzymes of endo and exo β -1,4 glucanase and β -glucosidase produced *in vivo* and *in vitro* were characterized by gel filtration. The level of mycorrhization was determined by quantification of ergosterol and by scanning electron microscopy (SEM).

The results showed that isolates of *P. tinctorius* from *E. grandis* can be differentiated in relation to their ability use carbon sources. Similar results were found with the isolate from *Pinus taeda* and *Rhizopogon* sp. *P. tinctorius* (isolate 1604) was the only one that did not produce exo β -1,4 glucanase when microcrystalline cellulose was the carbon source but it produced the highest activity of endo β -1,4 glucanase when CMC was the sole carbon source. All isolates, except 1605, needed a small amount of glucose to induce enzyme production in the presence of NC. All isolates tested showed activity of β -glucosidase when cellobiose was the carbon source and xylanase activity when CMC was the carbon source (except isolate 1603). It was also possible to characterize the isolates using the API-ZYM system and based upon the presence of α -esterase detected by electrophoresis. The different number of isoenzymes of exo, endo and β -glucosidase pointed out differences in the cellulolytic systems among the fungal isolates studied. The high cellulolytic activity observed during the first 12 hours after inoculation of *P. tinctorius* isolate 1604 in *E. urophylla* suggests the involvement of these enzymes in the first stages of symbiosis and also suggests a high degree of compatibility with the host plant. Enzyme activity was relatively lower when the incompatible association was studied and was observed only 24 h after inoculation. In this

interaction there was no formation of typical mantle around the roots and the development of the mycorrhiza based upon ergosterol content and SEM was less than the one observed in the compatible interaction.

1. INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus* sp é uma espécie arbórea com grande diversidade de uso, servindo como combustível vegetal e principalmente como matéria-prima para obtenção de celulose e fabricação de papel. A nível de agroecossistema, a sua ocorrência tem sido observada na recuperação de áreas degradadas, em cultivos consorciados com plantas semi-perenes, ou mesmo em grandes extensões de monocultura.

Uma das características de *Eucalyptus* sp é a capacidade de formar associações simbióticas mutualísticas com fungos micorrízicos. Nesta associação, o fungo penetra as raízes finas de absorção, onde suas hifas colonizam a região do córtex, retirando substâncias sintetizadas pela planta para o seu desenvolvimento. Por outro lado, o fungo oferece uma série de benefícios à planta, favorecendo a absorção de nutrientes do solo, especialmente fósforo, aumentando a tolerância ao déficit hídrico, proporcionando melhor balanço hormonal, além de protegê-la contra o ataque de agentes fitopatogênicos veiculados pelo solo (Marx, 1980; Krügener, 1995).

Os efeitos benéficos dessa associação simbiótica resultam em plantas com maiores taxas de sobrevivência e crescimento em condições adversas, quando comparadas com plantas não micorrizadas. Essas características têm incentivado a seleção de isolados de fungos simbiontes que sejam mais eficientes para a inoculação de mudas *in vitro* e em viveiro.

Um fator importante a ser considerado neste processo seletivo é a compatibilidade planta hospedeira - fungo simbionte. Malajczuk et al. (1990) em

observações de campo na Austrália, verificaram que basidiocarpos de *Pisolithus tinctorius* de eucalipto não cresciam em plantações nativas de *Pinus*. Estes autores estudaram o comportamento de dois isolados de *P. tinctorius*, um associado a *Pinus* e outro a *Eucalyptus*, através de inoculação cruzada em *Eucalyptus urophylla* e verificaram que ambos formavam ectomicorrizas, mas o isolado de eucalipto apresentou crescimento e colonização mais rápidos (89% de raízes micorrizadas após 7 dias de inoculação) em relação ao isolado de *Pinus* (somente 2% de raízes micorrizadas após 7 dias de inoculação). Os resultados sugeriam que possivelmente existia algum fator relacionado ao processo de reconhecimento do hospedeiro pelos fungos simbiotes que ocasionava o desenvolvimento diferencial da simbiose. Esse fator envolveria diferenças bioquímicas e fisiológicas entre os isolados de *P. tinctorius*.

Uma dessas diferenças poderia ser a atividade enzimática dos fungos simbiotes. Tem sido observado que fungos micorrízicos têm capacidade de sintetizar enzimas celulolíticas (Cao & Crawford, 1993a, b) e pectinolíticas *in vitro*, e que estas enzimas parecem desempenhar um papel importante tanto para o crescimento micelial do fungo quanto para a formação da micorriza (Natarajan & Kannan, 1982; Maijala et al., 1991; Garcia-Romera et al., 1991). Entretanto, não foi constatado se a compatibilidade esta associada com a quantidade de enzimas produzidas pelos fungos ectomicorrízicos. Além disso, nada é conhecido sobre a produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas por fungos ectomicorrízicos em associação com as plantas hospedeiras (Dahm & Strzelczyk, 1995).

A condução de estudos envolvendo a inoculação de plantas de *Eucalyptus* sp com fungos ectomicorrízicos isolados de *Eucalyptus* sp e de *Pinus* sp, e a verificação das atividades *in vitro* e *in vivo* de enzimas celulolíticas, bem como das taxas de crescimento e colonização são de grande valia, uma vez que poderão indicar a presença de algum mecanismo enzimático diferencial entre os isolados fúngicos e o seu papel no reconhecimento e na compatibilidade destas interações.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivos caracterizar enzimaticamente *in vitro* os isolados de *Pisolithus tinctorius* associados a *Eucalyptus* sp e a *Pinus taeda*, e de *Rhizopogon* sp isolado de *Pinus* sp, bem como verificar o possível envolvimento de enzimas celulolíticas na formação da associação ectomicorrízica entre *Eucalyptus urophylla* e os isolados compatível (1604) e não compatível (185) de *P. tinctorius*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estrutura de ectomicorriza

As micorrizas são classificadas, quanto à morfologia, em três tipos distintos: endomicorrizas - as estruturas do fungo se desenvolvem inter e intracelularmente, com formação de vesículas e arbúsculos e ausência de modificações morfológicas nas raízes; ectomicorrizas - as hifas do fungo se desenvolvem intercelularmente, com formação de manto e rede de Hartig e provocam modificações morfológicas nas raízes, e ectendomicorrizas - o fungo se desenvolve inter e intracelularmente com manto fino e rede de Hartig e provocam alterações morfológicas nas raízes (Peyronel et al., 1969; Siqueira & Franco, 1988).

As ectomicorrizas (**Figura 1**) são caracterizadas pela rede de Hartig que é formada pelo micélio intercelular do fungo no córtex da raiz, região onde ocorrem as trocas de nutrientes entre os simbiossiontes; pelo manto fúngico que é formado por um emaranhado de hifas externas à epiderme e que confere as cores características das associações ectomicorrízicas; e por cordões miceliais que crescem pelo solo e formam os corpos de frutificação na superfície do mesmo (Marks & Foster, 1973).

Figura 1 - Representação esquemática das estruturas de ectomicorriza.

c.m.: cordão micelial; r.H.: rede de Hartig; m: manto.

2.2. Interação fungo ectomicorrízico-planta hospedeira.

Para que a interação entre fungos ectomicorrízicos e raízes de plantas hospedeiras resulte na formação de uma ectomicorriza funcional, uma série de eventos devem ocorrer. A primeira etapa, que é a atração e a adesão da hifa do fungo na superfície da raiz, pode envolver a liberação de substâncias por ambos simbiossiontes ou por componentes da microflora geral (Piché et al., 1982, 1983). Tais substâncias podem tanto inibir quanto estimular, não somente a adesão, mas também as próximas etapas de penetração e colonização (Dahm & Strzelczyk, 1995). Após a adesão da primeira hifa, esta prolifera rapidamente ao redor das raízes curtas e pode produzir substâncias que induzem a célula do hospedeiro a liberar açúcares que serão absorvidos pelo fungo. A proliferação das hifas é organizada e varia com a combinação fungo-hospedeiro, formando assim o manto e a rede de Hartig típica de cada ectomicorriza (Massicotte et al., 1986). Sugere-se portanto que a especificidade ou o grau de compatibilidade do sistema ectomicorrízico possa estar associado à presença de exsudatos apropriados para a proliferação do fungo.

Outras pesquisas no entanto, mostram a produção pela planta de ectomicorrizas, proteínas relacionadas à simbiose, que seriam formadas na fase de reconhecimento e nos estágios iniciais da micorrização, que poderiam conduzir ou não a uma associação funcional (Hilbert et al., 1991; Hilbert & Martin, 1988). Como exemplo desses autores tem-se a pesquisa conduzida com isolados compatível e incompatível de *P. tinctorius* e *Eucalyptus globulus* subsp. *bicostata*, onde mudanças na composição de polipeptídeos foram observadas 24 h após a inoculação com o isolado compatível, verificando-se neste estágio a presença de ectomicorrizas, enquanto que para o isolado incompatível (obtido de basidiocarpo produzido em *Pinus taeda*), durante este mesmo período não se observou qualquer contato das hifas com a raiz nem tampouco a formação de ectomicorrizas.

Outros autores ainda, sugerem que a infecção de plantas por microrganismos simbióticos pode ocorrer pela produção de suas próprias enzimas ou por enzimas de outros microrganismos da rizosfera (Dahm & Strzelczyk, 1995). Duponnois¹, citado por Dahm & Strzelczyk (1995), levantou a hipótese de que bactérias da rizosfera poderiam hidrolizar a parede celular e a lamela média das células do córtex com enzimas específicas (celulase, pectinase, hemicelulase), o que facilitaria a penetração do fungo e a formação da micorriza.

Apesar das pesquisas e hipóteses até agora levantadas, pouco ou nada se conhece com relação aos fatores que realmente determinam a compatibilidade ou incompatibilidade entre os simbiontes. Alguns aspectos sobre a produção de enzimas celulolíticas por fungos ectomicorrízicos serão abordados mais adiante.

¹ DUPONNOIS, R. Les bacteries auxiliaires de la mycorhization du Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) par *Laccaria laccata* souche S 238. These de l'Universite de Nancy, France. 1992.

2.3. Compatibilidade / especificidade na associação ectomicorrízica

As associações micorrízicas podem ser formadas por diversos sistemas planta-microrganismo. Esta natureza ubíqua pode ser o resultado do baixo nível de especificidade que existe entre alguns fungos simbioses e os seus hospedeiros, embora possam apresentar níveis diferentes de compatibilidade. Algumas plantas hospedeiras no entanto, parecem ser mais seletivas para seus fungos simbioses (Duddridge, 1987). Por exemplo, *Eucalyptus* sp, *Pinus* sp, *Picea* sp e *Betula* sp formam ectomicorrizas com vários fungos simbioses (Malajczuk et al., 1982; Trappe, 1962), enquanto *Alnus* sp é restrito a poucos gêneros (Molina, 1981). Os fungos simbioses também apresentam um certo grau de especificidade, mais a nível de gênero, e poucas associações ectomicorrízicas específicas têm sido relatadas, como é o caso de *Suillus plorans* com *Pinus cembra* (Moser², citado por Duddridge, 1987).

Com relação à especificidade, os fungos ectomicorrízicos foram divididos em três categorias: a) fungos com grande potencial ectomicorrízico, baixa especificidade e que frutificam naturalmente: *Thelephora terrestris*, *Cenococcum gramiforme*, *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Laccaria laccata* e *Amanita muscaria*; b) fungos com médio potencial ectomicorrízico, com certa especificidade, frutificação limitada e dependentes do hospedeiro: *Suillus lakei* x *Pseudotsuga menziesii*, *Rhizopogon vinicolor* x *Pinus* sp; e c) fungos com baixo potencial ectomicorrízico, formando micorriza apenas com uma espécie hospedeira: *Suillus* spp e *Rhizopogon* spp que são específicos para coníferas, *Alpova diplophloeus* para *Alnus* spp e *Hydnangium carneum* para *Eucalyptus* spp (Molina & Trappe, 1982).

²MOSER, M. Rohrlinge und Blatterpilze. 4 Auflage. Band 11b der *Kleinen Kryptogamenflora*, ed. H. Gams. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1978.

Kropp & Trappe (1982) sugerem que a compatibilidade dos fungos simbioss para com as espécies hospedeiras deve estar relacionada com o pioneirismo destas últimas. Schmidt et al. (1992) avaliaram a colonização por fungos ectomicorrízicos em seis populações de *Eucalyptus dunnii*, distribuídas em quatro áreas onde anteriormente havia sido cultivado *E. viminalis*, em uma área onde havia sido cultivado *Pinus taeda* e em outra área cultivada com soja. Os resultados obtidos sugeriram que a cultura antecedente desempenhava um papel importante no potencial de inóculo e que a baixa formação de ectomicorrizas, observada inicialmente nas áreas onde havia sido plantado *P. taeda*, poderia resultar da incompatibilidade de fungos ectomicorrízicos de *Pinus* com *E. dunnii*.

A baixa especificidade de *P. tinctorius* com relação ao hospedeiro dentro do gênero *Eucalyptus* tem sido objeto de estudos para diversos pesquisadores. Chilvers (1973) obteve micorrizas inoculando culturas puras do micélio de *P. tinctorius* em *Eucalyptus maculata*, *E. fastigata*, *E. sieberi*, *E. radiata*, *E. bridgesiana*, *E. st-johnii*, *E. dabrymphenae*, *E. polyanthemus* e *E. leucoxylon*. O autor sugeriu a possibilidade de existência de mais de um isolado fúngico específico para o gênero do hospedeiro. Oliveira et al. (1992) estudaram a infectividade e eficiência de dezenove isolados ectomicorrízicos de *E. dunnii* e *E. viminalis* em casa-de-vegetação e verificaram que os isolados de *P. tinctorius* Pt-23, Pt-26 e Pt-44 foram específicos para *E. dunnii*, enquanto que nenhum isolado foi específico para *E. viminalis*.

Isolados de *P. tinctorius* de plantações de *Eucalyptus* foram comparados com isolados de *P. tinctorius* de plantações de *Pinus taeda* com relação à capacidade de formação de micorrizas em mudas de *E. saligna* e *P. taeda*, através da infestação do solo com inóculo vegetativo dos dois isolados. Houve formação de ectomicorrizas somente em *P. taeda* na presença de solo infestado com *P. tinctorius* isolado de *Pinus*, sugerindo especificidade deste isolado para com o hospedeiro de origem (Yokomizo, 1981). Krüger &

Tomazello Filho (1979) observaram a ocorrência natural de *P. tinctorius* unicamente em plantios de *Eucalyptus*, mesmo nas proximidades de plantios de *Pinus*, sugerindo a possibilidade de existência de espécies do fungo específicos para *Eucalyptus* e para *Pinus*.

Malajczuk et al. (1990) inocularam *in vitro* dois isolados de *P. tinctorius* em *E. urophylla* e verificaram que a taxa e tempo para colonização variavam de acordo com os isolados. Um isolado coletado em plantações de *Eucalyptus* colonizou rapidamente as raízes de *E. urophylla* e iniciou a micorrização 2 dias após a inoculação, enquanto que o isolado coletado em *Pinus* desenvolveu micorriza somente 7 dias após a inoculação. Estas observações *in vitro* comprovam as observações de campo, onde ocorre um grau variável de compatibilidade entre espécies de plantas e isolados fúngicos sugerindo especificidade/compatibilidade na associação. Estes autores sugerem ainda, que devem ser conduzidos estudos para elucidar as diferenças fisiológicas e bioquímicas entre os dois isolados de *P. tinctorius* na interface fungo - raiz de eucalipto.

2.4. Componentes estruturais da parede celular do hospedeiro

A parede celular da planta hospedeira é formada por três componentes estruturais: lamela média, parede primária e parede secundária. A lamela média é constituída principalmente por substâncias pécticas e compreende a região localizada entre as paredes de células adjacentes, atuando como um adesivo intercelular. A parede primária é formada principalmente por polissacarídeos como celulose, hemicelulose e por substâncias pécticas. De forma semelhante, a parede secundária é constituída basicamente por celulose, e em menor quantidade por hemicelulose e substâncias pécticas, sendo que em células mais velhas, pode-se ainda encontrar lignina e suberina (Pascholati, 1995). Portanto, os constituintes da parede celular mais prováveis de serem encontrados pelos fungos

ectomicorrízicos durante o processo de penetração no hospedeiro são celulose, hemicelulose, pectina e lignina.

A celulose é o principal constituinte da parede celular da maioria das plantas terrestres. É um polímero de cadeias lineares longas (1-3 μm), formada por monômeros de glicose em ligações β -1,4 (**Figura 2**) (Goksoyr & Eriksen, 1980; Pascholati, 1995). Pode apresentar áreas altamente ordenadas, regiões cristalinas e áreas com um emaranhado de fibras menos ordenadas, denominadas de região amorfa

Figura 2 - Estrutura conformacional da celulose (Goksoyr & Eriksen, 1980)

A degradação dessa substância cristalina e insolúvel, na forma nativa, requer a ação de diferentes celulasas que podem ser produzidas pelos microrganismos que são capazes de utilizar a celulose como fonte de carbono e energia.

A hemicelulose é composta principalmente por xilose, arabinose, glicose, manose e galactose, sendo que as xiloglucanas e as xilanas são os constituintes predominantes nas paredes primárias e secundárias, respectivamente. As xiloglucanas são formadas por moléculas de glicose com ligações glicosídicas β -1,4 e ramificações de xilose em ligações α -1,6, enquanto as xilanas são cadeias de xilose em ligações β -1,4. A degradação das hemiceluloses requer a atuação de várias enzimas comumente denominadas de hemicelulasas. O nome específico das enzimas depende do substrato hidrolizado, por exemplo: β -1,4 xiloglucana é hidrolizada por uma endoglucanase; β -1,4 xilana por endoxilanases; xilobiose por β -xilosidase (Pascholati, 1995).

As substâncias pécicas (ácido pectínico ou pectina) são polissacarídeos formados por longas cadeias de ácido D-galacturônico com ligações α -1,4 entremeadas com resíduos de ramnose, podendo haver cadeias laterais curtas de D-galactose e outros açúcares. Dependendo do grau de metilação dos grupos carboxílicos dos resíduos de ácido galacturônico, esses polímeros são conhecidos como ácido pectínico ou pectina. Há várias enzimas conhecidas como pectinases ou enzimas pectinolíticas, que degradam as substâncias pécicas: metilpoligalacturonases, poligalacturonases, pectina liases, trans-eliminases do ácido poligalacturônico e metilesterases da pectina (Pascholati, 1995).

A lignina, encontrada principalmente em plantas lenhosas, é um constituinte da parede celular derivado do ácido cinâmico. A deposição da lignina ocorre após a maturação da parede celular, em substituição às moléculas de água, conferindo-lhe rigidez através da ligação covalente com outros constituintes poliméricos. Sua degradação enzimática, embora não completamente esclarecida, é catalizada por ligninases (Pascholati, 1995).

2.5. Atividade enzimática

2.5.1. Celulases: mecanismos de ação, indução e repressão

Os primeiros estudos sobre o mecanismo de ação das celulases foram realizados por Reese et al. (1950) que propuseram o conceito C_1 - C_x para hidrólise da celulose. Neste sistema a fração C_1 seria responsável pela degradação da celulose na forma cristalina, resultando em cadeias lineares mais curtas, enquanto a fração C_x seria responsável pela degradação das formas amorfas. Posteriormente, este conceito foi substituído por um complexo constituído de três enzimas: endo β -1,4 glucanases (EC 3.2.1.4), exo β -1,4 glucanases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), cujos aspectos serão comentados adiante.

Na natureza, muitos microrganismos são capazes de degradar a celulose. Estes incluem fungos, bactérias e actinomicetos, aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos. Deste grupo de microrganismos, os fungos têm despertado um maior interesse nos pesquisadores de atividade celulolítica (Wood, 1985).

Os fungos celulolíticos encontram-se entre as divisões Ascomycotas e Basidiomycotas. Dependendo do modo de ação destes fungos, eles podem ser classificados como causadores de podridão branca (degradam também a lignina), podridão marrom e decompositores leves. Os fungos *Agaricus bisporus*, *Aspergillus niger*, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Sporotrichum pulverulentum* e várias espécies de *Trichoderma* são considerados celulolíticos típicos (Wood & McCrae, 1978; Berghem & Pettersson, 1974; Mandels & Reese, 1960).

Apesar de muitos microrganismos crescerem em celulose ou produzirem enzimas que degradam a celulose amorfa, poucos produzem o sistema celulolítico completo *in vitro* (Mandels, 1975). Estudos dessa natureza mostraram que a produção de celulase extracelular por microrganismos pode ocorrer em resposta à presença de determinadas substâncias consideradas indutoras. Entre os indutores conhecidos estão a própria celulose, derivados de celulose, celobiose, sofrorose e lactose (Mandels & Reese, 1960; Mandels et al., 1962).

Vários trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de se obter o melhor substrato indutor para o complexo celulase. Em *Sporotrichum pulverulentum*, por exemplo, foi observado que de acordo com o substrato utilizado, a enzima β -glicosidase podia ou não ser liberada para o meio externo. Quando celulose foi utilizada como substrato indutor, foi possível detectar atividade extracelular após 7 horas de cultivo, enquanto que com celobiose como indutor, a atividade foi detectada apenas 24 horas após a repicagem do fungo para o meio de cultivo (Deshpande et al, 1978).

Ao contrário da indução, a síntese de celulasas por fungos pode ser reprimida pela presença de glicose ou outros açúcares exógenos (Herr, 1979; Jabbar & Afzal, 1981; Woodward & Arnold, 1981). Giltrap & Lewis (1982) propuseram que os carboidratos derivados do hospedeiro, na associação micorrízica, podem reprimir a produção de celulasas na interface fungo-raiz, e que a redução ou eliminação da disponibilidade de carboidratos deve favorecer a atividade dessas enzimas.

Além da glicose, outros componentes também podem reprimir a produção de celulasas. Cao & Crawford (1993a) mostraram que altas concentrações de nitrogênio extracelular reduziram a atividade de enzimas celulolíticas produzidas *in vitro* por *Pisolithus tinctorius*.

2.5.2. Exo e endo β -1,4 glucanases

As exo β -1,4 glucanases ou β -1,4 glucan-celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) são também conhecidas como avicelases, celulasas C_1 ou exocelulasas. Essas enzimas atuam sobre a celulose cristalina solubilizando-a (celulose suscetível) através da remoção de unidades de celobiose da cadeia, mecanismo este conhecido como exo-eliminação (**Figura 3**).

As endo β -1,4 glucanases ou β -1,4 glucan-glucohidrolases (EC 3.2.1.4) são também conhecidas como carboximetilcelulasas (CMCase), C_x ou endocelulasas. Essas enzimas atuam internamente sobre o polímero celulose, hidrolisando-o ao acaso e formando oligossacarídeos (Figura 3). Tal processo torna a celulose mais predisposta à ação das exoglucanases, devido à criação de novos sítios reativos para esta enzima.

Um fato interessante é a ocorrência de um mecanismo sinérgico entre as endoglucanases e as exoglucanases, onde a atividade de um componente enzimático é favorecida pela ação hidrolítica do outro (Ryu & Mandels, 1980; Enari, 1983; Isaac, 1992). Este sinergismo entre endo e exoglucanase já foi demonstrado para as enzimas de *Sporotrichum pulverulentum*

(Streamer et al., 1975), *Talaromyces emersonii* (McHale & Coughlan, 1980) e *Sclerotium rolfsii* (Sadana & Patil, 1985).

Figura 3 - Etapas da hidrólise da celulose (Ryu & Mandels, 1980).

As atividades de exo β -1,4 glucanases e endo β -1,4 glucanases têm sido relatadas para vários microrganismos, principalmente em *Trichoderma reesei*, onde é intensivamente estudada. A celulase produzida por este fungo é um complexo multienzimático compreendendo seis hidrolases: três endo β -1,4 glucanases (EGI, EGIII e EG), duas exo β -1,4 glucanases (CBHI e CBHII) e uma β -glicosidase, sendo as atividades de exo e endoglucanases sinérgicas

(Everleigh³, citado por Cairney & Burke, 1994). EGI e EGIII foram caracterizadas como glicoproteínas de peso molecular 55 kDa e 49,8 kDa, respectivamente. Wood & McCrae (1978) purificaram quatro endoglucanases de *T. koningii* e verificaram que todas eram capazes de hidrolizar carboximetilcelulose, H₃PO₄-celulose e celopentaose.

O fungo *Phanerochaete chrysosporium*, que causa podridão branca, é também um dos mais estudados com relação às enzimas envolvidas na degradação da celulose, produção e regulação das celulasas. O sistema celulolítico deste fungo compreende cinco endo β -1,4 glucanases, duas exo β -1,4 glucanases e duas β -glicosidases (Eriksson & Pettersson, 1975a, b). Estas enzimas foram separadas, purificadas e caracterizadas, tendo massa molecular variando entre 28 kDa e 37 kDa. Estas massas foram determinadas por ultracentrifugação e calculados com base na composição de aminoácidos e conteúdo de carboidratos. As endoglucanases foram induzidas por diferentes substratos, enquanto que as exoglucanases liberaram celobiose e glicose na presença de celobiodextrina como substrato, além de apresentarem um forte sinergismo com as endoglucanases na presença de Avicel ou de fibras de algodão.

Outros fungos causadores de podridão em madeira degradam a celulose apenas pela ação de endo β -1,4 glucanases e, aparentemente, não têm atividade de exo β -1,4 glucanases constituindo assim, um sistema celulolítico incompleto. Com relação a esses fungos, a atividade de endo β -1,4 glucanases foi descrita em *Polyporus* (Keilich et al., 1969), *Poria* sp (Wolter et al., 1980) e em *Picnoporus sanguineus* (Ulhoa et al., 1986) entre outros.

³EVERLEIGH, D.E. Cellulase: a perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, 321: 435-47, 1987.

2.5.2.1. Exo e endo β -1,4 glucanases de fungos fitopatogênicos

Em fungos fitopatogênicos, a produção de celulasas (exo e endo β -1,4 glucanases) tem sido estudada, mas as evidências sobre a sua participação na patogênese ainda não estão muito claras. A síntese desta enzima foi verificada em *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* quando cultivado em meio de cultura contendo carboximetilcelulose e avicel como fontes de carbono. A atividade celulolítica foi também detectada em raízes de trigo inoculadas com o patógeno e que apresentavam sintomas da doença. Uma endoglucanase foi então purificada e caracterizada, por eletroforese em gel de poliácridamida tendo a massa molecular relativa calculada em 90 kDa (Dori et al., 1995).

A produção de enzimas celulolíticas foi também estudada com o patógeno biotrófico *Uromyces viciae-fabae* durante a diferenciação de estruturas de infecção (Heiler et al, 1993). Os autores observaram que ocorre a produção de celulasas e que a sua manifestação é controlada por mecanismos ativos durante a diferenciação do esporo. Também verificaram que mecanismos como indução por substrato e repressão catabólica não estavam envolvidos na regulação da atividade enzimática e que uma baixa atividade estava presente em esporos dormentes e nos tubos germinativos. Mendgen & Deising (1993) verificaram que o processo de infecção é caracterizado por uma produção baixa e regulada de enzimas hidrolíticas pelo fungo *Uromyces viciae-fabae*, sendo as celulasas ácidas as primeiras a serem produzidas, seguidas pela produção de pectina esterase, celulasas neutras e poligalacturonase liase.

O estudo de celulasas produzidas por *Venturia inaequalis* foi realizado por Kollar (1994), que cultivou o fungo em vários substratos celulolíticos (xilana, pó de celulose, papel de filtro, celobiose e carboximetilcelulose). A produção dessas enzimas aumentou quando se adicionou aos substratos celulolíticos, extratos obtidos de maçã. A atividade enzimática foi correlacionada com o desenvolvimento do micélio e não foi

afetada pela adição das outras fontes de carbono. Também observou-se atividade celulolítica em lesões foliares em macieiras naturalmente infectadas.

A atividade celulolítica foi estudada em raízes sadias e danificadas de plantas de coqueiro que apresentavam ou não sintomas de murcha de etiologia desconhecida. Uma alta atividade foi observada nas raízes das plantas doentes quando comparadas com as sadias, sendo que nenhuma atividade foi encontrada em raízes de coqueiros sadios e nem em raízes sadias de coqueiros doentes. Os autores sugeriram que os resultados encontrados indicavam que a celulase poderia ser um dos fatores responsáveis pela degeneração de raízes em coqueiros doentes (Padmaja & Amma, 1979).

A produção de endoglucanases também foi verificada nos patógenos *Hendersonula toruloidea*, *Cytosporina* sp e *Cytospora* sp, causadores de gomose em damasco, quando cultivados em presença de carboximetilcelulose e em caules inoculados que apresentavam sintomas da doença. O fungo *Cytospora* sp produziu menor quantidade de celulase *in vitro* em relação aos patógenos mais agressivos (*H. toruloidea* e *Cytosporina* sp), sugerindo que esta enzima poderia ser um dos fatores que afetavam a agressividade desses patógenos (Rotem et al., 1995).

Cam et al. (1994) classificaram quatro isolados do fungo necrotrófico *Mycocentropora acerina* quanto à agressividade e produção de enzimas degradadoras da parede celular. A indução de poligalacturonases e endo β -1,4 glucanases ocorreu na presença de ácido poligalacturônico e carboximetilcelulose, respectivamente, e na presença da parede celular de cenoura, usadas como fontes de carbono. Os isolados mais agressivos produziram maior quantidade de enzimas e solubilizaram a parede celular de cenoura mais rapidamente que os hipoagressivos, sugerindo uma forte contribuição dessas enzimas para a agressividade deste fungo.

A atividade *in vitro* de endoglucanases foi observada também em *Fusarium tricinctum* (Wick & Schroeder, 1982), *Botrytis cinerea* (Verhoeff et al., 1983), *F. culmorum* (Manka, 1988) e *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Di Piero &

Pascholati, 1995). Nos três primeiros trabalhos também foi observada a atividade de exoglucanases.

2.5.2.2. Exo e endo β -1,4 glucanases de fungos micorrízicos

A produção de exoenzimas por fungos micorrízicos na presença de moléculas orgânicas complexas como celulose, pectina, hemicelulose e lignina, tem sido relativamente pouco estudada. O crescimento de fungos ectomicorrízicos em celulose e celobiose já foi relatado, sendo que para o primeiro, o crescimento ocorre quando se fornece inicialmente pequena quantidade de glicose - *start* de glicose. Este fato foi observado por Norkrans (1950) quando examinou a capacidade de quatro espécies micorrízicas e de três espécies saprófitas do fungo *Tricholoma* em utilizar carboidratos complexos como fonte de carbono. Seus resultados mostram que as espécies micorrízicas *T. flavobrunneum*, *T. inbricatum*, *T. pessundatum* e *T. vaccinum* cresciam somente na presença de açúcares simples (glicose). Entretanto, com a adição de uma pequena quantidade de glicose ao meio contendo celulose, *T. vaccinum* foi capaz de produzir enzimas celulolíticas, degradando a celulose.

Esse efeito de glicose foi verificado de forma semelhante por Taber & Taber (1987) quando estudaram a capacidade de isolados de *Pisolithus tinctorius* crescerem em diferentes fontes de carbono. Os autores observaram que estes isolados somente utilizavam frutose e sacarose na presença de uma pequena quantidade de glicose e que não havia crescimento na presença de celulose, amido, lactose, pectina, xilose e galactose. Não foi realizado nenhum estudo com relação à produção de enzimas hidrolíticas.

A atividade celulolítica dos fungos ectomicorrízicos *Laccaria laccata*, *P. tinctorius* e *Hebeloma crustuliniforme* foi estudada por Dahm & Strzelczyk (1995), em meios de cultura supridos com tiamina e biotina. Esses pesquisadores observaram a atividade de exoglucanases em todos os isolados, enquanto a atividade de endoglucanases foi encontrada apenas em

H. crustuliniforme. As vitaminas utilizadas não induziram e nem reprimiram a atividade celulolítica dos fungos estudados.

No fungo *Boletus subtomentosus*, a atividade celulolítica restringe-se apenas às linhagens não micorrízicas (Lundeberg⁴, citado por Cairney & Burke, 1994). Estudos mais recentes têm demonstrado atividade *in vitro* de endoglucanases em outros fungos ectomicorrízicos como *Suillus bovinus*, *Paxillus involutus* e *Amanita regalis* (Maijala et al., 1991). Em quatro isolados de *Pisolithus tinctorius* foi verificada uma baixa atividade de endo e exoglucanases, mas não foi determinada a função destas enzimas na formação da micorriza e nem a extensão com que estes isolados formavam a associação (Cao & Crawford, 1993a). Atividades semelhantes já foram relatadas em *Cenococcum geophilum* e *Hebeloma pusillum* (Linkins & Antibus, 1981) e em *Amanita muscaria* (Natarajan & Kannan, 1982).

O envolvimento de enzimas celulolíticas no estabelecimento de associações micorrízicas tem sido estudado principalmente nas micorrizas arbusculares. Como exemplo, a produção de endo e exoglucanases foi verificada durante a penetração do fungo *Glomus mosseae* no hospedeiro e no desenvolvimento da micorriza em raízes de alface e cebola. A atividade das enzimas aumentou nas plantas micorrizadas no início da infecção e desenvolvimento do arbúsculo. A atividade de endoglucanase foi encontrada também no micélio externo, cujas isoenzimas apresentaram a mesma mobilidade eletroforética de isoenzimas encontradas em extratos de raízes micorrizadas. Bandas presentes em extratos de raízes micorrizadas estavam ausentes em extratos de raízes não micorrizadas. A sequência de atividades de endo e exoglucanases na associação sugere que a celulase fúngica possa estar envolvida na colonização das raízes (Garcia-Garrido et al., 1992b).

⁴LUNDEBERG, G. Utilization of various nitrogen sources, in particular bound soil nitrogen, by mycorrhizal fungi. **Studia Forestalia Suedica**, **79**: 1-95, 1970.

Na associação ectomicorrízica, a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares relacionadas com a formação da simbiose, vem sendo estudada indiretamente. Nylund & Unestam (1982) mostraram que o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* e *Piloderma croceum*, que normalmente penetram somente nos espaços intercelulares de células vivas do córtex de raízes jovens, podem também penetrar intracelularmente em células senescentes e células corticais mortas. Considerou-se que a penetração nestas células envolvia atividade enzimática, embora nenhuma enzima hidrolítica da parede celular tenha sido detectada nestes fungos.

A invasão de algumas células corticais do hospedeiro pelo fungo *Pisonia* sp durante a formação ectomicorrízica com *Picea sitchensis* (Cairney et al., 1994) e a atividade necrotrófica de alguns fungos ectomicorrízicos na região da coifa, durante os estágios iniciais de formação de ectomicorriza (Horan et al., 1988), fornecem evidências do envolvimento de enzimas hidrolíticas (celulases, hemicelulases e pectinases) na interface fungo-raiz.

2.5.3. β -glicosidase

A β -glicosidase (EC 3.2.1.21) é comum em plantas, fungos, bactérias e tecidos animais sendo a última enzima a atuar no processo de degradação da celulose. Também conhecida como celobiase, esta enzima atua sobre a hidrólise da celobiose, originada da ação das endo e exoglucanases sobre a celulose, resultando em monômeros de glicose. As β -glicosidases fúngicas apresentam massas moleculares, determinadas por métodos como filtração em gel e eletroforese em gel de poliacrilamida variando numa faixa de 32 kDa a 440 kDa (Cao & Crawford, 1993b; Bodenmann et al., 1985).

A produção de β -glicosidases pelos fungos termófilos *Chrysosporium sulfureum*, *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus terreus* e *A. fumigatus* foi estudada por Venkateshwarlu & Reddy (1990). Os autores verificaram que houve diferenças na produção da enzima entre os isolados e

que *A. fumigatus* foi o que apresentou menor quantidade de β -glicosidase. Goodman (1988) observou que a síntese de β -glicosidase em *Trichoderma reesei* QM9414 foi superior em relação a *Aspergillus niger*. Níveis elevados de β -glicosidase também foram encontrados em *Humicola* sp (Chaves, 1982; Araújo et al., 1983).

Em *Picnoporus sanguineus*, a enzima β -glicosidase foi produzida quando o fungo foi cultivado em meio de cultura contendo celulose. A cromatografia por filtração em gel do meio de cultura, indicou a presença de duas β -glicosidasas com massas moleculares de 117,5 kDa (I) e 31kDa (II). As diferenças observadas nessas duas isoenzimas indicavam que a β -glicosidase I estava envolvida na hidrólise de celobiose e que a β -glicosidase II era uma arilglicosidase (Ulhoa et al., 1986).

A purificação de β -glicosidase de *Trichoderma viride* feita por Berghem & Pettersson (1974) mostrou uma única banda em gel de poliacrilamida, indicando ser uma proteína homogênea (uma subunidade) com massa molecular relativo de 64 kDa.

Atividade de β -glicosidase tem sido relatada também nos fungos fitopatogênicos *Botrytis cinerea* (Verhoeff et al., 1983), *Venturia inaequalis* (Wagner et al., 1988; Kollar, 1994), *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Dori et al., 1995) e *Pythium acanthicum* e *P. oligandrum* (Gauch et al., 1995).

Na associação ectomicorrízica, as análises de Cao & Crawford (1993a, b) mostraram evidências diretas da presença de β -glicosidasas em *Pisolithus tinctorius*, bem como a existência de três isoformas nos isolados SMF, S359 e S471. O isolado S370 produziu duas isoformas que não estavam presentes nos demais isolados. Essas isoformas podiam ser observadas em culturas em fase de crescimento ativo (9 dias de idade) e em culturas em fase estacionária (30 dias), indicando grande capacidade enzimática nesta espécie. A massa molecular aparente das isoenzimas produzidas por *P. tinctorius* SMF, determinada por cromatografia de exclusão molecular, foi aproximadamente

450 kDa. Entretanto, uma única banda com massa molecular de 150 kDa, foi obtida após eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Os autores concluíram que a β -glicosidase de *P. tinctorius* SMF consistia de três monômeros de 150 kDa.

A produção de β -glicosidases por *P. tinctorius* foi relatada também por Treat & Taber (1988) quando cultivaram o fungo na presença de celobiose como única fonte de carbono. A atividade de celobiase foi observada apenas no micélio fúngico, enquanto as demais enzimas celulolíticas não foram detectadas.

Linkins & Antibus (1981) avaliaram a capacidade dos fungos ectomicorrízicos *Cenococcum geophilum* e *Hebeloma pusillum*, associados a *Salix rotundifolia*, em produzir enzimas hidrolíticas e observaram a atividade constitutiva de β -glicosidase, presente tanto no manto fúngico quanto nas rizomorfias.

2.5.4 Xilanase

Endo β -1,4 xilanase ou β -D-1,4 xilana xilanohidrolase (EC 3.2.1.8) é uma enzima que hidroliza ao acaso as ligações β -D-xilopiranosil de xilana, para formar xilooligossacarídeos. A D-xilana é o principal polissacarídeo encontrado na fração hemicelulolítica de parede celular de plantas superiores (Lachke, 1988; Pascholati, 1995).

Baker et al. (1977) estudaram a produção extracelular de xilanase por *Trichoderma pseudokoningii*, cultivado em meio mínimo suplementado com xilana 0,1%, como única fonte de carbono. A enzima foi purificada e caracterizada por eletroforese em gel descontínuo de poliacrilamida-SDS e apresentou uma única banda com massa molecular estimada de 15 kDa.

A produção de xilanase pelos fungos termófilos *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *Chrysosporium sulfureum* e *Penicillium purpurogenum* foi observada quando estes foram cultivados em diferentes meios de cultura

(carboximetilcelulose (CMC), CMC + glicose e celulose). A maior produção enzimática foi verificada pelos fungos *A. fumigatus*, *A. terreus* e *C. sulfureum* após 5 dias de crescimento em meio líquido suplementado com celulose. Nenhuma correlação foi encontrada entre o crescimento dos fungos nos diferentes meios de cultura testados e a produção da enzima (Venkateshwarlu & Reddy, 1990). A produção de xilanase por *A. fumigatus* foi também observada por Stewart et al. (1983) quando cultivaram o fungo na presença de diferentes gramíneas forrageiras e de palha de cevada. Além do efeito do substrato na indução da enzima, o efeito da temperatura de incubação e variação de pH na produção de xilanase foi estudado em *Thielavia terrestris*, um fungo termófilo, cultivado em "solka floc". A máxima atividade foi observada em temperatura de 48°C e pH inicial de 4,0 (Merchant et al., 1988).

Em *Humicola* sp, a produção de xilanase e xilosidase foi determinada quando este fungo foi cultivado em diferentes meios de cultura. A maior atividade foi observada em meios com xilana como fonte de carbono. A produção das enzimas foi reprimida com a adição de glicose (0,1%) aos meios, sendo a síntese de xilanase mais afetada em relação à de xilosidase (Monti & Jorge, 1986).

Fungos fitopatogênicos de cereais têm mostrado atividade de xilanase quando crescem utilizando parede celular do cereal. A produção *in vitro* de xilanases por *Cochliobolus carbonum* foi observada quando o fungo foi cultivado em meio de cultura contendo xilana ou a parede celular do milho, como fontes de carbono (Holden & Walton, 1992).

Exserohilum turcicum, quando cultivado em meio mínimo contendo xilana, palha de trigo ou parede celular obtida de milho, mostrou atividade de xilanase, sendo que o maior valor foi encontrado quando o fungo cresceu em meio contendo paredes celulares de milho como única fonte de carbono. Com a adição de glicose aos meios de cultivo, a atividade enzimática foi suprimida. A enzima foi purificada e exibiu uma única banda em gel de

poliacrilamida-SDS com massa molecular aparente de 22,5 kDa (Degefu et al., 1995).

Em *Magnaporthe grisea* foram observadas duas xilanases quando o fungo foi cultivado em presença de parede celular de arroz, como única fonte de carbono. Uma das xilanases, a XYN33, apresentou peso molecular de 33 kDa em gel de poliacrilamida-SDS e representou 70% da atividade enzimática presente no filtrado da cultura. A segunda xilanase, XYN22, com massa molecular de 22 kDa, representou 30% da atividade enzimática (Wu et al., 1995). A xilanase de *Gaeumannomyces graminis* foi também purificada e caracterizada indicando a existência de várias isoenzimas (Southerton et al., 1993).

Evidências da produção *in vitro* de xilanases por fungos ectomicorrízicos foram dadas por Cairney & Burke (1994) quando identificaram peroxidase e Mn-peroxidase, juntamente com xilanase, em filtrados concentrados de culturas de *Paxillus involutus*, *Suillus variegatus*, *Tylospora fibrillosa* e do simbionte ericóide *Hymenoscyphus ericae*.

2.5.5. Esterase

Esterases (EC 3.1.1.1) são enzimas que clivam as ligações ésteres dos polímeros cutina e pectina, entre outros. A esterase cutinase tem sido estudada visando esclarecer a sua participação na patogenicidade. Estes estudos vêm sendo conduzidos principalmente em três patossistemas: *Fusarium solani* - ervilha, *Colletotrichum gloeosporioides* - mamão e *Alternaria alternata* - pera (Pascholati, 1995).

Estudos realizados por Dickman & Patil (1988) utilizando mutantes de *C. gloeosporioides* que necessitavam de ferimentos para a penetração em mamão, mostraram que com a ajuda de cutinase exógena colocada na superfície do fruto, esses isolados conseguiam penetrar sem a necessidade de ferimentos.

A importância da cutinase na penetração foi também estudada por Pascholati et al. (1993) e Deising et al. (1992). Estes autores observaram que um *pad* de adesão era formado por *Uromyces viciae-fabae* quando o esporo aderiu à cutícula das folhas de feijão, enquanto que esporos autoclavados não o formavam. Entretanto, quando esses esporos autoclavados eram tratados com uma cutinase e duas esterases não específicas, que haviam sido isoladas dos esporos vivos, eles apresentaram capacidade de aderir à cutícula do hospedeiro. Essas enzimas eram rapidamente lançadas pelo fungo quando em contato com um ambiente aquoso. Os autores verificaram também que quando adicionavam serina-esterase não ocorria a formação do *pad*, sugerindo uma participação funcional da esterase ou cutinase no processo de adesão. Concluíram, então, que a formação do *pad* parece ser uma resposta passiva em ambiente aquoso e que a adesão à cutícula depende de cutinases e esterases associadas à superfície do esporo.

O padrão isoenzimático de esterases tem sido utilizado na caracterização e diferenciação de isolados fúngicos. Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de jiló e pimentão foram distinguidos pelo padrão de esterase em gel de poliacrilamida-SDS (Pereira, 1995). Esses isolados foram também estudados por Fernandes et al. (1995), que verificaram variações quanto aos padrões isoenzimáticos em gel de amido. Em *Microcyclus ulei*, Junqueira et al. (1987) observaram que os padrões enzimáticos de esterase, peroxidase e lactato desidrogenase relacionavam-se com a virulência dos isolados.

Em fungos endomicorrízicos, a identificação é quase que exclusivamente baseada na distinção morfológica dos esporos formados no solo ou nas raízes. Atualmente, a análise de padrões isoenzimáticos vem sendo utilizada na caracterização dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Esterase, glutamato oxaloacetato transaminase e peptidases são enzimas detectadas eletroforicamente que vêm sendo utilizadas para identificação de FMA. Bandas diagnósticas detectáveis em extratos de raízes com mais de 20 semanas de idade, têm sido recomendadas para a identificação de três

espécies de *Glomus* (Hepper et al., 1986), além de serem utilizadas para monitoramento da infecção durante experimentos de competitividade entre espécies de fungos inoculados em uma mesma planta hospedeira (Hepper et al., 1988; Rosendahl et al., 1989).

Os fungos endomicorrízicos *Glomus etunicatum*, *G. leptotichum*, *G. macrocarpum*, *G. intraradices*, *Gigaspora margarita*, *Scutelospora heterogama*, *Acaulospora morroew*, *A. apendiculata* e *Entrophospora* sp foram analisados através dos padrões enzimáticos de esterase, peroxidase, catalase, glutamato oxaloacetato transaminase, álcool desidrogenase e malato desidrogenase. De todos os sistemas enzimáticos e fungos testados, foi possível detectar atividade enzimática somente no sistema esterase, para *G. margarita* (MR 0,62 e 0,57) e para *S. heterogama* (MR 0,23 e 0,16) (Maluf et al., 1989).

Na associação ectomicorrízica, o padrão enzimático de esterases tem sido também utilizado para diferenciação de isolados. Isolados de *Suillus plorans*, *S. placidus* e *S. sibiricus*, obtidos de basidiocarpos coletados em *Pinus cembra*, foram comparados, através de eletroforese em gel de amido, por análise de expressão isoenzimática de esterase, fosfatases ácida e alcalina, alanina aminopeptidase, leucina aminopeptidase, hexoquinase, aspartato aminotransferase, malato desidrogenase, fosfoglucoase isomerase e fosfoglucomutase (Keller, 1992). O autor concluiu que o padrão isoenzimático é um método adequado para caracterizar espécies de *Suillus* associados a *P. cembra*. Através de cálculo de similaridade, observou-se variabilidade intraespecífica entre isolados de *S. plorans* e *S. placidus*. A produção de esterase, além de outras enzimas hidrolíticas como protease, α -D-galactopiranosidase, α -D-manopiranosidase, β -D-xilopiranosidase e fosfatase alcalina, também foi observada em extratos de células de *Cenococcum graniforme* (Bae & Barton, 1989).

A multiplicidade de esterases em isolados de *Pisolithus tinctorius* foi analisada em gel nativo de poliacrilamida por Cao & Crawford (1993 b). Os autores observaram que os isolados SMF, S359, S471 e S370 mostraram duas isoformas de esterase de maior intensidade (bandas II e III). Além dessas duas bandas, o isolado S370 apresentou três outras bandas que não foram observadas em SMF e S359. Em adição a essas duas isoformas, S471 também apresentou uma isoenzima adicional (banda I). Dessa forma, a multiplicidade dos isolados pode ser demonstrada por padrões isoenzimáticos de uma determinada enzima (Kephart, 1990).

2.6. API-ZYM

O API-ZYM (Bio Mérieux S.A. - França) é um sistema rápido e reproduzível que permite o estudo semi-quantitativo de algumas enzimas extracelulares produzidas por diferentes microrganismos. Através de um *kit* apropriado é possível se detectar a atividade enzimática sobre 19 substratos em apenas 4 horas, sem a necessidade de se utilizar meios de cultura complexos para determinação da atividade metabólica.

Este sistema vem sendo empregado com diversos microrganismos. Humble et al. (1977) empregaram-no para identificação bacteriana. Leger et al. (1986) caracterizaram nove isolados dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Verticillium lecanii* através do sistema API-ZYM. Durrands & Cooper (1988) utilizaram-se deste sistema para seleção e caracterização de mutantes do fitopatógeno *Verticillium albo-atrum*. Schwan (1994) selecionou mutantes de *Kluyveromyces marxianus*, importante levedura no processo de fermentação do cacau, usando este *kit*. Schwan-Estrada et al. (1995) observaram diferenças quanto ao número de enzimas produzidas por fungos saprófitas (*Trichoderma* sp e *Picnoporus sanguineus*) e fitopatogênicos (*Exserohilum turcicum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* e isolados esporulante e não esporulante de *Helminthosporium*

oryzae). Chiu & Tzean (1995) caracterizaram enzimaticamente por este sistema, isolados do fungo hiperparasita *Schizophyllum commune*.

O sistema API-ZYM pode, dessa forma, ser utilizado como um complemento visando a seleção, identificação e caracterização, mesmo a nível de isolados, de diversos microrganismos.

2.7. Quantificação de fungos em tecidos vegetais através do ergosterol

O ergosterol é o principal componente da membrana plasmática fúngica (Isaac, 1992), não fazendo parte dos tecidos vegetais e permitindo, dessa forma, uma excelente quantificação da biomassa do fungo que está colonizando a planta (Seitz et al., 1977, 1979).

A estimativa da quantidade de micélio fúngico presente nos tecidos vegetais poderia ser realizada também através de métodos envolvendo a análise de quitina, um componente da parede celular fúngica (Isaac, 1992). No entanto, métodos envolvendo a determinação de quitina em tecidos vegetais infectados por fungos são muito laboriosos e com menor especificidade e sensibilidade, quando comparados com métodos envolvendo a determinação de ergosterol através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Johnson & McGill, 1990).

O método de dosagem do ergosterol pode ser utilizado para se determinar a extensão da invasão fúngica em cereais e sementes armazenadas, o que impediria a utilização de outros métodos que envolvem a incubação das sementes para crescimento do fungo contaminante (Seitz et al., 1977, 1979; Gordon & Webster, 1984). Pode ainda ser usado para quantificar a biomassa fúngica no solo (Davis & Lamar, 1992) e o crescimento fúngico em substratos sólidos (Matcham et al., 1984) e líquidos. Por exemplo, o conteúdo de ergosterol presente em micélio de isolados de *Pisolithus tinctorius* e *Rhizopogon* sp, cultivados em meio de cultura MNM líquido, foi determinado por cromatografia líquida de alta pressão, obtendo-se um teor de ergosterol que

variou entre 2,4 a 6,2 µg / mg de matéria seca para os isolados de *P. tinctorius* e 11 µg / mg de matéria seca para *Rhizopogon* sp. (Perez, 1996).

Este método de dosagem vem sendo empregado também em estudos envolvendo a reação de materiais vegetais resistentes à infecção com o patógeno. Griffiths & Jones (1985) realizaram um bioensaio com ergosterol para verificar a resistência de folhas de trigo a *Septoria nodorum*. Gretenkort & Ingram (1993) utilizaram o ergosterol como uma medida quantitativa da resistência de cultura de tecidos de *Brassica napus* sp. *oleifera* a *Leptosphaeria maculans*. Stangarlin (1995) determinou o nível de colonização do patógeno *Exserohilum turcicum* em folhas de milho, resistente e suscetível, através da quantificação de ergosterol.

Há diversos trabalhos onde a dosagem de ergosterol é utilizada como método para se quantificar a colonização de raízes por fungos micorrízicos (Nylund & Wallander, 1992). Salmanowicz & Nylund (1988) determinaram ergosterol como medida da infecção ectomicorrízica de *Laccaria laccata*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Amanita muscaria* e *Suillus bovinus* em *Pinus*. Martin et al. (1990) estimou a biomassa fúngica em ectomicorrizas formadas por *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus globulus* subsp. *bicostata*. Johnson & McGill (1990) comparou os métodos de dosagem de ergosterol e quitina para estimar a infecção micorrízica de *Hebeloma crustuliniforme* em *Pinus contorta* var. *latifolia*. Antibus & Sinsabaugh (1993) realizaram a extração e quantificação de ergosterol dos fungos ectomicorrízicos *Amanita rubescens*, *Boletus griseus*, *Cenococcum geophilum*, *Entoloma sericeum*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Lactarius pubescens*, *Paxillus involutus*, *Rhizopogon* sp., *Scleroderma citrinum* e *Suillus tomentosus*. Galli (1996) quantificou a ectomicorrização em plantas de *Eucalyptus* spp inoculadas *in vitro* com *Pisolithus tinctorius* e crescidas em substrato com diferentes fontes de matéria orgânica. Hilbert et al. (1991) também avaliaram a biomassa fúngica de raízes de *Eucalyptus globulus* subsp. *bicostata* inoculadas com isolados compatíveis e incompatíveis de *Pisolithus tinctorius*, pelo conteúdo de ergosterol presente no

micélio fúngico e nas associações. Os autores observaram que ocorreu um aumento na biomassa fúngica entre 24 e 96 horas após a inoculação com o isolado compatível e nenhum ergosterol foi detectado em raízes das plântulas inoculadas com o isolado incompatível.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem e manutenção dos fungos ectomicorrízicos

Os fungos ectomicorrízicos utilizados foram *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch isolados 1603, 1604, 1605, obtidos da micoteca do Departamento de Fitopatologia - ESALQ; *P. tinctorius* 185, da coleção de Dr. D. Marx, USDA - Forest Service, Georgia e *Rhizopogon* sp Coker & Couch, fornecido pelo Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Os isolados *P. tinctorius* 1603, 1604 e 1605 foram obtidos de *Eucalyptus* sp, *E. grandis* e *E. saligna*, respectivamente enquanto que os isolados *P. tinctorius* 185 e *Rhizopogon* sp foram obtidos de *Pinus taeda* e *Pinus* sp.

Todos os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo o meio sólido Melin-Norkrans modificado (MNM) (Marx, 1969), sendo incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 20-25 dias, para que houvesse formação de colônia, e estocados a 4°C para serem utilizados como fonte de inóculo. Quando necessário, discos de 4 mm de diâmetro contendo micélio e meio de cultivo foram retirados destas placas e repicados para novas placas contendo o meio MNM.

3.2. Caracterização dos isolados de *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp, pela capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono

Os isolados ectomicorrízicos foram comparados, através de medidas de crescimento micelial, quanto à capacidade de utilização de

diferentes fontes de carbono. Para tanto, os isolados foram cultivados em meio MNM sólido, onde o extrato de malte (fonte de C e N) foi substituído por extrato de levedura (0,3%) (fonte de N) e glicose por uma das fontes de carbono testadas. Foram utilizadas como fonte de carbono: carboximetilcelulose (CMC), CMC + glicose 0,1%, celulose nativa 0,5% (chapa de celulose moída - IPEF), celulose nativa 0,5% + glicose 0,1%, celobiose, celobiose + glicose 0,1%, frutose, glicose, maltose, pectina 0,5%, pectina 0,5% + glicose 0,1%, sacarose e xilose. O meio MNM sem fonte de carbono foi utilizado como controle. Todos os açúcares foram colocados na proporção de 1% (massa/volume), exceto quando mencionado outro valor.

Em cada placa de Petri, com os respectivos meios de cultivo, foi colocado um disco de micélio (4 mm de diâmetro) de *P. tinctorius* 1603, 1604, 1605 ou 185 e *Rhizopogon* sp, retirado das bordas das colônias, com 25 dias de crescimento em MNM. As placas foram incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro, por 30 dias. Foram utilizadas 3 repetições para cada fonte de carbono testada. O crescimento radial (em cm) das colônias foi avaliado a cada 10 dias.

3.3. Determinação da atividade celulolítica

3.3.1. Atividade de exo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.91)

Para se determinar a atividade de exo β -1,4 glucanase, os isolados de *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp foram repicados para 100 ml de meio MNM líquido onde a glicose foi substituída por celulose microcristalina 1% (Avicel - fabricante Riedel de Haen), como indutor para a produção de exo β -1,4 glucanase. Em cada erlenmeyer, foram colocados 5 discos de micélio, de 4 mm de diâmetro, com 25-30 dias de crescimento em MNM. Os erlenmeyers permaneceram a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro e sob agitação constante (150 rpm) por 30 dias. A cada 6 dias alíquotas de 5 ml do meio de cultivo foram coletadas, os quais foram considerados como fonte enzimática. Esta fonte enzimática foi

conservada a -20°C para ser utilizada posteriormente na dosagem da atividade celulolítica.

A atividade de exo β -1,4 glucanase foi determinada por método espectrofotométrico indireto tendo como base a liberação de moléculas de glicose a partir do substrato celulose microcristalina (Avicel). A mistura de reação consistiu de 50 μ l da fonte enzimática e 450 μ l de celulose microcristalina 1% em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0). A mistura foi incubada por 30 min a 50°C e a reação interrompida com a adição de 1,5 ml de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico 1% (HAPHB) em álcali. Após a incubação, a mistura foi mantida a 100°C por 5 min e em seguida resfriada em gelo (Lever, 1972). A leitura de absorbância foi realizada a 410 nm contra branco (1,5 ml de HAPHB + 0,5 ml de tampão acetato de sódio 0,05 M). De cada amostra subtraiu-se o valor do controle (mistura idêntica a da amostra mas sem incubação prévia). Foram utilizadas 3 repetições por amostra. As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para glicose (**Apêndice 1**) e a atividade enzimática específica foi expressa em μ g de glicose / min / mg proteína.

3.3.2. Atividade de endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4)

Celulose nativa 0,5% ou carboximetilcelulose 1% foram utilizados como indutores para a produção de endo β -1,4 glucanase. Esses substratos, com ou sem *start* de glicose (0,1%), foram adicionados em meio líquido MNM. Os isolados de *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp foram cultivados nas mesmas condições descritas em 3.3.1. Para dosagem da atividade celulolítica foi empregado carboximetilcelulose (CMC), como substrato.

A atividade enzimática foi determinada por método espectrofotométrico indireto, utilizando hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico 1% (HAPHB) para a dosagem de glicose liberada pela ação da enzima (Lever, 1972). A mistura de reação consistiu de 50 μ l da fonte enzimática (obtida

conforme 3.3.1.) e 450 μ l de CMC 1% em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0). Após 30 min de incubação a 50°C, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 ml de HAPHB. Em seguida, foi aquecida a 100°C por 5 min e resfriada em gelo. A absorbância da mistura foi determinada a 410 nm contra branco (1,5 ml HAPHB + 0,5 ml de tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0)) e as leituras plotadas em curva-padrão para glicose (Apêndice 1). Os resultados foram expressos em μ g de glicose / min / mg proteína.

3.3.3. Atividade de β -glicosidase (EC 3.2.1.21)

Para determinação da atividade de β -glicosidase, utilizou-se celobiose 1% como indutor para a produção da enzima e também como fonte de carbono no meio de cultivo MNM líquido, mantendo-se as mesmas condições de incubação para os isolados fúngicos e coleta de amostras, como descritos em 3.3.1. p -Nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo foi empregado como substrato para determinação da atividade enzimática. A mistura de reação, incubada a 50°C por 30 min, consistiu de 300 μ l de p -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo 0,02 M em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0) e 200 μ l da fonte enzimática. Após a incubação, foram adicionados 500 μ l de solução de Na_2CO_3 1 M, para paralisar a reação. O p -nitrofenol (p -NP) liberado, como resultado da ação enzimática, foi determinado espectrofotometricamente a 405 nm (Deshpande & Eriksson, 1988). As leituras de absorbância foram plotadas em curva-padrão para p -nitrofenol (**Apêndice 2**) e os resultados da atividade específica expressos em μ g de p -NP / min / mg proteína.

3.4. Atividade de xilanase (EC 3.2.1.8)

Os isolados dos fungos ectomicorrízicos foram cultivados em meio MNM líquido acrescido de CMC 1%, como fonte de carbono, conforme descrito em 3.3.2. As condições de incubação e coleta de amostras foram as mesmas descritas em 3.3.1.

A atividade de xilanase foi determinada pelo uso do substrato xilana carboximetilada marcada com remazol brilhante azul ("CM-xylan-RBB") em espectrofotômetro a 595 nm, em função da liberação de fragmentos solúveis de "CM-xylan-RBB" (Biely et al., 1988). A mistura de reação continha 200 µl de CM-xylan RBB (4,0 mg/ml), 200 µl de tampão acetato 0,05 M (pH 5,0) e 100 µl da fonte enzimática. Após a incubação a 30°C por 1 h, a reação foi paralisada pela adição de 500 µl de HCl 2N, seguida de centrifugação a 10.000 *g* por 5 min, a 4°C. A absorbância do sobrenadante foi obtida tendo-se tampão acetato 0,05 M na cubeta de referência. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância / h / mg de proteína, descontando-se os valores do controle (300 µl de tampão acetato 0,05 M + 200 µl de "CM-xylan-RBB" + 500 µl HCl 2N)

3.5. Dosagem de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais presentes nos filtrados das culturas fúngicas foi determinada utilizando-se o método de Bradford (1976). Em cada 0,8 ml de amostra foram adicionados sob agitação 0,2 ml de reagente concentrado de Bradford. Após 5 min de incubação a temperatura ambiente, foi realizada a leitura de absorbância a 595 nm. Como referência utilizou-se 0,8 ml de água destilada e 0,2 ml de reagente concentrado de Bradford.

A concentração de proteínas de cada amostra, expressa em termos de equivalentes µg de albumina de soro bovino (ASB) em 0,8 ml de amostra (µg proteína / 0,8 ml) foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20 µg / 0,8 ml (**Apêndice 3**).

3.6. Caracterização parcial das enzimas celulolíticas dos isolados de *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp por cromatografia de filtração em gel

3.6.1. Preparo das amostras

Os isolados de *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp foram cultivados em 100 ml de meio MNM líquido onde glicose foi substituída por CMC 1%, por 24 dias, a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro e sob agitação constante. O conteúdo de cada erlenmeyer foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 41 e concentrado a 4°C com sulfato de amônio (85 % de saturação - 55,9 g em 100 ml de solução). Essa mistura ficou em repouso por 5 h a 4°C e após este período, foi centrifugada a 20.000 *g* por 25 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 2,5 ml de tampão acetato 0,05 M (pH 5,0). Este material ressuspenso foi colocado em sacos de diálise, com limite de exclusão molecular de 20.000, e este colocado no interior de uma cuba com agitação magnética a 4°C , contendo 2 l de tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0). As amostras permaneceram sob diálise por 18 h, renovando-se todo o tampão da cuba quando decorrido a metade desse tempo.

3.6.2. Filtração em gel

A coluna (23 cm comprimento x 1,6 cm diâmetro), preenchida com gel Sephacryl S-100HR, foi equilibrada e eluída com tampão acetato 0,15 M (pH 5,0) em fluxo de 0,8 ml / min. O *void volume* (V_o) da coluna empacotada, representado pelo volume de eluição do pico da *Blue dextran*, foi determinado pela passagem de 1,0 ml de uma solução desse polímero.

A seguir, os seguintes marcadores de peso molecular foram eluídos através da coluna: bacitracina (MM 1,450 kDa), aprotinina (MM 6,5 kDa), citocromo C (MM 14,2 kDa), anidrase carbônica (MM 29 kDa) e albumina de soro bovino (MM 66 kDa). Todos os padrões, bem como todas as amostras dos filtrados obtidas conforme 3.6.1, foram separadamente aplicados (1 ml) e

passados pela coluna e os seus volumes de eluição (V_e) anotados. Cada fração coletada com volume de 1,6 ml, foi analisada individualmente em espectrofotômetro a 280 nm (Scopes, 1982) e as que apresentavam conteúdo proteico, foram avaliadas quanto à atividade de exo β -1,4 glucanase, endo β -1,4 glucanase e β -glicosidase, conforme descrito em 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.3., respectivamente.

3.7. Caracterização enzimática pelo sistema API-ZYM

Para se avaliar a atividade enzimática pelo sistema API-ZYM, os isolados de *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp foram cultivados em meio MNM líquido a $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, sob agitação constante (150 rpm) e escuro. Após 21 dias, as culturas foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 41 e o filtrado obtido foi utilizado para o ensaio enzimático.

O sistema API Zym é um método semi-quantitativo, constituído por uma galeria plástica contendo 19 “poços” ou locais de reação, cada qual com um substrato diferente (**Tabela 1**). Em cada orifício foram colocados 60 μl do filtrado das culturas e o *kit* foi incubado a 30°C e escuro por 4 h, sendo utilizados 2 *kits* por isolado. Após a incubação, 60 μl de cada reagente Zym A e Zym B (**Apêndice 4**) foram adicionados aos “poços” de reação e os kits mantidos sob luz fluorescente por 10 min, efetuando-se em seguida a avaliação do produto colorido produzido. Valores arbitrários de 0 (zero) a 5, conforme carta de cores do fabricante (Bio Mérieux S.A. - França) (**Apêndice 5**), foram concedidos a cada “poço”. A nota 0 (zero) corresponde à ausência de reação e a nota 5 representa reação máxima. A coloração do produto resultante é um indicativo da atividade enzimática enquanto que a intensidade da coloração quantifica o produto formado.

Tabela 1. Enzimas analisadas pelo sistema API ZYM, com os respectivos substratos.

Nº	Enzimas analisadas	Substrato
1	Controle	-
2	Fosfatase alcalina	2-naftil fosfato
3	Esterase (C ₄)	2-naftil butirato
4	Esterase lipase(C ₈)	2-naftil caprilato
5	Lipase (C ₁₄)	2-naftil miristato
6	Leucina arilamidase	L-leucil-2 naftilamida
7	Valina arilamidase	L-valil-2 naftilamida
8	Cistina arilamidase	L-cistil-2 naftilamida
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida
10	Quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida
11	Fosfatase ácida	2-naftil fosfato
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	naftol-AS-BI-fosfato
13	α -galactosidase	6-Br-2-naftil- α D-galactopiranosideo
14	β -galactosidase	2-naftil- β D-galactopiranosideo
15	β -glucuronidase	naftil-AS-BI- β D-glucuronideo
16	α -glicosidase	2-naftil- α D-glucopiranosideo
17	β -glicosidase	6-Br-2-naftil- β D-glucopiranosideo
18	N-acetil- β -glucosaminidase	1-naftil-N-acetil- β D glucosamina
19	α -mannosidase	6-Br-2-naftil- α D-mannopiranosideo
20	α -fucosidase	2-naftil- α L-fucopiranosideo

3.8. Caracterização isoenzimática de esterase dos isolados de *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp

3.8.1. Extração de proteínas e preparo das amostras

Para a extração de proteínas e análise eletroforética, os isolados de *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp foram cultivados em meio MNM líquido, por 24 dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro e sob agitação constante. Após o período de incubação, o micélio desenvolvido foi recolhido por filtração em papel de filtro Whatman nº 41 e utilizado para a análise eletroforética, assim como o filtrado obtido.

Aproximadamente 100 mg de micélio fresco, foram homogeneizadas em 3 ml de tampão de extração Tris-Glicina 0,125 M (pH 8,2) contendo 2% de polivinilpirrolidona insolúvel (PVP), em almofariz de porcelana, a 4°C . Após a trituração, os homogeneizados foram mantidos a 4°C durante 2 h e posteriormente centrifugados a 10.000 g por 10 min. Os sobrenadantes foram colocados em sacos de diálise (limite de exclusão de 20.000) e concentrados com polietilenoglicol 20.000, a 4°C . Após 3 h, o resíduo foi ressuspensão em 1 ml do tampão de extração contendo 10% de glicerol (Bach, 1991).

O filtrado das culturas foi concentrado com sulfato de amônio (85% de saturação - 4°C) e mantido a 4°C por 12 horas sendo em seguida centrifugado, sob refrigeração, a 20.000 g por 25 min. O *pellet* foi ressuspensão em 2 ml de tampão acetato de sódio 0,05 M e dialisado conforme descrito em 3.6.1.

As amostras do micélio e do filtrado tiveram a concentração proteica ajustada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e então utilizadas na eletroforese.

3.8.2. Corrida eletroforética e coloração dos géis

Para a análise eletroforética, foi utilizado gel nativo de poliacrilamida 4% (gel concentrador) e 10% (gel separador) (**Apêndice 6**). Em cada poço do gel foram aplicados 50 µl do extrato proteico do micélio e do filtrado contendo, respectivamente, 430 e 300 µg de proteína. A eletroforese anódica foi conduzida em equipamento de sistema vertical da Bio-Rad ("Mini Protean II"), utilizando Tris-Glicina pH 8,9 (0,75 g Tris + 3,6 g de Glicina em 1.000 ml de água), como tampão de corrida. Como marcador de corrida foi utilizado azul de bromofenol a 0,25% em tampão de extração. Após a aplicação das amostras, a placa foi mantida a 4°C sob voltagem constante de 80 V até o final da corrida.

Para a visualização das bandas de α -esterase, o gel foi lavado 3 vezes com tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) e incubado em solução de α -naftil acetato 1% e Fast blue RR (**Apêndice 6**) até o aparecimento das bandas. Após a coloração, o gel foi fixado em solução de glicerol a 10% (Alfenas et al., 1991).

3.9. Atividade celulolítica na associação ectomicorrízica

3.9.1. Desenvolvimento de ectomicorrizas pela técnica de papel sanduíche

Para se verificar a importância das enzimas celulolíticas nos estágios iniciais da micorrização, plântulas de *E. urophylla* com 18 dias, cultivadas assepticamente em solução nutritiva agarizada, foram inoculadas com *P. tinctorius* 1604 e com *P. tinctorius* 185, pela técnica do papel sanduíche (Chilvers et al., 1986). Plântulas sem inoculação foram utilizadas como testemunhas. Os isolados de *P. tinctorius* foram escolhidos visando a compatibilidade com a planta hospedeira e o crescimento micelial *in vitro*. O isolado *P. tinctorius* 1604 mostra crescimento micelial vigoroso e denso, formando colônias maiores em meio MNM sólido do que os outros dois isolados

P. tinctorius 1603 e 1605. Em trabalhos realizados por Galli (1996), este mesmo isolado 1604, quando inoculado em *E. citriodora* e *E. urophylla*, formou uma maior quantidade de micorrizas do que os demais. O isolado *P. tinctorius* 185 foi utilizado por também apresentar crescimento micelial vigoroso, denso, formar colônias grandes em MNM sólido e ser incompatível com espécies de *Eucalyptus*.

Aproximadamente 18 ml de meio de cultivo MNM agarizado foram adicionados em placas de Petri, sendo que após a solidificação foi colocada sobre este uma folha de papel de filtro de 4 cm de raio, previamente umedecida com o mesmo meio e esterilizada em autoclave a 1 atm por 20 min. Sobre estas folhas foram colocados 4 discos de micélio com 4 mm de diâmetro, retirados das bordas de culturas fúngicas com 25-30 dias de crescimento em MNM. Para cada isolado foram preparadas 150 placas de Petri. Em seguida, estas placas foram incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 20 dias, no escuro. Este tempo foi o suficiente para que o micélio se desenvolvesse sobre toda a superfície das folhas de papel de filtro. Após este período, as folhas de papel colonizadas foram utilizadas para se inocular as plântulas.

Simultaneamente, as plântulas foram preparadas para a inoculação. As sementes de *Eucalyptus urophylla* foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio comercial (1% de cloro ativo) por 3 min e transferidas para placas de Petri contendo solução agarizada de Sarruge (Sarruge, 1975) para germinarem. As sementes recém germinadas foram transferidas para placas de Petri contendo solução mineral do meio MNM agarizado e coberto com folha de papel de filtro esterilizado. Estas plântulas foram ainda cobertas por outro disco de papel de filtro com um corte radial em forma de cunha, de modo a permitir a cobertura apenas do sistema radicular das plântulas. As placas foram colocadas em caixas plásticas, formando entre si um ângulo de aproximadamente 45° , de modo que todas as plântulas ficassem expostas à luz. Tais plântulas foram incubadas em câmara de

crescimento a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob luz complementar fornecida por lâmpadas fluorescentes luz do dia com intensidade de $39 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, com fotoperíodo de 10 h luz/14h escuro, por aproximadamente 18 dias.

Após este período, as folhas de papel de filtro em forma de cunha, que recobriam as plântulas, foram assepticamente retiradas e substituídas pelas folhas de papel de filtro colonizadas por *P. tinctorius* 1604 ou 185 de tal forma que o micélio entrasse em contato com o sistema radicular (**Figura 4**). As plântulas inoculadas e as testemunhas foram coletadas com 12 horas e 1, 2, 6 e 10 dias após a inoculação, para se verificar o envolvimento de endo β -1,4 glucanase, exo β -1,4 glucanase e β -glicosidase nos estágios iniciais da micorrização em um sistema compatível (*E. urophylla* x *P. tinctorius* 1604) e incompatível (*E. urophylla* x *P. tinctorius* 185). A micorrização foi avaliada visualmente e pela quantificação de biomassa fúngica utilizando-se a técnica do ergosterol. Foi também acompanhada por microscopia eletrônica de varredura.

Figura 4 - Obtenção de ectomicorrizas de *Pisolithus tinctorius* em plântulas de *E. urophylla*, pela técnica de papel sanduíche.

3.9.2. Atividade celulolítica

Para a dosagem da atividade celulolítica, aproximadamente 50 mg de raízes micorrizadas foram pulverizadas em almofariz de porcelana com N₂ líquido. Ao pó formado foram adicionados 4,0 ml de tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0) e 15 mM de β -mercaptoetanol. Em seguida, a mistura ficou em repouso por 5 h a 4°C, sendo centrifugada a 20.000 g por 25 min em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi recolhido (Garcia-Garrido et al., 1992a; Garcia-Romera et al., 1991) e utilizado para a dosagem da atividade enzimática e cromatografia por filtração em gel. O mesmo procedimento foi utilizado para as plantas não micorrizadas (testemunhas).

A cromatografia por filtração em gel foi realizada conforme descrito em 3.6.2 e a atividade celulolítica foi verificada conforme metodologia descrita em 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.3.

3.10. Determinação da biomassa fúngica e micorrização pela quantificação de ergosterol

A quantificação da biomassa dos isolados de *P. tinctorius* 1604 e 185 foi determinada pelo método do ergosterol, bem como a colonização das raízes de *Eucalyptus urophylla*. Para tanto, os isolados foram cultivados em MNM líquido por 30 dias conforme descrito em 3.7. O meio de cultura foi filtrado através de papel de filtro Whatman nº 41 e o micélio obtido seco em estufa a 40-45°C até peso constante. Ao micélio (1, 5, 10 e 20 mg de micélio seco) foi adicionado pequena quantidade de ácido pirogálico (1 mg) e 4 ml de álcool etílico 95%, fazendo-se a homogeneização em almofariz de porcelana. Após 1 h a 4°C no escuro, o homogeneizado foi saponificado com 0,8 ml de KOH 60% (massa/volume) a 70°C por 30 min. O sobrenadante foi recolhido, acrescido de 2 ml de água destilada e particionado duas vezes contra hexana. As frações de hexana foram evaporadas a 60°C e o precipitado resultante foi ressuspenso em 1,0 ml de metanol (p.a.) e filtrado através de filtro descartável

para seringa (poro de 0,45 μm de diâmetro) (Griffiths & Jones, 1985; Salmanowicz & Nylund, 1988). Os extratos metanólicos foram analisados através de cromatografia líquida de alta pressão ("HPLC"), com coluna para a detecção de ergosterol (Supelcosil LC-18, 15,0 cm x 4,6 mm) a 282 nm e fluxo de 1 ml de etanol/min. O tempo de retenção do ergosterol foi de aproximadamente 4,8 min. Os valores obtidos foram plotados nas curvas-padrão para ergosterol de cada isolado (**Apêndice 7**).

Para a quantificação da micorrização foram utilizadas 5 plântulas por isolado, sendo a extração e dosagem de ergosterol realizadas conforme descrito acima. Os valores obtidos foram comparados com valores de ergosterol para a cultura pura dos isolados e os resultados expressos em mg de micélio / grama de peso fresco.

3.11. Microscopia eletrônica de varredura

Amostras de raízes micorrizadas foram coletadas periodicamente (conforme descrito em 3.9.1.), fixadas em formalina : ácido acético : etanol 50° (FAA; 5:5:90; v/v/v) durante 48 h e transferidas para etanol 60° e 70°. As amostras foram seccionadas transversalmente com lâmina de barbear e desidratadas em série etanólica gradual (80°, 90°, 95° e 3 vezes em 100°) durante 20 min por série. O material foi então, seco em aparelho de secagem ao ponto crítico (Balzers CPD 030) com CO₂ montados em *stubs* com fita carbono dupla face e metalizados com uma liga de ouro-paládio na espessura de 35 nm em evaporador durante 150 s. A observação foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM - 25 SII), sob aceleração de 15 kv.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Utilização de fontes de carbono

A capacidade dos isolados de *P. tinctorius* 1603, 1604, 1605 e 185 e *Rhizopogon* sp de crescerem em meio de cultura MNM, suplementado com diferentes fontes de carbono, incluindo monossacarídeos (glicose, frutose), dissacarídeos (celobiose, maltose, sacarose, xilose) ou polissacarídeos (carboximetilcelulose, celulose nativa ou pectina), está representada na **Figura 5**. Os resultados mostraram uma variação não só na preferência pelo substrato, ou seja, aquele que permitiu maior crescimento micelial para um mesmo isolado fúngico, bem como na habilidade de cada isolado em utilizar certas fontes de carbono.

O isolado *P.tinctorius* 1603 (Figura 5A) foi capaz de utilizar 9 das 13 fontes de carbono testadas. Este fungo apresentou maior crescimento micelial quando o meio de cultivo foi acrescido de celobiose 1% + glicose 0,1%. Também foi capaz de utilizar fontes de carbono complexas, como celulose nativa, carboximetilcelulose e pectina somente quando suplementadas com uma pequena quantidade de glicose (0,1%) e também utilizou fontes mais simples como a glicose, celobiose, frutose e maltose. O fungo não utilizou a xilose, possivelmente por não conseguir sintetizar a enzima xilanase e também não cresceu no meio de cultura controle (ausência de fonte de C). Houve um baixo crescimento fúngico (média do diâmetro da colônia = 0,96 cm) e uma fase adaptativa longa (20 dias para início de crescimento micelial) quando sacarose foi utilizada como fonte de carbono levando a supor que a enzima invertase,

neste isolado, talvez seja indutiva e não ocorra em pequenas quantidades constitutivamente.

O isolado *P. tinctorius* 1604 (Figura 5B), também cresceu em 9 das 13 fontes de carbonos testadas, sendo que o maior crescimento micelial ocorreu em presença de celulose nativa 0,5% + glicose 0,1%, seguido por celobiose + glicose, celobiose e carboximetilcelulose + glicose. Este isolado não cresceu na presença de carboximetilcelulose e de xilose e nem no meio-controle e foi incapaz de utilizar a pectina, mesmo na presença de glicose. De maneira semelhante ao isolado *P. tinctorius* 1603, o fungo cresceu lentamente em sacarose apresentando uma fase adaptativa longa (20 dias). O crescimento em celulose nativa, mesmo na ausência de glicose, indica produção de enzimas celulolíticas por este isolado. Ainda para este substrato, poderia se dizer que possivelmente o fungo utiliza a glicose enquanto ativa os mecanismos de produção das enzimas celulolíticas, uma vez que o período de adaptação para este substrato na ausência de glicose é de 10 dias, e que a maior taxa de crescimento, neste substrato na presença de glicose, ocorre a partir de 10 dias.

Alguns autores (Gong & Tsao, 1979; Herr, 1979) consideram que a presença de glicose no meio de cultivo pode inibir a indução (repressão catabólica) de enzimas celulolíticas. No entanto, tomando-se como exemplo o crescimento de *P. tinctorius* 1604 em celulose nativa, isto não parece ocorrer. Caso houvesse a inibição em celulose nativa + glicose 0,1%, após os 10 dias de crescimento, possivelmente mantido às custas do *start* de glicose, o fungo entraria em uma fase de adaptação ao substrato por mais 10 dias, sem que houvesse crescimento micelial neste período quando, então retornaria as atividades e novamente mostraria crescimento micelial.

O isolado *P. tinctorius* 1605 (Figura 5C) cresceu em 11 das fontes de carbono, apresentando maior crescimento micelial na presença de maltose. Este isolado foi também capaz de utilizar as fontes complexas como celulose nativa e carboximetilcelulose apenas na presença de glicose 0,1% e pectina,

tanto na presença quanto na ausência de glicose. Dos 3 isolados de *Eucalyptus*, o *P. tinctorius* 1605 foi o único capaz de utilizar a xilose como fonte de carbono, indicando a produção extracelular da enzima xilanase. O crescimento em sacarose também foi lento apesar de apresentar uma fase de adaptação menor (10 dias) quando comparado com os outros isolados *P. tinctorius* 1603 e 1604.

P. tinctorius 185 e *Rhizopogon* sp (Figuras 5D e 5E, respectivamente), isolados de *Pinus*, foram mais eficientes na utilização das fontes de carbono do que os fungos isolados de *Eucalyptus*, pois utilizaram 12 das 13 fontes que foram testadas. O maior crescimento micelial foi observado na presença de celobiose e de celobiose + glicose (0,1%). O isolado *P. tinctorius* 185 não cresceu em celulose nativa mas cresceu nas demais fontes de carbono complexas, com ou sem a glicose. Tanto *P. tinctorius* 185 quanto *Rhizopogon* sp cresceram no meio controle. *Rhizopogon* sp não foi capaz de crescer na presença de xilose. Aparentemente, estes dois fungos ectomicorrízicos são metabolicamente de fácil adaptação às condições nutritivas ambientais.

Os resultados apresentados sugerem que diferenças entre isolados de fungos ectomicorrízicos podem ser visualizadas pela capacidade ou não de utilizar diferentes fontes de carbono. Com exceção do isolado *P. tinctorius* 1605 (que apresentou melhor crescimento micelial em presença de maltose), os demais isolados apresentaram uma preferência por celobiose e glicose, como substrato. Apesar do crescimento lento e pequeno, de uma maneira geral, os isolados foram capazes de utilizar dissacarídeos e fontes de carbono complexas como a celulose nativa, carboximetilcelulose e pectina, quando na presença de uma pequena quantidade de glicose. Este fato já foi relatado por Norkrans (1950) que observou que o fungo micorrízico *Tricholoma vaccinum* era capaz de decompor a celulose quando um *start* de glicose era adicionado ao meio de cultivo. Lamb (1974) e Taber & Taber (1987) estudando diferentes isolados de *P. tinctorius* obtidos de *Pinus* sp, mostraram que uma

suplementação com glicose melhorava a utilização de dissacarídeos (por exemplo, sacarose) e de fontes complexas de carbono.

Os isolados de *P. tinctorius* e de *Rhizopogon* sp, analisados neste trabalho, diferiram quanto a preferência pela fonte de carbono. Cao & Crawford (1993 b) também verificaram diferenças, com relação a utilização de fontes de carbono, nos 4 isolados de *P. tinctorius* obtidos de abeto, que analisaram. Estes autores estudaram o crescimento micelial destes isolados em 9 fontes de carbono (celulose, celobiose, manose, frutose, amido, glicose, maltose, sacarose e xilose) e somente glicose, manose e celobiose proporcionaram um bom crescimento. Já os isolados estudados por Lamb (1974) não cresceram em celobiose, celulose e pectina, mas utilizaram glicose, manose, sacarose, frutose e xilose, enquanto aqueles estudados por Taber & Taber (1987) utilizaram a celobiose e glicose para o crescimento. Lamb (1974) também estudou a capacidade dos fungos ectomicorrízicos *Rhizopogon luteolus* e *R. roseolus* em utilizar diferentes fontes de carbono, entre elas glicose, frutose, xilose, sacarose, celobiose, celulose e pectina, verificando que apenas glicose e celobiose proporcionaram um rápido crescimento nos 2 isolados e que as fontes de carbono complexas, bem como a sacarose, somente eram utilizadas quando o meio de cultivo era acrescido com glicose.

4.2. Atividade enzimática *in vitro*

4.2.1. Atividade de exo β -1,4 glucanase (avicelase, celobiohidrolase)

A atividade de exo β -1,4 glucanase foi observada nos isolados de *P. tinctorius* 1603, 1604, 1605 e 185 e em *Rhizopogon* sp, cultivados em MNM onde glicose foi substituída por celulose microcristalina (Avicel) 1%, como fonte de carbono (**Figura 6**).

O isolado *P. tinctorius* 1603 (Figura 6A) apresentou os maiores valores de atividade enzimática dentre os 5 fungos ectomicorrízicos testados,

sendo que o pico de atividade ocorreu aos 12 dias de cultivo, decrescendo após este período. A $\text{exo } \beta\text{-1,4}$ glucanase atua sobre a celulose cristalina solubilizando-a através da remoção de unidades de celobiose da cadeia de celulose. É possível que o isolado *P. tinctorius* 1603 tenha produzido a enzima até os 12 dias de cultivo, período talvez suficiente para a hidrólise do substrato e produção de celobiose em quantidade suficiente para que houvesse a inibição enzimática, determinando assim um decréscimo na atividade da enzima após este período. Sabe-se que as endoglucanases de um sistema típico de enzima celulase são inibidas pela celobiose (Chaves, 1982) o que possivelmente, poderia estar ocorrendo também com as exoglucanases.

Para o isolado *P. tinctorius* 1604 (Figura 6B), nas mesmas condições de cultivo, não ocorreu a síntese da enzima, bem como não se verificou nenhum crescimento deste fungo em meio contendo celulose microcristalina, como substrato e indutor.

Os isolados *P. tinctorius* 1605 e 185 (Figuras 6C e 6D, respectivamente) apresentaram atividade enzimática relativamente baixa e praticamente constante durante o decorrer do experimento. A maior atividade em ambos foi observada aos 30 dias de cultivo.

O isolado *Rhizopogon* sp (Figura 6E) não apresentou atividade enzimática durante os 6 dias iniciais de cultivo, período no qual poderia estar havendo uma adaptação ao substrato. Após este período ocorreu um aumento na atividade enzimática até os 24 dias, decrescendo em seguida. O período de adaptação apresentado, sugere o carácter indutivo da enzima.

Diferenças entre isolados de fungos ectomicorrízicos já foram relatadas através de características como taxa de crescimento, produção de fosfatases e nitrato redutase, produção de fitohormônios e atividade antifúngicas (Ho, 1987; Suh et al., 1991). Pelos resultados aqui apresentados, pode-se evidenciar que os isolados de *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp também se diferenciam pela capacidade de produção de enzimas celulolíticas ($\text{exo } \beta\text{-1,4}$

glucanase) e que esta diferença também pode estar relacionada ao substrato utilizado como indutor. Cao & Crawford (1993a) estudaram a capacidade de 4 isolados de *P. tinctorius* em sintetizar a enzima exo β -1,4 glucanase em meio MNM, tendo glicose 1% como indutor. Os resultados mostraram uma baixa produção enzimática por 2 dos isolados testados (S359 e SMF), sendo que os demais não apresentaram atividade dessa enzima.

Além do substrato utilizado, outros fatores também podem afetar a produção de exo β -1,4 glucanase. O efeito das vitaminas biotina e tiamina na produção da enzima foi estudada por Dahm & Strzelczuk (1995) nos fungos ectomicorrízicos *P. tinctorius* (isolado de *Pinus taeda*), *Laccaria laccata* (isolado de *Pseudotsuga menziesii*) e *Hebeloma crustuliniforme*. Os autores verificaram a atividade de exo β -1,4 glucanase em todos os isolados quando estes foram cultivados em meio contendo carboximetilcelulose (CMC) no lugar de Avicel. Em *P. tinctorius* a presença das vitaminas não influenciou a atividade enzimática entretanto, quando cultivado em pó de celulose, as vitaminas reprimiram a atividade. Em *L. laccata*, a atividade foi baixa ou não detectada, sendo que em *H. crustuliniforme*, a atividade foi alta tanto em CMC como em pó de celulose, com ou sem as vitaminas.

Em fungos celulolíticos como *Humicola* sp e *Trichoderma* sp, têm-se observado a produção de exo β -1,4 glucanase quando estes são cultivados na presença de celulose microcristalina como substrato e indutor. Chaves (1982) estudou o comportamento de um isolado de *Humicola* sp e de *Trichoderma reesei* QM 9414, quando cultivados em meio mineral suplementado com celulose microcristalina ou carboximetilcelulose. O autor observou que *Humicola* sp apresentou maior atividade de avicelase ligada à massa celular, a qual correspondeu ao precipitado, obtido após centrifugação em meio mineral e deste meio suplementado com celulose microcristalina, enquanto que *T. reesei* QM 9414 apresentou maior atividade de avicelase no sobrenadante de ambos os meios testados. Aguilar (1991) também verificou

alta atividade de avicelase em *Trichoderma pseudokoningii* e *Humicola* sp, quando cultivados em meio com celulose microcristalina (Avicel), como fonte de carbono.

4.2.2. Atividade de endo β -1,4 glucanase (carboximetilcelulase - CMCase)

A atividade de endo β -1,4 glucanase foi observada em isolados de *P. tinctorius* 1603, 1604, 1605 e 185 e em *Rhizopogon* sp, cultivados em celulose nativa (CN - 0,5%) (**Figura 7**) e carboximetilcelulose (CMC - 1%) (**Figura 8**), com ou sem adição de glicose 0,1%.

O isolado de *P. tinctorius* 1603 cultivado em CN (Figura 7A), apresentou atividade enzimática relativamente maior quando o meio, além da celulose nativa, foi suplementado com uma pequena quantidade de glicose (0,1%), como fonte de carbono não sendo, entretanto, estatisticamente diferentes ($P=0,05$). Isto ocorre com algumas leveduras, por exemplo *Kluyveromyces marximans*, que produzem pectinase constitutivamente somente se no meio de cultivo existir glicose (1%) (Schwan, 1994)

Em *P. tinctorius* 1604 (Figura 7B), inicialmente a atividade enzimática foi maior no meio contendo apenas CN como fonte de carbono decrescendo após o 6^o dia de cultivo. Resultado contrário ocorreu em presença de glicose, onde a atividade aumentou a partir do 18^o dia de cultivo.

No isolado *P. tinctorius* 1605 (Figura 7C) praticamente não se observou diferença na síntese enzimática nos dois meios de cultivo utilizados, visto que a atividade da enzima foi ligeiramente maior após 6 dias de crescimento no meio contendo CN + glicose, mas após este período, a atividade igualou-se ao do meio com apenas CN como fonte de carbono e indutor.

Em *P. tinctorius* 185 (Figura 7D), a maior atividade foi verificada aos 12 dias de cultivo em meio com CN. Após este período, ocorreu uma queda

na atividade, permanecendo praticamente constante até o final do experimento. Quando em presença de glicose, a atividade foi maior após 18 dias de cultivo, decrescendo após este período.

Em *Rhizopogon* sp (Figura 7E), cultivado nas mesmas condições acima descritas, a atividade de endo β -1,4 glucanase foi sempre maior na ausência de glicose. Na presença de glicose, os valores de atividade foram menores, apresentando apenas um pico aos 12 dias de cultivo.

Quando os isolados de *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp foram cultivados na presença de carboximetilcelulose (CMC) 1%, com ou sem adição de glicose 0,1% (Figura 8), foram obtidos maiores valores de atividade de endo β -1,4 glucanase do que quando cultivados na presença de celulose nativa, nas mesmas condições. A carboximetilcelulose seria, portanto, melhor indutor do que a CN, possivelmente por apresentar-se numa forma mais solúvel e mais suscetível à ação da enzima.

Na presença de CMC, o isolado *P. tinctorius* 1603 (Figura 8A) apresentou atividade enzimática maior aos 18 dias de cultivo. Na presença de CMC + glicose, a maior atividade foi aos 12 dias de cultivo, o que poderia indicar que este isolado, com o *start* de glicose, antecipa a produção enzimática em 6 dias. Entretanto a atividade foi sempre menor quando a glicose estava presente no meio de cultivo.

O isolado *P. tinctorius* 1604 (Figura 8B) apresentou a maior atividade de CMCase dentre os isolados estudados. A maior produção de endo β -1,4 glucanase foi observada após 6 dias de cultivo, mantendo-se estável até o 18^o dia quando então houve um decréscimo até o 30^o dia de cultivo. Quando o meio apresentava CMC + glicose, a atividade foi relativamente baixa. Tanto no isolado *P. tinctorius* 1603 quanto em *P. tinctorius* 1604, a presença de glicose reprimiu a atividade enzimática. Entretanto, no isolado *P. tinctorius* 1605 (Figura 8C) a maior atividade enzimática foi observada na presença de glicose, ocorrendo um aumento lento e gradativo com o tempo de cultivo. Para

este isolado, a atividade de endo β -1,4 glucanase foi sempre menor em meio contendo apenas CMC, mostrando a baixa capacidade deste isolado em utilizar esta fonte de carbono como substrato e como indutor enzimático e também a necessidade de um estímulo (presença de glicose) para que ocorra a indução.

No isolado *P. tinctorius* 185 (Figura 8D) a maior atividade enzimática ocorreu aos 6 dias de cultivo, tanto em CMC quanto em CMC + glicose, sendo que neste último, a atividade foi maior. Após este período, ocorreu um decréscimo lento e gradativo da atividade quando na presença de CMC. Em CMC + glicose ocorreu também uma redução na atividade, que tornou a elevar-se ligeiramente aos 24 dias de cultivo.

Rhizopogon sp (Figura 8E), na presença de CMC + glicose, apresentou uma fase de adaptação ao substrato de 6 dias, período no qual não houve atividade enzimática. A maior atividade foi observada aos 12 dias de cultivo, decrescendo após este período e mantendo níveis baixos até o 30^o dia. Neste isolado, a glicose também teria reprimido a atividade enzimática. Na presença apenas de CMC, a atividade da enzima foi verificada a partir do 6^o dia de cultivo, permanecendo praticamente constante até o final do experimento.

Por estes resultados, pode-se notar que a presença de glicose no meio de cultivo com CMC reprimiu a atividade de endo β -1,4 glucanase, com exceção de *P. tinctorius* 1605. Porém, quando na presença de celulose nativa, a glicose estimulou a produção da enzima, exceção feita ao *Rhizopogon* sp, que teve a atividade inibida na presença de glicose. A atuação da glicose como indutor e/ou como repressor da atividade celulolítica tem sido reportada. Norkrans (1950) relatou que o fungo micorrízico *Tricholoma vaccinum* somente crescia em celulose na presença de *start* de glicose como fonte de carbono/energia. Contrário a isto, Linkins & Antibus (1981) verificaram que a presença de glicose no meio reprimia a atividade de endoglucanase em *Cenococcum geophilum* e *Hebeloma pusillum*.

A capacidade dos fungos ectomicorrízicos produzirem enzimas celulolíticas *in vitro* tem sido estudada por diferentes pesquisadores. A produção de endo β -1,4 glucanase por *Amanita muscaria*, fungo que forma ectomicorriza com *Pinus patula*, foi estudada por Natarajan & Kannan (1982). Os autores cultivaram o fungo em meio líquido contendo CMC como fonte de carbono e verificaram a produção da enzima aos 15 dias de cultivo, sendo a atividade máxima verificada aos 25 dias de cultivo. A enzima foi adaptativa e não foi produzida na presença de glicose. A atividade de endo β -1,4 glucanase foi também verificada nos fungos ectomicorrízicos *Amanita regalis*, *Suillus bovinus* e *Paxillus involutus*, quando cultivados em meios de cultura sólido e líquido, acrescidos com CMC. O fungo *A. regalis* foi capaz de sintetizar a enzima em ambos os meios de cultivo, *S. bovinus* apresentou uma baixa atividade nos dois meios e *P. involutus* apresentou atividade apenas no meio líquido (Maijala et al., 1991). Cao & Crawford (1993b) também avaliaram a produção enzimática em 4 isolados de *P. tinctorius*, quando cultivados em presença de glicose 1%. Esses autores verificaram uma baixa atividade nos isolados, sendo possível detectá-la em apenas dois - isolado S359 e SMF. Dahm & Strzelczyk (1995) encontraram atividade de endoglucanase no fungo micorrízico *Hebeloma crustuliniforme* quando cultivado em meio com CMC, acrescido ou não com as vitaminas biotina e tiamina, pó de celulose ou pó de celulose com tiamina. A maior atividade foi observada em CMC e pó de celulose com tiamina. Nestes experimentos, a presença de biotina retardou a produção da enzima, sendo considerada pelos autores, como um fator retardador.

A atividade de endo e exo β -1,4 glucanase em fungos ectomicorrízicos é relativamente menor do que a atividade apresentada por fungos saprófitas (Eriksson, 1978; Miele & Linkins, 1978). Isto é de se esperar visto a natureza simbiótica da associação. Caso os fungos ectomicorrízicos produzissem uma alta atividade celulolítica, passariam a atuar como

fitopatógenos degradando a parede celular e levando a célula hospedeira à morte. Porém, a capacidade destes fungos em produzirem estas enzimas, mesmo que a atividade seja baixa, pode lhes ser benéfica e assegurar a sobrevivência no solo na ausência da planta hospedeira, pela decomposição da matéria orgânica (Colpaert & Tichelen, 1996).

4.2.3. Atividade de β - glicosidase (celobiase)

A produção de β -glicosidase foi verificada nos isolados de *P. tinctorius* 1603, 1604, 1605 e 185 e em *Rhizopogon* sp, quando cultivados em meio MNM, onde glicose foi substituída por celobiose 1% (**Figura 9**).

O isolado *P. tinctorius* 1603 (Figura 9A) apresentou o maior valor de atividade enzimática aos 18 dias de cultivo, tendo em seguida, uma queda na atividade. É possível que neste tempo (18 dias) a enzima produzida tenha hidrolizado a celobiose, liberando para o meio uma maior quantidade de glicose, que reprimiu a atividade enzimática (mecanismo de indução-repressão).

O isolado *P. tinctorius* 1604 (Figura 9B) apresentou um aumento da atividade com o tempo de cultivo, atingindo o máximo aos 12 dias. Após este período, ocorreu uma queda de atividade até o final do experimento. É possível também, que após o 12^o dia, tenha ocorrido a repressão da enzima pela entrada na célula do produto final da reação (glicose).

Para o isolado *P. tinctorius* 1605 (Figura 9C) ocorreu uma fase de adaptação ao substrato de 6 dias, no qual não houve atividade enzimática. A partir daí houve um aumento relativamente pequeno na atividade atingindo o máximo aos 24 dias de cultivo.

No isolado *P. tinctorius* 185 (Figura 9D) também observou-se um período de 6 dias de adaptação ao substrato, sendo a maior atividade encontrada após 12 dias de cultivo. Após este período, a atividade enzimática praticamente não foi observada. Este fungo apresentou a mais baixa atividade

entre os isolados testados. Tanto para *P. tinctorius* 1605 quanto para *P. tinctorius* 185, a baixa atividade apresentada nos filtrados das culturas pode indicar que a celobiose, na concentração utilizada, teria reprimido a ação enzimática extracelular, sendo esse substrato hidrolizado pela celobiase intracelular, levando ao acúmulo de glicose que age como repressor da enzima (Mandels & Reese, 1960).

O isolado *Rhizopogon* sp (Figura 9E) mostrou alta atividade enzimática no 6^o dia de cultivo (84 μ g pNP / min / mg proteína), ocorrendo em seguida, um decréscimo na atividade até o final do experimento (30 dias). Também para este isolado a presença de glicose após a hidrólise enzimática da celobiose parece ter reprimido a produção da enzima β -glicosidase.

Estes resultados evidenciam a capacidade de fungos ectomicorrízicos produzirem, diferentemente, a enzima β -glicosidase na presença de celobiose como única fonte de carbono. Tais observações concordam com as encontradas por Cao & Crawford (1993b) que verificaram a atividade de β -glicosidase em 4 isolados de *P. tinctorius*, cultivados em meios de cultura suplementados com celobiose 1% ou glicose 1%, como fontes de carbono. Esses autores verificaram também que a atividade era maior no micélio do que no filtrado das culturas, sugerindo a característica constitutiva da enzima para os isolados. Também observaram que a celobiose induziu a síntese de endo e exo β -1,4 glucanase propondo que este substrato atuando como indutor para o sistema celulolítico, determina a produção constitutiva de celobiase, que ajuda a manter o indutor em baixa atividade ou então previne a manutenção da rigidez da parede celular durante o estabelecimento da simbiose.

A produção de β -glicosidase por *P. tinctorius* foi observada também por Treat & Taber (1988) quando cultivaram o fungo em meios de cultivo suplementados com celobiose, glicose ou carboximetilcelulose. A atividade extracelular apareceu após 16 dias de cultivo atingindo o máximo aos

25 dias, quando na presença de celobiose, sendo que nenhuma atividade foi detectada no filtrado ou no micélio, quando o fungo foi cultivado em glicose como fonte de carbono. Os autores também não observaram atividade enzimática em CMC, sugerindo que o fungo não possui um sistema celulolítico completo.

A atividade de β -glicosidase também foi observada em outros fungos ectomicorrízicos. A produção da enzima foi verificada em filtrados de cultura de *Cenococcum geophilum* e *Hebeloma pusillum*, quando cultivados em presença de celobiose ou glicose, como fonte de carbono. A presença da enzima nos dois meios de cultivo, sugeriu aos autores, que o uso de celobiose ou de outro celooligossacarídeo pode ser importante na assimilação de carbono pelo fungo simbiote, uma vez que induziria a produção da enzima necessária para a hidrólise do substrato (Linkins & Antibus, 1981).

4.2.4. Atividade de xilanase

Para verificar a atividade de xilanase, os isolados de *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp foram cultivados em meio MNM líquido, onde glicose foi substituída por carboximetilcelulose 1% (CMC), como fonte de carbono e indutor (**Figura 10**).

O isolado *P. tinctorius* 1603 (**Figura 10A**) não foi capaz de sintetizar a enzima xilanase nesta fonte de carbono. Possivelmente, este isolado não possui o mecanismo para a produção desta enzima, pois mesmo quando cultivado na presença de xilose (**Figura 5A**) não apresentou crescimento.

O isolado *P. tinctorius* 1604 (**Figura 10B**) apresentou a maior atividade de xilanase entre os isolados estudados. A atividade foi detectada após 6 dias de cultivo, seguida de uma queda até aos 18 dias e voltando a apresentar alta atividade aos 24 dias. Quando este isolado foi cultivado em meio sólido na presença de xilose (**Figura 5B**), não apresentou crescimento,

por provavelmente não ser capaz de sintetizar a enzima. Para este isolado, aparentemente, a carboximetilcelulose foi melhor indutor enzimático do que a xilose, haja visto que em meio de cultura sólido contendo este açúcar como única fonte de carbono, não apresentou crescimento micelial.

O isolado *P. tinctorius* 1605 (Figura 10C) apresentou baixa atividade de xilanase no decorrer do experimento. A atividade foi observada aos 6 dias de cultivo, permanecendo constante até aos 24 dias e não sendo detectada aos 30 dias de cultivo. Entretanto, quando cultivado em meio sólido na presença de xilose (Figura 5C), foi capaz de utilizá-la como fonte de carbono. Portanto, para este isolado, a carboximetilcelulose, ao contrário da xilose, não foi um bom indutor para a enzima (devido a baixa atividade apresentada, em relação aos outros isolados).

O isolado *P. tinctorius* 185 (Figura 10D) apresentou a maior atividade aos 6 dias de cultivo (75 UA/ h / mg proteína), quando então ocorreu um decréscimo da atividade até aos 18 dias, aumentando novamente aos 24 dias. No final do experimento (30 dias) a enzima não foi detectada. Semelhante ao *P. tinctorius* 1605, este isolado cresceu em meio de cultura sólido na presença de xilose (Figura 5D), indicando que é capaz de sintetizar xilanase tanto na presença de xilose quanto na presença de CMC.

O isolado *Rhizopogon* sp (Figura 10E), cultivado nas mesmas condições, apresentou uma longa fase de adaptação (12 dias) ao substrato, período no qual não se observou atividade. A atividade de xilanase foi detectada aos 18 dias de cultivo e apresentou o maior valor aos 24 dias (35 UA / h / mg proteína). Este isolado não utilizou a xilose (Figura 5E) quando cultivado em meio sólido, indicando que CMC também foi melhor indutor.

A enzima xilanase hidroliza a xilana, principal tipo de hemicelulose das paredes secundárias das dicotiledôneas (Pascholati, 1995). A presença desta enzima em fungos ectomicorrízicos demonstra a sua capacidade para degradar a parede celular da planta hospedeira na fase de estabelecimento da associação micorrízica, bem como sua habilidade em

decompor fontes de carbono complexas (por exemplo, hemicelulose) no solo na ausência do hospedeiro (Natarajan & Kannan, 1982).

Poucos trabalhos relatam a produção de xilanases por fungos ectomicorrízicos. Evidências da produção *in vitro* de xilanase por estes fungos foi dada por Cairney & Burke (1994) quando analisaram filtrados das culturas de *Paxillus involutus*, *Suillus variegatus*, *Tylospora fibrillosa* e no simbiote ericóide *Hymenoscyphus ericae*. Por outro lado, em fungos saprófitas e fitopatogênicos a atividade de xilanase tem sido relatada com mais frequência. Em saprófitas, a produção de xilanase foi observada nos fungos termófilos *Chrysosporium sulfureum*, *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus terreus* e *A. fumigatus*, quando cultivados em meios de cultivo suplementados com carboximetilcelulose (CMC) + glicose, CMC e celulose. A atividade da enzima variou dependendo do meio de cultivo, sendo que a máxima atividade foi observada em meio com celulose. Dos 4 fungos estudados, *P. purpurogenum* foi o que apresentou a maior síntese enzimática (Venkateshwarlu & Reddy, 1990). Stewart et al. (1983) estudaram a atividade de xilanase em *Aspergillus fumigatus* e verificaram uma maior produção da enzima quando o fungo foi cultivado em meio líquido contendo forragem e palha como fonte de carbono. Em *Trichoderma pseudokoningii* a produção da enzima foi observada quando o fungo foi cultivado em meio mineral suplementado com xilana 0,1% como fonte de carbono, sendo que a atividade máxima ocorreu após 4 dias de cultivo (Baker et al., 1977). Além do efeito do substrato na indução da enzima, o efeito da temperatura de incubação e variação de pH na produção de xilanase foi estudado em *Thielavia terrestris*, um fungo termófilo, cultivado em “solka bloc”. A máxima atividade foi observada em temperatura de 48°C e pH inicial de 4,0 (Merchant et al., 1988).

Alguns fitopatógenos de cereais são conhecidos como produtores de xilanase, quando se utilizam de paredes celulares da planta hospedeira como fonte de carbono (Holden & Walton, 1992; Southerton et al., 1993). Alguns estudos também evidenciaram um aumento da atividade da enzima

associado ao desenvolvimento da lesão no hospedeiro (Southerton et al., 1993). A produção de xilanase pelo fitopatógeno *Helminthosporium turcicum* foi verificada por Degefu et al. (1995), quando cultivaram o fungo em meio mínimo acrescido com xilana, palha de trigo ou paredes celulares isoladas de milho. A maior atividade foi observada em meio suplementado com parede celular de milho. Apesar das evidências da produção de xilanase por fungos fitopatogênicos, o papel desta enzima na patogênese não está completamente esclarecido.

4.3. Caracterização parcial das enzimas celulolíticas

As frações coletadas em coluna para filtração em gel Sephacryl S-100HR foram analisadas para a caracterização de endo β -1,4 glucanase (**Figura 11**), exo β -1,4 glucanase (**Figura 12**) e β -glicosidase (**Figura 13**).

Para o isolado *P. tinctorius* 1603 foram detectadas pelo menos, 5 isoenzimas com atividade de endoglucanase, 4 isoenzimas de exoglucanase e 3 isoenzimas de β -glicosidase (Figuras 11A, 12A e 13A, respectivamente). A massa molecular relativa de cada isoenzima detectada foi estimada utilizando-se uma curva de calibração. A curva foi construída plotando-se em um gráfico o log das massas moleculares das proteínas padrão e o quociente do volume de eluição destas proteínas pelo "void volume" (V_e/V_o) (**Figura 14**). A maior atividade de endoglucanase e exoglucanase foi observada para ambas isoenzimas IV, com massa molecular (MM) relativo de 7,0 kDa. Para a β -glicosidase, a maior atividade foi obtida com a isoenzima I, com MM de 35,5 kDa. Os valores de massas moleculares obtidos para as demais isoenzimas encontram-se na **Tabela 2**.

No isolado *P. tinctorius* 1604 foram observadas, no mínimo, 3 isoenzimas de endoglucanase, 5 isoenzimas de exoglucanase e 2 de β -glicosidase (Figuras 11B, 12B e 13B, respectivamente). A maior atividade de endoglucanase foi observada para a isoenzima III, que apresentou MM de 7,0

kDa. Para exoglucanase, a maior atividade foi com a isoenzima IV, com MM de 6,2 kDa, enquanto que para β -glicosidase, a maior atividade foi observada para a isoenzima II, com MM de 5,6 kDa. As massas moleculares relativas das demais isoenzimas, calculadas pela curva de calibração, encontram-se na Tabela 2.

O isolado *P. tinctorius* 1605 apresentou, pelo menos 2 isoenzimas de endo, 2 de exoglucanase e um único pico para β -glicosidase (Figuras 11C, 12C e 13C, respectivamente). A maior atividade de endoglucanase e exoglucanase foi observada para as isoenzimas I, com MM de 52 kDa e 7,0 kDa, respectivamente. β -glicosidase apresentou massa molecular relativa de 28 kDa.

Para o isolado *P. tinctorius* 185 foram detectadas 5 isoenzimas de endoglucanase, 2 isoenzimas de exoglucanase e 2 de β -glicosidase (Figuras 11D, 12D e 13D, respectivamente). A maior atividade de endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase foi observada para as isoenzimas I, com MM de 25 kDa, 27 kDa e 13 kDa, respectivamente. As massas moleculares relativas das demais isoenzimas obtidas encontram-se na Tabela 2.

Em *Rhizopogon* sp foram detectadas pelo menos 4 isoenzimas de endoglucanase, 1 isoenzima de exoglucanase e 3 de β -glicosidase (Figuras 11E, 12E e 13E, respectivamente). A maior atividade de endoglucanase foi observada para a isoenzima II com MM de 36 kDa. A massa molecular relativa da única isoenzima obtida para a exoglucanase foi de 3,2 kDa. Para β -glicosidase, a maior atividade foi apresentada pela isoenzima I, com MM de 37 kDa. As massas moleculares relativas das demais isoenzimas encontram-se na Tabela 2.

O número variado de isoenzimas de endo β -1,4 glucanase, exo β -1,4 glucanase e β -glicosidase apresentado pelos isolados de *P. tinctorius* e por *Rhizopogon* sp indica a ocorrência de um sistema celulolítico diferenciado nestes fungos. As enzimas celulolíticas de diferentes fungos apresentam

diversidade no número de isoenzimas e em massas moleculares. Em *Trichoderma reesei*, por exemplo, o sistema celulolítico é compreendido por seis hidrolases geneticamente distintas. Estas incluem, três endo β -1,4 glucanases, duas exo β -1,4 glucanases e uma β -glicosidase. Em *Phanerochaeta chrysosporium* o sistema é formado por cinco endoglucanases, com massas moleculares variando entre 28 a 37 kDa, uma exoglucanase e duas β -glicosidases (Eriksson & Pettersson, 1975a, b). As cinco endoglucanases isoladas de *Penicillium pinophilum* apresentaram massas moleculares variando de 25 a 62 kDa (Wood, 1992). Quatro endoglucanases e uma exoglucanase foram purificadas e caracterizadas de uma preparação comercial de celulases, obtidas de *Trichoderma viride*, utilizando uma série de procedimentos cromatográficos. A massa molecular, estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, foi de 52 kDa, 60 kDa, 42 kDa e 38 kDa para as endoglucanases e de 62 kDa para a exoglucanase (Kim et al., 1994). A massa molecular de endoglucanases de *Trichoderma reesei*, estimada cromatograficamente em coluna com gel Sephadex G-100, foi de 64 kDa (Ogawa et al., 1991). Cowling & Brown (1969) relataram as massas moleculares de celulases de vários fungos como de *Penicillium notatum* com 35 kDa, *Polyporus versicolor* com valores entre 11 e 51 kDa e de *Myrothecium verrucaria* variando entre 5 e 55 kDa.

Em fungos ectomicorrízicos, Cao & Crawford (1993a, b) purificaram e caracterizaram a β -glicosidase de isolados de *P. tinctorius*. Os isolados SMF, S359 e S471 apresentaram três isoformas em eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, enquanto o isolado S370 apresentou 5 isoformas. A massa molecular aparente das isoenzimas produzidas por *P. tinctorius* SMF, determinada por cromatografia de exclusão molecular, foi aproximadamente 450 kDa. Entretanto, uma única banda com massa molecular de 150 kDa, foi obtida após eletroforese em gel de poliacrilamida SDS. Os autores concluíram

que a β -glicosidase de *P. tinctorius* SMF consistia de três monômeros de 150 kDa.

4.4. Caracterização enzimática pelo sistema API-ZYM

Os isolados de *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp foram analisados pelo sistema API-ZYM e apresentaram em média, 3,6 reações positivas aos substratos testados, conforme **Tabela 3**. Esta média representa o quociente entre a soma das reações positivas de cada isolado e o número de isolados.

O isolado *P. tinctorius* 1603 foi o que apresentou o maior número de reações positivas (notas acima de zero). Neste isolado foram detectadas 6 enzimas das 19 testadas, sendo elas (o local de reação no *kit* está indicado entre parênteses): esterase (3), esterase lipase (4), leucina arilamidase (6), fosfatase ácida (11), naftol-AS-BI-fosfohidrolase ou fosfohidrolase (12) e β -glucosaminidase (18). O isolado *P. tinctorius* 1604, nas mesmas condições de cultivo, produziu apenas as enzimas fosfatase ácida e fosfohidrolase não sendo detectada nenhuma outra reação enzimática. Já o isolado *P. tinctorius* 1605 produziu esterase e esterase lipase além da fosfatase ácida e da fosfohidrolase mas, diferentemente de *P. tinctorius* 1603, não produziu leucina arilamidase e nem β -glucosaminidase. Para o isolado *P. tinctorius* 185 foram detectadas as exoenzimas esterase lipase, fosfatase ácida e fosfohidrolase. *Rhizopogon* sp, diferentemente do isolado anterior, não produziu esterase lipase e sim esterase além da fosfatase ácida e fosfohidrolase.

As enzimas fosfatase ácida e fosfohidrolase foram observadas em todos os isolados testados, mas apresentaram níveis diferentes de atividade. A produção de esterase, esterase lipase e de leucina arilamidase pode ser utilizada para se diferenciar os isolados, visto que apenas *P. tinctorius* 1603 foi capaz de produzir essas enzimas conjuntamente.

O sistema API-ZYM tem sido utilizado para caracterização enzimática de diferentes microrganismos. Humble et al. (1977) utilizaram este sistema para caracterizar 81 bactérias de importância médica tais como *Streptococcus faecalis*, *S. bovis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* e *Serratia marcescens* e obtiveram, em média, 16 reações positivas. Leger et al. (1986) caracterizaram 9 isolados de fungos entomopatogênicos sendo 7 isolados de *Metarhizium anisopliae*, 1 isolado de *Beauveria bassiana* e 1 de *Verticillium lecanii* e encontraram uma média de 15 reações positivas. Para fungos fitopatogênicos, Durrands & Cooper (1988) utilizaram o sistema API-ZYM para a seleção e caracterização de mutantes de *Verticillium albo-atrum*. Schwan (1994) caracterizou 18 mutantes de *Kluyveromyces marxianus*, levedura importante no processo de fermentação de cacau e verificou que a maioria dos mutantes secretaram as mesmas enzimas que a do tipo selvagem, mas com diferentes níveis de atividade. A produção de enzimas glucanólíticas pelo micoparasita *Schizophyllum commune*, cultivado isoladamente ou na presença do fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani*, foram analisadas pelo sistema API-ZYM (Chiu & Tzean, 1995). Esses autores não verificaram diferenças para a produção das enzimas α -manosidase, α e β -galactosidase, β -glicosidase e β -glucuronidase por *S. commune* quando cultivado em cultura pura ou quando cultivado junto com *R. solani*.

Os resultados observados neste trabalho indicam que este sistema pode ser utilizado para a verificação do potencial enzimático de fungos ectomicorrízicos, como uma análise complementar para a caracterização de isolados. A produção de esterases e de leucina arilamidase devem ser observadas na diferenciação destes isolados.

4.5. Caracterização dos isolados de *P. tinctorius* e de *Rhizopogon* sp pelo padrão isoenzimático de esterases

O padrão isoenzimático de α -esterase produzida intra e extracelularmente pelos isolados de *P. tinctorius* 1603, 1604, 1605 e 185 e por *Rhizopogon* sp foi analisado em gel nativo de poliacrilamida colorido com Fast blue RR (**Figura 15**).

Todos os isolados testados apresentaram atividade esterásica no micélio (intracelularmente). O isolado *P. tinctorius* 1603 apresentou 3 isoenzimas com MR (mobilidade relativa) de 0,31 (banda IV), 0,38 (banda V) e 0,45 (banda VII), sendo esta última banda a de maior intensidade. O isolado *P. tinctorius* 1604 também apresentou 3 isoenzimas semelhantes às do isolado *P. tinctorius* 1603, mas a banda IV (MR 0,31) apresentou uma intensidade maior do que aquela observada no isolado *P. tinctorius* 1603. O isolado *P. tinctorius* 1605 também apresentou 3 isoenzimas com bandas de baixa intensidade e com MR de 0,16 (banda I), 0,23 (banda II) e 0,45 (banda VII). Já o isolado *P. tinctorius* 185, obtido de *Pinus* sp, apresentou 4 isoenzimas com MR de 0,16 (banda I), 0,23 (banda II), 0,43 (banda VI) e 0,45 (banda VII), sendo que esta última foi a de maior intensidade. O fungo *Rhizopogon* sp, também obtido de *Pinus* sp, apresentou 6 isoenzimas de esterase sendo que a banda de maior intensidade apresentou MR 0,31 (banda IV). As demais bandas apresentaram MR de 0,16; 0,23; 0,26; 0,45 e 0,53.

O padrão isoenzimático de esterase presente em filtrado das culturas permitiu a visualização de bandas apenas nos isolados de *P. tinctorius* 1603 e 185. O isolado *P. tinctorius* 1603 apresentou 3 isoenzimas com MR de 0,16 (banda I), 0,23 (banda II) e 0,31 (banda IV), todas de mesma intensidade. O isolado *P. tinctorius* 185 apresentou apenas 1 isoenzima de esterase extracelular com MR 0,16 (banda I). Estes resultados encontrados em eletroforese de gel nativo de poliacrilamida, praticamente confirmam os resultados obtidos para esterase pelo sistema API-ZYM com relação aos

isolados *P. tinctorius* 1603 e 185 indicando que nestes casos, o fungo produz esterase extracelularmente. Essa semelhança de resultados também se verifica para o isolado *P. tinctorius* 1604, que não mostrou atividade de esterase tanto no gel nativo de poliacrilamida quanto no sistema API-ZYM. Para *P. tinctorius* 1605 e *Rhizopogon* sp, ao contrário do sistema API-ZYM onde apresentaram a atividade de pelo menos um tipo de esterase, na eletroforese a α -esterase não foi detectada, podendo-se supor que se encontravam em baixa concentração no filtrado das culturas utilizado.

O sistema isoenzimático de esterase permitiu estabelecer diferenças entre as espécies de *P. tinctorius* e entre os gêneros *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp. A diferença entre isolados pode ser demonstrada pelos padrões isoenzimáticos de uma enzima (Kephart, 1990). Muitas enzimas fúngicas apresentam mais de um tipo de isoenzima (Zhu et al., 1988) e isto tem sido utilizado na caracterização de fungos micorrízicos. Ho (1987) utilizando eletroforese em gel de amido encontrou 5 isoenzimas de fosfatase ácida em 8 isolados de *P. tinctorius*.

Utilizando eletroforese em gel nativo de poliacrilamida, Cao & Crawford (1993b) encontraram 5 diferentes isoenzimas de esterase para o isolado *P. tinctorius* S370, 3 para *P. tinctorius* S471 e 2 para os isolados *P. tinctorius* SMF e S351. Keller (1992) utilizando eletroforese em gel de amido, comparou as espécies *Suillus plorans*, *S. placidus* e *S. sibiricus*, obtidos de basidiocarpos coletados em *Pinus cembra*. Além do padrão de esterase, foram comparados também os padrões isoenzimáticos de mais 9 enzimas (fosfatases ácida e alcalina, alanina aminopeptidase, leucina aminopeptidase, hexoquinase, aspartato aminotransferase, malato desidrogenase, fosfoglucose isomerase e fosfoglucomutase). O autor concluiu que as espécies de *Suillus* podem ser caracterizadas e diferenciadas pelo padrão enzimático das enzimas analisadas.

Em fungos endomicorrízicos a identificação era feita quase que exclusivamente por características morfológicas dos esporos formados nos

solos ou nas raízes. Atualmente a análise através de padrões isoenzimáticos tem sido empregada na caracterização destes fungos. Sen & Hepper (1986) caracterizaram 6 espécies de *Glomus* (*G. caledonium*, *G. clarum*, *G. mosseae*, *G. epigaeum*, *Glomus* sp isolado Danish e *Glomus* sp E2) por eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de 6 enzimas (esterase, glutamato oxaloacetato transaminase, hexoquinase, malato desidrogenase, peptidase e fosfoglucomutase). Os autores concluíram que as 6 espécies de *Glomus* podem ser separadas pelos padrões isoenzimáticos das enzimas testadas e que o padrão de esterase pode ser utilizado para a confirmação de espécies de *Glomus*. Maluf et al. (1989) também analisaram diferentes espécies de *Glomus* (*G. etunicatum*, *G. leptotichum*, *G. macrocarpum* e *G. intraradices*), *Gigaspora margarita*, *Scutelospora heterogama*, *Acaulospora morroew*, *A. apendiculata* e *Entrophospora* sp através dos padrões enzimáticos de esterase, peroxidase, catalase, glutamato oxaloacetato transaminase, álcool desidrogenase e malato desidrogenase. Dos sistemas analisados, foi possível detectar somente atividade de esterase para *Gigaspora margarita* (MR 0,62 e 0,57) e para *S. heterogama* (MR 0,16 e 0,26).

4.6. Atividade celulolítica na associação ectomicorrízica

4.6.1. Formação das ectomicorrizas

Pela análise visual, foi possível detectar a formação de ectomicorrizas aos 10 dias após a inoculação (**Figura 16**). No isolado *P. tinctorius* 1604 observou-se a formação de manto fúngico denso com coloração amarelo-mostarda, presença de micélio extramatricial e raízes mais grossas e curtas em todo o sistema radicular. Em plântulas inoculadas com *P. tinctorius* 185, poucos ápices radiculares apresentavam-se com início de formação do manto fúngico e do micélio extramatricial. Nas plântulas testemunhas, o sistema radicular apresentava-se com aspecto normal, isto é, raízes longas,

finas, presença de pelos radiculares e ausência de qualquer tipo de micélio fúngico.

Apesar de visualmente as ectomicorrizas terem sido observadas somente após 10 dias, quando se utilizou a técnica do ergosterol foi possível detectar biomassa fúngica associada às raízes, já com 12 horas após a inoculação (**Figura 17**), evidenciando o início da formação micorrízica tanto em plântulas inoculadas com *P. tinctorius* 1604 quanto com *P. tinctorius* 185. Entretanto, a quantidade de micélio de *P. tinctorius* 185 foi menor do que a de *P. tinctorius* 1604, indicando menor colonização pelo primeiro. Aos 10 dias, a biomassa fúngica presente em ectomicorrizas formadas por *P. tinctorius* 1604 foi 3,5 vezes maior do que na ectomicorriza formada por *P. tinctorius* 185, mostrando que o isolado 1604 apresentou maior compatibilidade com a planta hospedeira do que o isolado 185. Isto confirma os resultados encontrados por Malajczuk et al. (1990) que verificaram que os isolados de *P. tinctorius* coletados de *Eucalyptus* sp colonizaram mais rapidamente as raízes de *E. urophylla* do que os isolados de *P. tinctorius* coletados de *Pinus* sp.

Pela análise em microscopia eletrônica de varredura foi possível observar a presença de pontos de penetração do fungo nas raízes de *E. urophylla* 12 horas após a inoculação com *P. tinctorius* 1604 (**Figura 18**), havendo formação de manto típico, ou seja, com raízes enoveladas pelas hifas de forma compacta e coesa, aos 10 dias (**Figura 19**). Nas plântulas inoculadas com *P. tinctorius* 185, os pontos de penetração foram observados somente após 2 dias da inoculação (**Figura 20**), ocorrendo no 10º dia um enovelamento das raízes mas sem a formação do manto típico. Nas plântulas testemunhas (**Figura 21**) não foi observada a presença de qualquer tipo de micélio fúngico.

4.6.2. Atividade celulolítica

A atividade de endo β -1,4 glucanase em raízes de *E. urophylla* foi detectada já com 12 horas após a inoculação com *P. tinctorius* 1604, e

apresentou um valor, aproximadamente 3 vezes maior do que o encontrado nas plântulas não inoculadas (testemunhas) (**Figura 22A**). Após este período, a atividade decresceu gradativamente até os 10 dias após a inoculação, chegando a níveis próximos de zero (ausência de atividade). Este aumento na atividade nas primeiras 12 horas pode indicar que a enzima celulolítica, de alguma maneira, atua nos estágios iniciais da micorrização (penetração), visto que após o estabelecimento da associação, isto é, a formação do manto fúngico aos 10 dias, a atividade praticamente não existe. No caso de plântulas inoculadas com *P. tinctorius* 185 ocorreu uma queda da atividade com 12 horas. A maior atividade foi observada 24 horas após a inoculação, tempo que, pela técnica do ergosterol, também se registrou um aumento na biomassa fúngica. Após este período, ocorreu um decréscimo gradativo na atividade enzimática até o 10^o dia. Possivelmente, o aumento na atividade após 12 ou 24 horas, nas ectomicorrizas de *P. tinctorius* 1604 e 185 respectivamente, seja devido à produção da enzima pela hifa fúngica no local de penetração na raiz da planta hospedeira, na tentativa de hidrolizar a celulose presente na parede celular. O atraso para o início da penetração em *P. tinctorius* 185 pode ser devido a algum fator de reconhecimento ou à demora em ativar o mecanismo de indução da celulase por este fungo. Em plântulas não inoculadas (testemunhas) ocorreu um aumento de atividade com 24 horas (1 dia) e com 6 dias. É possível que nestes períodos tenha ocorrido crescimento e desenvolvimento (diferenciação) celular do sistema radicular, fenômenos estes que vêm acompanhados de um aumento nos níveis de auxina na planta, associados com acréscimos na atividade de enzimas como as celulases e pectinases (Dietrich, 1986).

A produção de exo β -1,4 glucanase (**Figura 22B**) também foi verificada nas primeiras 12 horas após a inoculação com *P. tinctorius* 1604 apresentando um valor 4 vezes maior do que o encontrado para a testemunha. Após este período, semelhante ao que ocorreu com a endoglucanase, houve uma redução gradativa na atividade, levando a supor que a enzima somente é

produzida para a penetração da hifa fúngica (“peg” de penetração) no hospedeiro, para posteriormente ocorrer a formação da rede de Hartig. Em plântulas inoculadas com o isolado 185, ocorreu uma queda na atividade enzimática nas 12 primeiras horas após a inoculação, período após o qual ocorreu um aumento nos valores atingindo o máximo no 2^o dia. Em seguida, esta atividade apresentou uma redução, aumentando novamente aos 10 dias após a inoculação, possivelmente devido ao surgimento de novos pontos de penetração, embora a atividade de endoglucanase (Figura 22A) não tenha sofrido aumento neste período. Nas raízes de plântulas não inoculadas houve uma queda na atividade de exoglucanase até o 2^o dia sendo que após este período os valores aumentaram atingindo níveis superiores aos das plântulas inoculadas. Este aumento deve-se, possivelmente, ao surgimento de novas raízes que ocasiona um aumento nos níveis hormonais e enzimáticos para o crescimento e diferenciação.

A atividade de β -glicosidase (**Figura 22C**) foi evidente em raízes inoculadas com *P. tinctorius* 1604 decorridas 12 horas da inoculação, apresentando neste tempo o maior valor. Em seguida, ocorreu uma redução nos valores até o 2^o dia, para então aumentar novamente. Dessa forma, a maior atividade foi verificada nas primeiras horas após à inoculação, no início da micorrização, levando a supor que para ocorrer a penetração da hifa fúngica é necessário que o fungo simbiote produza enzimas celulolíticas. Com relação ao isolado 185, a atividade de β -glicosidase decresceu nas primeiras horas após a inoculação e apresentou o maior valor somente depois de 2 dias. Após este período ocorreu uma redução e novo aumento aos 10 dias. Já nas plântulas não micorrizadas (testemunhas), a maior atividade foi com 12 horas, mas com níveis inferiores aos das plântulas inoculadas com *P. tinctorius* 1604. Em seguida, ocorreu também uma redução na atividade enzimática com novo aumento aos 6 dias após a inoculação. Os níveis de β -glicosidase em raízes não micorrizadas foram sempre inferiores aos de raízes micorrizadas com *P.*

tinctorius 1604, o que não se verificou em relação à raízes inoculadas com o isolado 185.

A atividade de endo β -1,4 glucanase, exo β -1,4 glucanase e β -glicosidase foi sempre superior em plântulas inoculadas com *P. tinctorius* 1604, em relação ao isolado 185 e às plantas não inoculadas, e esta maior atividade ocorreu nas primeiras 12 horas após a inoculação. Por estes resultados pode-se notar que as enzimas celulolíticas estão, provavelmente, envolvidas nos estágios iniciais da micorrização. No sistema incompatível - *E. urophylla* x *P. tinctorius* 185 - a primeira enzima a ser produzida foi a endo β -1,4 glucanase, após 24 horas (1 dia) da inoculação sendo que exo β -1,4 glucanase e β -glicosidase somente foram detectadas a partir do 2º dia. Em plântulas não inoculadas as enzimas celulolíticas estariam presentes durante as fases de crescimento e desenvolvimento das células do sistema radicular.

Vários estudos têm sido desenvolvidos para entender as relações simbióticas no que se refere aos aspectos determinantes de compatibilidade e incompatibilidade entre os simbiossiontes envolvidos. Malajczuk et al. (1984) compararam ultraestruturas de raízes de *Eucalyptus* sp inoculadas com fungos ectomicorrízicos compatíveis (*Hydnangium carneum*) e incompatíveis (*Rhizopogon* sp e *Suillus lakei*). Tais autores observaram que em ambos os sistemas ocorria o estabelecimento dos fungos na rizosfera e o início de formação do manto, o que sugeria um estímulo não específico para os fungos ectomicorrízicos. Entretanto, o manto formado pelos fungos incompatíveis era constituído por poucas camadas de hifas e não era rígido, ao contrário do manto formado pelo fungo compatível que era rígido e apresentava 5 a 10 camadas de hifas. Esses pesquisadores verificaram também um acúmulo maior de compostos fenólicos (taninos) nas células do hospedeiro quando na presença do simbionte incompatível, levando à suposição de que a presença destes taninos poderia estar envolvida na reação da planta aos fungos micorrízicos dentro da raiz. Ling-Lee et al. (1977) mostraram que taninos eram

produzidos tanto em raízes micorrizadas quanto em raízes não micorrizadas de eucalipto, mas a maior concentração dessa substância encontrava-se nas primeiras. Esses autores sugeriram que a formação de taninos poderia ser uma reação da planta ao fungo simbiote. Estes compostos fenólicos já haviam sido relatados como uma reação do tecido da planta hospedeira à invasão por fitopatógenos (Kúc, 1972) e possivelmente são importantes em determinar o grau de compatibilidade entre fungo simbiote e planta hospedeira (Molina, 1979, 1981; Molina & Trappe, 1982). Mais recentemente, pesquisas mostraram a formação de proteínas relacionadas a simbiose ou ectomicorrizas, que seriam formadas na fase de reconhecimento e nos estágios iniciais da micorrização e que levaria ou não a uma associação simbiótica bem sucedida (Hilbert & Martin, 1988). A formação de ectomicorrizas foi estudada nos estágios iniciais de micorrização em *Eucalyptus globulus* subsp. *bicostata* utilizando isolados compatíveis e incompatíveis de *P. tinctorius* (Hilbert et al., 1991; Hilbert & Martin, 1988). O isolado compatível foi obtido de basidiocarpo coletado sob *E. citriodora* e o incompatível em *Pinus taeda*. As mudanças na composição de polipeptídeos foram observadas em poucas horas após a inoculação (24 h) com o isolado compatível, verificando neste estágio a presença de ectomicorrizas. Um maior acúmulo de hifas ao redor da raiz ocorreu entre 24 e 48 h após a inoculação. No isolado incompatível, durante este mesmo período não se observou qualquer contato das hifas com a superfície da raiz nem tampouco a formação de ectomicorrizas, levando à suposição de que a simbiose diferencial entre isolados de *P. tinctorius* pode estar relacionada à produção dessas proteínas. Entretanto, os fenômenos de reconhecimento e os mecanismos tanto mecânicos quanto enzimáticos, envolvidos na penetração da hifa na epiderme e subsequentemente no córtex da planta hospedeira, não estão ainda bem definidos.

Em fungos fitopatogênicos, o envolvimento de enzimas hidrolíticas (celulases, pectinases e hemicelulases) na penetração no hospedeiro tem sido bem documentado (Collmer & Keen, 1986). Em patógenos

biotróficos, por exemplo, o processo de infecção é caracterizado por uma produção baixa e regulada de enzimas hidrolíticas pelos fungos. Foi verificado que durante a infecção por *Uromyces viciae-fabae*, celulasas ácidas eram as primeiras a serem produzidas, seguidas pela produção de pectina esterase, celulasas neutras e poligalacturonase liase (Mendgen & Deising, 1993).

Em fungos micorrízicos arbusculares tem-se verificado a produção de pequena quantidade de enzimas degradadoras de parede celular, tais como celulasas e pectinases. A produção destas enzimas hidrolíticas por *Glomus mosseae* demonstra o possível envolvimento das mesmas no processo de infecção, como sugerido por observações ao microscópio eletrônico feitas por Kinden & Brown (1975). A presença destas mesmas enzimas em extratos de esporos de *G. mosseae* sugere que tanto as celulasas quanto as hemicelulasas podem estar envolvidas na penetração de fungos micorrízicos na planta hospedeira (Garcia-Romera et al., 1990). Garcia-Garrido et al. (1992a, b) estudaram a produção de endoglucanase e exoglucanase durante a penetração e desenvolvimento do fungo micorrízico arbuscular *G. mosseae* em raízes de alface e de cebola. Os autores verificaram um aumento na atividade destas enzimas no início da formação do ponto de penetração e desenvolvimento de arbúsculos, sugerindo mais uma vez, a participação de enzimas hidrolíticas no estabelecimento da simbiose. Porém, nenhuma relação foi encontrada entre o número de vesículas formadas e a atividade de endo e exoglucanase. Bonfante & Perotto (1995) concluíram que na associação endomicorrízica arbuscular, o fungo coloniza a planta hospedeira por meio de uma combinação de mecanismos enzimáticos e mecânicos. Uma baixa e localizada produção de enzimas assegura que a viabilidade do hospedeiro seja mantida, que respostas de defesa não sejam acionadas e que um alto grau de compatibilidade seja obtido.

Para fungos ectomicorrízicos, nada é conhecido sobre a produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas na associação com plantas hospedeiras (Dahm & Strzelczyk, 1995). O que se conhece é a capacidade que

alguns fungos ericóides e ectomicorrízicos têm de produzir enzimas degradadoras da parede celular em culturas *in vitro* (Giltrap & Lewis, 1982; Cao & Crawford, 1993b).

4.6.3. Caracterização parcial das enzimas celulolíticas na associação ectomicorrízica

Os extratos de raízes de plântulas de *E. urophylla* inoculadas com os isolados compatível (1604) e incompatível (185) de *P. tinctorius*, bem como as plântulas não inoculadas, foram coletadas em diferentes tempos e analisadas por cromatografia de filtração em gel.

O número de isoenzimas celulolíticas diferiu entre as plântulas micorrizadas e não micorrizadas. As plântulas não inoculadas (**Figura 23**) apresentaram 4 isoenzimas de endoglucanases nos tempos 0 (zero) e 1/2 dia (12 horas); 3 isoenzimas após 1 dia (24 horas) e 2 isoenzimas aos 2, 6 e 10 dias de amostragem, com massas moleculares relativos (MM) variando de 5,2 kDa a 40,0 kDa (**Tabela 4**). Nas raízes micorrizadas com *P. tinctorius* 1604 (**Figura 23**) ocorreu uma redução no número de isoenzimas quando comparadas com as plântulas testemunhas. A partir de 1/2 dia (12 horas) após a inoculação, foram observadas 2 isoenzimas de endoglucanase com MM variando nos diferentes tempos: 7,0 kDa a 11,0 kDa em 1/2 e 1 dia; 5,2 kDa a 11,0 kDa no 2^o dia e 4,9 kDa a 7,0 kDa no 6^o e 10^o dia após a inoculação (**Tabela 4**). Nas plântulas inoculadas com *P. tinctorius* 185 (**Figura 23**), foram observadas 2 isoenzimas de endoglucanases até o 6^o dia após a inoculação. No 10^o dia observou-se apenas 1 isoenzima com MM de 5,2 kDa (**Tabela 4**).

O número e o MM de isoenzimas de exoglucanase também variou entre as plântulas micorrizadas e não micorrizadas. As plântulas testemunhas (**Figura 24**) apresentaram 4 isoenzimas no tempo zero (início das amostragens), 3 isoenzimas após 1/2 e 1 dia e 2 isoenzimas nos demais

tempos de observação (2, 6 e 10 dias). As MM estão representados na Tabela 4. Na raízes inoculadas com *P. tinctorius* 1604 (Figura 24) ocorreu uma redução no número de isoenzimas de exoglucanase. Foram observadas apenas 1 isoenzima com MM de 13,0 kDa em 1/2 e 1 dia após a inoculação e outro com 11,0 kDa nos demais tempos. Em plântulas inoculadas com *P. tinctorius* 185 (Figura 24) também ocorreu uma redução no número das isoenzimas mas este número foi maior do que o observado para o sistema *P. tinctorius* 1604 x *E. urophylla* e semelhante ao apresentado pelas plântulas testemunhas. As MM calculadas variaram entre 4,5 kDa e 11,0 kDa (Tabela 4).

Para β -glicosidase, as plântulas não inoculadas (**Figura 25**) apresentaram 3 isoenzimas nos períodos de 0, 1/2 e 1 dia e 2 isoenzimas para os demais tempos estudados. As MM variaram de 4,9 kDa a 40,0 kDa (Tabela 4). Nas plântulas inoculadas com *P. tinctorius* 1604 (Figura 25) ocorreu basicamente o mesmo número de isoenzimas observadas nas plântulas testemunhas e as MM também variaram de 4,9 kDa a 40,0 kDa, mas a atividade enzimática foi maior. Nas plântulas inoculadas com *P. tinctorius* 185 (Figura 25) foram observadas 3 isoenzimas e este número permaneceu constante em todos os períodos. A atividade enzimática foi menor do que nas raízes inoculadas com *P. tinctorius* 1604, com exceção do 10^º dia que apresentou maior valor.

Pelos resultados encontrados pode-se observar que algumas isoenzimas apresentaram a mesma MM em plantas micorrizadas e não micorrizadas. Por exemplo, em plântulas inoculadas com *P. tinctorius* 1604, 1 isoenzima de endoglucanase com MM 4,9 kDa, que estava presente na associação, não foi observada nas plântulas testemunhas; as isoenzimas de exoglucanase apresentaram MM distintos das encontradas nas testemunhas e 1 isoenzima de β -glicosidase com 5,2 kDa foi observada em plântulas micorrizadas, mas não estava presente nas não micorrizadas. Para as plântulas inoculadas com *P. tinctorius* 185 também se observaram isoenzimas

com MM distintas das plântulas testemunhas: 2 isoenzimas de endoglucanase com MM de 5,2 e 8,8 kDa; 3 isoenzimas de exoglucanase com MM de 6,4, 8,8 e 11,0 kDa e 2 isoenzimas de β -glicosidase com MM de 6,4 e 11,0 kDa. Os resultados mostram também que ocorreu uma redução no número de isoenzimas quando o fungo simbiote estava associado ao hospedeiro. Esta redução enzimática foi mais evidente para as isoenzimas de exoglucanase nas plântulas inoculadas com *P. tinctorius* 1604, sugerindo que na associação compatível, o fungo simbiote poderia reprimir a exoglucanase produzida pela planta hospedeira.

Nada se conhece sobre o envolvimento de enzimas celulolíticas na associação ectomicorrízica. Os estudos realizados são desenvolvidos com fungos micorrízicos arbusculares e sugerem a participação destas enzimas na penetração e colonização da planta hospedeira. Em alface e cebola colonizadas por *Glomus mosseae*, várias bandas eletroforéticas de endoglucanase observadas em plantas com 35 dias de idade não estavam presentes em plantas não micorrizadas. Os autores sugeriram que algumas destas isoenzimas poderiam ser produzidas pelo fungo dentro das raízes ou pelas raízes após a indução pelo simbiote (Garcia-Garrido et al., 1992a). Garcia-Garrido et al. (1992a, b) estudaram a atividade de endoglucanase na colonização de raízes de alface por *Glomus fasciculatum* e observaram, por eletroforese em gel nativo de poliacrilamida que as bandas eletroforéticas diferiram entre plantas micorrizadas e não micorrizadas e que algumas bandas mostraram a mesma mobilidade relativa. O número de isoenzimas de endoglucanase também variou com a idade da planta. Em plantas não inoculadas com 15 dias de idade foram observadas 3 isoenzimas, aos 30 dias observou-se 4 isoenzimas e com 50 e 80 dias de idade, 3 isoenzimas. Em plantas micorrizadas foram observadas 4 isoenzimas aos 15 dias de idade, 12 isoenzimas aos 30 dias e 9 isoenzimas aos 50 e 80 dias de idade. Diante da presença em plantas micorrizadas de bandas diferentes daquelas observadas

em raízes não micorrizadas ou no micélio externo, os autores concluíram que a atividade de endoglucanase poderia ser induzida pelo fungo na planta.

Os resultados encontrados com a inoculação de *P. tinctorius* 1604 e 185 em plântulas de *E. urophylla*, indicam que as enzimas celulolíticas podem estar envolvidas no estabelecimento diferencial da associação ectomicorrízica, como é sugerido também para outras associações simbióticas (Morales et al., 1984; Garcia-Garrido et al., 1992a, b).

Figura 5 - Efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento micelial de fungos micorrízicos. *F. tinctorius* (P.t.) 1603 (A), *P.t.* 1604 (B), *P.t.* 1605 (C), isolados de *Eucalyptus*; *P.t.* 185 (D) e *Rhizopogon* sp (E), isolados de *Pinus*. Fungos crescidos em meio MNM + 0,3% de extrato de levedura + 1% do carboidrato de interesse. Controle: MNM + 0,3% de extrato de levedura.

Figura 6 - Produção de **exo β-1,4 glucanase** por *P. tinctorius* (*P.t.*) 1603 (**A**), *P.t.* 1604 (**B**), *P.t.* 1605 (**C**), isolados de *Eucalyptus*; *P.t.* 185 (**D**) e *Rhizopogon* sp (**E**), isolados de *Pinus*. Fungos cultivados em meio MNM acrescido de celulose microcristalina 1% (Avicel), como fonte de carbono. Atividade enzimática determinada por método espectrofotométrico indireto, tendo Avicel como substrato. As barras indicam o erro padrão da média. Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

Figura 7 - Produção de endo β -1,4 glucanase por *P. tinctorius* (*P.t.*) 1603 (A), *P.t.* 1604 (B), *P.t.* 1605 (C), isolados de *Eucalyptus*; *P.t.* 185 (D) e *Rhizopogon* sp (E), isolados de *Pinus*. Fungos cultivados em meio MNM acrescido de celulose nativa 0,5% (CN) e CN + glicose (0,1%), como fontes de carbono. Atividade enzimática determinada por método espectrofotométrico indireto, tendo carboximetilcelulose (CMC) como substrato. As barras indicam o erro padrão da média. (●) CN; (○) CN + glicose. Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

Figura 8 - Produção de endo β -1,4 glucanase por *P. tinctorius* (P.t.) 1603 (A), *P.t.* 1604 (B), *P.t.* 1605 (C), isolados de *Eucalyptus*; *P.t.* 185 (D) e *Rhizopogon* sp (E), isolados de *Pinus*. Fungos cultivados em meio MNM acrescido de carboximetilcelulose (CMC) 1% e CMC + glicose (0,1%), como fontes de carbono. Atividade enzimática determinada por método espectrofotométrico indireto, tendo CMC como substrato. As barras indicam o erro padrão da média. (■) CMC; (□) CMC + glicose. Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

Figura 9 - Produção de β -glucosidade por *P. tinctorius* (P.t.) 1603 (A), *P.t.* 1604 (B), *P.t.* 1605 (C), isolados de *Eucalyptus*; *P.t.* 185 (D) e *Rhizopogon* sp (E), isolados de *Pinus*. Fungos cultivados em meio MNM acrescido de celobiose 1%, como fonte de carbono. Atividade enzimática determinada por método espectrofotométrico indireto, tendo p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato. As barras indicam o erro padrão da média. Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

Figura 10 - Produção de xilanase por *P. tinctorius* (*P.t.* 1603 (A), *P.t.* 1604 (B), *P.t.* 1605 (C), isolados de *Eucalyptus*; *P.t.* 185 (D) e *Rhizopogon* sp (E), isolados de *Pinus*. Fungos cultivados em meio MNM acrescido de carboximetilcelulose (CMC) 1%, como fonte de carbono. Atividade enzimática determinada por método espectrofotométrico indireto, tendo xilana carboximetilada marcada com remazol brilhante azul ("CM-xylan-RBB"), como substrato. As barras indicam o erro padrão da média. Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

Figura 11 - Separa\u00e7\u00e3o em Sephacryl S-100 HR de endo β -1,4 glucanases de *P. tinctorius* (*P.t.*) 1603 (A); *P.t.* 1604 (B); *P.t.* 1605 (C); *P.t.* 185 (D) e *Rhizopogon* sp (E) a partir de 1,0 ml de filtrado concentrado (x40) e dialisado de meio de cultura MNM com carboximetilcelulose (CMC) 1%, como fonte de carbono. As fra\u00e7\u00f5es (1,6 ml) foram coletadas e analisadas por m\u00e9todo espectrofotom\u00e9trico indireto, tendo (CMC) como substrato. Isoenzimas indicadas por algarismos romanos.

Figura 12 - Separação em Sephacryl S-100 HR de exo β-1,4 glucanases de *P. tinctorius* (*P.t.*) 1603 (A), *P.t.* 1604 (B), *P.t.* 1605 (C), *P.t.* 185 (D) e *Rhizopogon* sp (E) a partir de 1,0 ml de filtrado concentrado (x40) e dialisado de meio de cultura MNM com carboximetilcelulose (CMC) 1%, como fonte de carbono. As frações (1,6 ml) foram coletadas e analisadas por método espectrofotométrico indireto, tendo celulose microcristalina (Avicel) como substrato. Isoenzimas indicadas por algarismos romanos.

Figura 13 - Separação em Sephacryl S-100 HR de β -glicosidases de *P. tinctorius* (*P.t.*) 1603 (A), *P.t.* 1604 (B), *P.t.* 1605 (C), *P.t.* 185 (D) e *Rhizopogon* sp (E) a partir de 1,0 ml de filtrado concentrado (x40) e dialisado de meio de cultura MNM com carboximetilcelulose (CMC) 1%, como fonte de carbono. As frações (1,6 ml) foram coletadas e analisadas por método espectrofotométrico indireto, tendo p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato. Isoenzimas indicadas por algarismos romanos.

Figura 14 - Curva de calibração de coluna (23 cm x 1,6 cm) empacotada com gel Sephacryl S100-HR. Void volume determinado com *Blue dextran*. Pesos moleculares dos padrões (em kDa): bacitracina - 1,45; aprotinina - 6,5; citocromo C - 14,2; anidrase carbônica - 29,0; albumina de soro bovino - 66,0. (□) endo β -1,4 glucanase, (○) exo β -1,4 glucanase e (△) β -glicosidase de *P. tinctorius* 1603.

Figura 15 - a) Eletroforese anódica em gel nativo de poliacrilamida de extrato proteico de micélio (M) e filtrado (F) de cultura de *P. tinctorius*, isolados 1603 (A), 1604 (B), 1605 (C) e 185 (D), e de *Rhizopogon* sp (E). Gel corado com α -naftil acetato para visualização de isoenzimas de α -esterase. ig: interseção entre os géis separador e de corrida. **b)** Representação esquemática das bandas eletroforéticas obtidas. MR: mobilidade relativa.

Figura 16 - Aspecto visual da formação de ectomicorrizas em *E. urophylla*, 10 dias após a inoculação com os isolados de *P. tinctorius* 1604 (A, B e C) e 185 (D e E). (F): testemunha não inoculada. Mic: micorriza; ME: micélio extramatricial; M: manto. Valores das barras em mm.

Figura 17 - Quantidade de micélio de *P. tinctorius* isolados 1604 (-●-) e 185 (-●-) presente em raízes de *E. urophylla*. Testemunha (-●-) representada por raízes de plantas não inoculadas. Barras representam o erro padrão da média.

Figura 18 - Micrografia eletrônica de varredura de raízes de *E. urophylla* inoculadas com *P. tinctorius* 1604 (compatível). Em (A-F) (F detalhe de E) observam-se poucas hifas (H) ao redor das raízes e a presença de pontos de penetração (PP), 12 h após a inoculação. Em (G) (24 h) ocorre maior crescimento micelial e início de formação de manto em (H) (48 h). PR: pelo radicular; GC: grampo de conexão; R: raiz e EH: extremidade da hifa. Barras representam 100 µm em A, D, E, F e 10 µm em B, C, G, H.

Figura 19 - Micrografia eletrônica de varredura de raízes de *E. urophylla*, 6 dias (**A** - detalhe em **B**) e 10 dias (**C** - detalhe em **D**), após a inoculação com *P. tinctorius* 1604. Observa-se a formação de ectomicorriza (MIC), com manto típico (M) e micélio extramatricial (ME). (**E**) e (**F**): cortes transversais de ectomicorrizas com 10 dias. Barras representam 100 µm.

Figura 20. -Micrografia eletrônica de varredura de raízes de *E. urophylla* inoculadas com *P. tinctorius* 185 (incompatível). (A-B) 12 h; (C) 24 h; (D) 48 h após a inoculação. Pontos de penetração (PP) foram observados somente após 48 h (E). Em (F e G) presença de micélio extramatricial (ME) e início de formação de manto (M) aos 6 dias. (H) e (I) manto atípico formado aos 10 dias. H: hifa; PR: pelo radicular; GC: grampo de conexão. Barras representam 100 µm em A, C, D, F, H, I e 10 µm em B, E, G.

Figura 21 - Micrografia eletrônica de varredura de raízes não inoculadas de *E. urophylla* com 0 h (A), 48 h (B) e 10 dias (C). PR: pelo radicular. Barras representam 100 μ m em A, C; 10 μ m em B.

Figura 22 - Atividade de endo β -1,4 glucanase (A), exo β -1,4 glucanase (B) e β -glicosidase (C) em ectomicorizas formadas por *E. urophylla* e *P. tinctorius* isolados 1604 (●-) e 185 (●-). Testemunha não inoculada (●-). Barras representam o erro padrão da média.

Figura 23 - Separação em Sephacryl S-100 HR de **endo β -1,4 glucanase** de plântulas de *E. urophylla* não inoculadas (testemunha - $\square$), inoculadas com *P. tinctorius* 1604 ($\square$) e *P. tinctorius* 185 ($\square$), a partir de 1,0 ml de homogeneizado de raízes. As frações (1,6 ml) foram coletadas e analisadas por método espectrofotométrico indireto, tendo carboximetilcelulose (CMC) como substrato. Os tempos representam dias após as inoculações para os demais tratamentos. Isoenzimas indicadas por algarismos romanos.

Figura 24 - Separação em Sephacryl S-100 HR de **exo β -1,4 glucanase** de plântulas de *E. urophylla* não inoculadas (testemunha - $\circ$), inoculadas com *P. tinctorius* 1604 ($\circ$) e *P. tinctorius* 185 ($\circ$), a partir de 1,0 ml de homogeneizado de raízes. As frações (1,6 ml) foram coletadas e analisadas por método espectrofotométrico indireto, tendo celulose microcristalina (Avicel) como substrato. Os tempos representam dias após as inoculações para os demais tratamentos. Isoenzimas indicadas por algarismos romanos.

Figura 25 - Separa\u00e7\u00e3o em Sephacryl S-100 HR de β - **glicosidase** de pl\u00e2ntulas de *E. urophylla* n\u00e3o inoculadas (testemunha - Δ), inoculadas com *P. tinctorius* 1604 (Δ) e *P. tinctorius* 185 (Δ), a partir de 1,0 ml de homogeneizado de ra\u00edzes. As fra\u00e7\u00f5es (1,6 ml) foram coletadas e analisadas por m\u00e9todo espectrofotom\u00e9trico indireto, tendo *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranos\u00eddeo como substrato. Os tempos representam dias ap\u00f3s as inocula\u00e7\u00f5es para os demais tratamentos. Isoenzimas indicadas por algarismos romanos.

Tabela 2. Massa molecular relativa de isoenzimas de endo β -1,4 glucanase, exo β -1,4 glucanase e β -glicosidase, produzidos *in vitro* por isolados de *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp*.

Isolados	Massa molecular (kDa)		
	Endo β -1,4 glucanase	Exo β -1,4 glucanase	β -glicosidase
<i>P.t.</i> 1603	35,5	35,5	35,5
	27,0	17,5	7,0
	11,0	7,0	5,2
	7,0	4,9	
	4,9		
<i>P.t.</i> 1604	6,4	52,0	6,4
	4,9	16,0	3,1
	3,7	11,0	
		6,4	
		4,9	
<i>P.t.</i> 1605	52,0	7,0	25,0
	11,0	5,1	
<i>P.t.</i> 185	25,0	17,5	13,0
	17,0	7,0	3,2
	13,0		
	7,0		
	5,6		
<i>Rhizopogon</i> sp	52,0	3,2	36,0
	36,0		22,5
	22,5		17,5

* Massas moleculares obtidas com base na curva de calibração representada na Figura 14

TABELA 3. Avaliação da atividade enzimática pelo teste API-ZYM de filtrado de culturas de isolados de *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp. As enzimas avaliadas nos locais de reação numerados de 1 a 20 (número 1 equivale ao controle, sem substrato) estão especificadas na Tabela 1. Os valores de 0 a 5 representam as notas aplicadas a cada reação, conforme escala de cores do fabricante (Apêndice 4). A coloração resultante indica a presença ou não de atividade enzimática, enquanto que a intensidade da cor quantifica o produto formado.

	Notas aplicadas*																			
	Locais de reação:																			
Fungos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>P. tinctorius</i> 1603	0	0	1	1	0	3	0	0	0	0	5	3	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>P. tinctorius</i> 1604	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. tinctorius</i> 1605	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. tinctorius</i> 185	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhizopogon</i> sp	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0

* 0 = sem atividade (coloração igual à do controle ou local de reação 1); os valores 1 a 5 correspondem à 5, 10, 20, 30 e ≥ 40 nanomoles de substrato hidrolizado, respectivamente.

TABELA 4. Massa molecular relativa de isoenzimas de endo β -1,4 glucanase, exo β -1,4 glucanase e β -glicosidase de raízes de plântulas de *E. urophylla* não inoculadas (testemunha) e inoculadas com *P. tinctorius* (isolados 1604 e 185)*.

Tempo (dias)	Massas moleculares (kDa)		
	Endo β -1,4 glucanase	Exo β -1,4 glucanase	β -glicosidase
Testemunha			
0	5,2 - 7,0 - 35,5 - 40,0	5,2 - 7,0 - 35,5 - 40,0	8,8 - 13,0 - 40,0
1/2	5,2 - 7,0 - 11,0 - 40,0	4,5 - 9,2 - 40,0	4,9 - 8,8 - 40,0
1	7,0 - 11,0 - 40,0	5,2 - 12,5 - 40,0	4,9 - 8,8 - 40,0
2	7,0 - 11,0	7,0 - 9,1	8,8 - 40,0
6	7,0 - 11,0	4,5 - 9,1	8,8 - 40,0
10	7,0 - 11,0	7,0 - 9,1	7,0 - 40,0
<i>E.u X P.t. 1604</i>			
0	5,2 - 7,0 - 35,5 - 40,0	5,2 - 7,0 - 35,5 - 40,0	8,8 - 13,0 - 40,0
1/2	7,0 - 11,0	13,0	4,9 - 8,8 - 40,0
1	7,0 - 11,0	13,0	4,9 - 8,8
2	5,2 - 11,0	11,0	5,2 - 8,8
6	4,9 - 7,0	11,0	4,9 - 8,8
10	4,9 - 7,0	11,0	4,9 - 8,8
<i>E.u X P.t. 185</i>			
0	5,2 - 7,0 - 35,5 - 40,0	5,2 - 7,0 - 35,5 - 40,0	8,8 - 13,0 - 40,0
1/2	40,0 - 11,0	6,4 - 8,8 - 11,0	6,4 - 8,8 - 40,0
1	8,8 - 11,0	4,9 - 6,4	4,9 - 8,8 - 40,0
2	5,2 - 11,0	4,9 - 6,4	4,9 - 7,0 - 40,0
6	5,2 - 11,0	4,9 - 6,4	4,9 - 7,0 - 9,2
10	5,2	4,5 - 6,4	4,9 - 11,0 - 40,0

* Massas moleculares obtidas com base na curva de calibração representada na Figura 14.

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos pôde-se concluir que:

1) Os isolados de *P. tinctorius*, obtidos em *Eucalyptus* e em *Pinus*, podem ser diferenciados quanto: a utilização de fontes de carbono através do crescimento micelial; ao padrão eletroforético de α -esterase; ao sistema API-ZYM e a produção de enzimas celulolíticas e xilanase.

2) As enzimas celulolíticas devem estar envolvidas nos estágios iniciais da micorrização e possivelmente no maior grau de compatibilidade do isolado *Pisolithus tinctorius* 1604 com a planta hospedeira, o que é evidenciado pela formação do manto e maior micorrização com base no conteúdo de ergosterol e observações em microscopia eletrônica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, M.B.D. Atividade celulolítica e protoplastização em *Humicola* sp e *Trichoderma pseudokoningii* var. Rifai. Piracicaba, 1991. 112 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 242p.
- ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L. The extraction and quantification of ergosterol from ectomycorrhizal fungi and roots. **Mycorrhiza**, v. 3, p.137-144, 1993.
- ARAÚJO, E.F.; BARROS, E.G.; CALDAS, R.A.; SILVA, D.O. β -glucosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus *Humicola* sp. **Biotechnology Letters**, v. 5, p. 781-84, 1983.
- BACH, E.E. Comparação morfológica, patogênica, serológica e eletroforética de *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs, isolado de milho, sorgo e capim massambará. Piracicaba, 1991. 137p. Dissertação (M.S) -Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- BAE, K-S.; BARTON, L.L. Alkaline phosphatase and other hydrolases produced by *Cenococcum graniforme*, an ectomycorrhizal fungus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2511-16, 1989.
- BAKER, C.J.; WHALEN, C.H.; BATEMAN, D.F. Xylanase from *Trichoderma pseudokoningii*: purification, characterization, and effects on isolated plant cell walls. **Phytopathology**, v. 67, n. , p. 1250-58, 1977.
- BERGHEM, L.E.; PETTERSSON, L.G. The mechanism of enzymatic cellulose degradation and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma viride*. **European Journal Biochemistry**, v. 46, p. 295-305, 1974.
- BIELY, P; MISLOVICOVÁ, D.; TOMAN, R. Remazol Brilliant Blue - Xylan: A soluble Chromogenic Substrate for Xylanases. In: WOOD, W. A. & KELLOGG, S. T. (Eds). **Methods in Enzymology. Cellulose and Hemicellulose**. San Diego: Academic Press, 1988. vol. 160, p.536-41.
- BODENMANN, J.; HEINIGER, U.; HOHL, H.R. Extracellular enzymes of *Phytophthora infestans*: endoglucanase, β -glucosidases, and 1,3- β -glucanases. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 75-82, 1985.
- BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. **New Phytologist**, v. 130, p. 3-21, 1995.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.

- CAIRNEY, J.W.G.; BURKE, R.M. Fungal enzymes degrading plant cell walls: their possible significance in the ectomycorrhizal symbiosis. **Mycological Research**, v. 98, p. 1345-56, 1994.
- CAIRNEY, J.W.G.; RESS, B.J.; ALLAWAY, W.G.; ASHFORD, A.E.A. Basidiomycete isolated from a *Pisonia* mycorrhiza forms sheathing mycorrhizas with transfer cells on *Pisonia grandis*. **New Phytologist**, v. 126, p. 91-98, 1994.
- CAM, B.L.; MASSIOT, P.; ROUXEL, F. Cell wall polysaccharide-degrading enzymes produced by isolates of *Mycocentrospora acerina* differing in aggressiveness on carrot. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 44, p. 187-98, 1994.
- CAO, W.G.; CRAWFORD, D.L. Purification and some properties of β -glucosidase from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 125-29, 1993a.
- CAO, W.G.; CRAWFORD, D.L. Carbon nutrition and hydrolytic and cellulolytic activities in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 529-35, 1993b.
- CHAVES, V.M.G. Características fisiológicas de um fungo termófilo isolado de compostagem e propriedades de seu complexo celulase. Viçosa, 1982. 60 p. Dissertação (M.S) - Universidade Federal de Viçosa.
- CHILVERS, G.A. Host range of some eucalypt mycorrhizal fungi. **Australian Journal of Botany**, v. 21, p. 103-11, 1973.

- 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.
- CHIU, S.C.; TZEAN, S.S. Glucanolytic enzyme production by *Schizophyllum commune* Fr. during mycoparasitism. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 46, p. 83-94, 1995.
- COLLMER, A.; KEEN, N.T. The role of pectin enzymes in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 384-409, 1986.
- COLPAERT, J.V.; TICHELEN, K.K.V. Decomposition, nitrogen and phosphorus mineralization from beech leaf litter colonized by ectomycorrhizal or litter - decomposing basidiomycetes. **New Phytologist**, v. 134, p. 123-32, 1996
- COWLING, E.B.; BROWN, W. Structural features of cellulosic materials in relation to enzymatic hydrolysis. In: GOULD, R.F. (Ed.). **Cellulases and their applications**. Washington: American Chemical Society, 1969. cap. 10, p. 152-87.
- DAHM, H.; STRZELCZYK, E. Impact of vitamins on cellulolytic, pectolytic and proteolytic activity of mycorrhizal fungi. **Symbiosis**, v. 18, p. 233-50, 1995.
- DAVIS, M.W.; LAMAR, R.T. Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v 24, n. 3, p. 189-198, 1992.

- DEGEFU, Y.; FAGERSTROM, R.; KALKKINEN, N. Purification and partial characterization of xylanase from the fungal maize pathogen *Helminthosporium turcicum* (Pass.). **European Journal of Plant Pathology**, v. 101, p. 291-99, 1995.
- DEISING, H.; NICHOLSON, R.L.; HAUG, M.; HOWARD, R.J.; MENDGEN, K. Adhesion, pad formation and the involvement of cutinases and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. **The Plant Cell**, v. 4, p. 1101-11, 1992.
- DESHPANDE, V.; ERIKSSON, K.E.; PETTERSSON, B. Production, purification and partial characterization of 1,4 β -glucosidase enzymes from *Sporotrichum pulverulentum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 90, p. 191-98, 1978.
- DESHPANDE, V.; ERIKSSON, K.E. 1,4- β -glucosidases of *Sporotrichum pulverulentum*. In: WOOD, W.A.; KELLOGG, S.T. (Eds.). **Methods in Enzymology**. San Diego: Academic Press, 1988. vol. 160, p. 415-24.
- DIETRICH, S.M.C. Mecanismos de ação dos reguladores de crescimento. FERRI, M.G. (Coord.). **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: EPU, 1986. vol. 2, p. 213-19.
- DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Atividade celulolítica *in vitro* de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* diferindo em virulência. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28, Ilhéus, 1995. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, 1995. p.296.

- DICKMAN, M.B.; PATIL, S.S. The role of cutinase from *Colletotrichum gloeosporioides* in the penetration of papaya. In: HESS, W.M.; SINGH, R.S.; SINGH, U.S.; WEBER, D.J. (Eds.). **Experimental and Conceptual Plant Pathology**. Montreux: Gordon and Breach Science Publishers, 1988. 456 p.
- DORI, S.; SOLEI, Z.; BARASH, I. Cell wall-degrading enzymes produced by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* *in vitro* and *in vivo*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 46, p. 189-98, 1995.
- DUDDRIDGE, L.A. Specificity and recognition in ectomycorrhizal associations. In: PEGG, G.F. & AYRES, P.G. (Eds.). Fungal infection of plants. **Symposium of The British Mycological Society**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. cap. 2, p. 25-44.
- DURRANDS, P.K.; COOPER, R.M. Selection and characterization of pectinase-deficient mutants of the vascular wilt pathogen *Verticillium albo-atrum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 32, p. 343-62, 1988.
- ENARI, T.M. Microbial cellulases. In: FOGARTY, W.M. (Ed.) **Microbial Enzyme and Biotechnology Applied Sciences**. London: Applied Society, 1983. p.183-223.
- ERIKSSON, K.E. Enzyme mechanisms involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 20, p. 317-32, 1978.

ERIKSSON, K.E.; PETTERSSON, B. Extracellular enzyme system utilised by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. I. Separation, purification and physico-chemical characterization of five endo-1,4- β -glucanases. **European Journal of Biochemistry**, v. 51, p. 193-206, 1975a.

ERIKSSON, K.E.; PETTERSSON, B. Extracellular enzyme system utilised by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. III. Purification and physico-chemical characterization of an exo-1,4- β -glucanase. **European Journal of Biochemistry**, v. 51, p. 213-18, 1975b.

FERNANDES, M.C.A.; RIBEIRO, R. de L.D.; ECHER, M.M. Caracterização patogênica e eletroforética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de *Capsicum annum*, *Solanum melongena* e *Solanum gilo*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28, Ilhéus, 1995. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p.370, 1995.

GALLI, M.A. Influência de fontes de matéria orgânica na formação de ectomicorrizas em mudas de *Eucalyptus citriodora* inoculadas com *Pisolithus tinctorius*. Piracicaba, 1996. 90 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

GARCIA-GARRIDO, J.M.; CABELLO, M.N.; GARCIA-ROMERA, I.; OCAMPO, J.A. Endoglucanase activity in lettuce plants colonized with the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. **Soil Biological and Biochemistry**, v. 24, n. 10, p. 955-59, 1992 a.

GARCIA-GARRIDO, J.M.; GARCIA-ROMERA, I.; OCAMPO, J.A. Cellulase production by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mossae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe. **New Phytologist**, v. 121, p. 221-26, 1992 b.

GARCIA-ROMERA, I.; GARCIA-GARRIDO, J.M.; OCAMPO, J.A. Pectinase activity in vesicular-arbuscular mycorrhiza during colonization of lettuce. **Symbiosis**, v. 12, p. 189-98, 1991.

GARCIA-ROMERA, I.; GARCIA-GARRIDO, J.M.; MOLINA, E.M.; OCAMPO, J.A. Possible influence of hydrolytic enzymes on vesicular arbuscular mycorrhizal infection of alfafa. **Soil Biological and Biochemistry** v. 22, n. 2, p. 149-52, 1990

GAUCH, F.; ULHOA, C.J.; RIBEIRO, R.C. Produção de enzimas hidrolíticas por *Pythium oligandrum* e *Pythium acanthicum* quando crescidos na presença de parede celular de *Pythium ultimum* var. *ultimum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28, Ilhéus, 1995. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p.319, 1995.

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. 485-93, 1982.

GOKSOYR, J.; ERIKSEN, J. Cellulases. In: ROSE, A.H. (Ed.). **Microbial Enzymes and Bioconversions. Economic Microbiology**. London: Academic Press, 1980. vol. 5, 693 p.

- GONG, C.S.; TSAO, C.T. Cellulase and biosynthesis regulation. In: PERLMAN, D. (Ed.). **Annual Reports on Fermentation Processes**. London: Academic Press, 1979. vol. 3, p. 111-40.
- GOODMAN, G.H. Estudos genéticos e produção de celulase em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1988. 153p. Dissertação (M.S) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GORDON, T.R.; WEBSTER, R.K. Evaluation of ergosterol as an indicator of infestation of barley seed by *Drechslera graminea*. **Phytopathology**, v. 74, n. 9, p. 1125-1127, 1984.
- GRETENKORT, M.A.; INGRAM, D.S. The use of ergosterol as a quantitative measure of the resistance of cultured tissues of *Brassica napus* ssp. *oleifera* to *Leptosphaeria maculans*. **Journal of Phytopathology**, v. 138, p. 217-224, 1993.
- GRIFFITHS, H.M ; JONES, D.G. A bioassay for predicting the resistance of wheat leaves to *Septoria nodorum*. **Annual Applied Biology**, v. 107, p. 293-300, 1985.
- HEILER, S.; MENDGEN, K.; DEISING, H. Cellulolytic enzymes of the obligately biotrophic rust fungus *Uromyces viciae-fabae* are regulated differentiation-specifically. **Mycological Research**, v. 97, n. 1, p. 77-85, 1993.
- HEPPER, C.M.; AZCON-AGUILAR, C.; ROSENDAHL, S.; SEN, R. Competition between three species of *Glomus* used as spatially separated introduced and indigenous inocula for leek (*Allium porrum* L.). **New Phytologist**, v. 110, p. 207-15, 1988.

- HEPPER, C.M.; SEN, R.; MASKALL, C.S. Identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in roots of leek (*Allium porrum* L.) and maize (*Zea mays* L.) on the basis of enzyme mobility during polyacrylamide gel electrophoresis. **New Phytologist**, v. 102, p. 529-39, 1986.
- HERR, D. Secretion of cellulase and β -glucosidase by *Trichoderma viride* ITCC-1433 in submerged culture on different substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 21, p. 1361-71, 1979.
- HILBERT, J.L.; MARTIN, F. Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes and the presence of ectomycorrhiza - specific in the *Pisolithus* - *Eucalyptus* symbiosis. **New Phytologist**, v. 110, p. 339-46, 1988.
- HILBERT, J.L.; COSTA, G.; MARTIN, F. Ectomycorrhizin synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. **Plant Physiology**, v. 97, p. 977-84, 1991.
- HO, I. Comparasion of eight *Pisolithus tinctorius* isolates for growth rate, enzyme activity and phytohormone production. **Canadian Journal Forest Research**, v. 17, p. 31-37, 1987.
- HOLDEN, F.R.; WALTON, J.D. Xylanases from the fungal maize pathogen *Cochiobolus carbonum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 40, p. 39-47, 1992.
- HORAN, D.P.; CHILVERS, G.A.; LAPEYRIE, F.F. Time sequence of the infection process in eucalypt ectomycorrhizas. **New Phytologist**, v. 109, p. 451-58, 1988.

- HUMBLE, M.W.; KING, A.; PHILLIPS, I. Api Zym: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. **Journal of Clinical Pathology**, v. 30, p. 275-277, 1977.
- ISAAC, S. **Fungal-plant interactions**. London: Chapman & Hall., 1992. 418 p.
- JABBAR, A.; AFZAL, J. Evaluation of solid substrates for the biosynthesis of cellulase by *Trichoderma viride*. **Agriculture and Biological Chemistry**, v. 45, p. 1719-20, 1981.
- JOHNSON, B.N.; MCGILL, W.B. Comparison of ergosterol and chitin as quantitative estimates of mycorrhizal infection and *Pinus contorta* seedling response to inoculation. **Canadian Journal Forest Research**, v. 20, p. 1125-1131, 1990.
- JUNQUEIRA, N.T; ALFENAS, A.C.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIM, L.; GASPAROTTO, L. Variabilidade isoenzimática de isolados de *Mycrocyclus ulei* com diferentes níveis de virulência. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 208-14, 1987.
- KEILICH, G.; BAILEY, P.J.; AFTING, E.G.; LIESE, W. Cellulase (β -1,4 glucan-4-glucan-hydrolase) from the wood-rooting fungus *Polyporus schweinitzii* FR. II. Characterization. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 185, p. 392-401, 1969.
- KELLER, G. Isozymes in isolates of *Suillus* species from *Pinus cembra* L. **New Phytologist**, v. 120, p. 351-58, 1992.

- KEPHART, S.R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal Botany**, v. 77, p. 693-712, 1990.
- KIM, D.W.; JEONG, Y.K.; JANG, Y.H.; LEE, J.K. Purification and characterization of endoglucanase and exoglucanase components from *Trichoderma viride*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 4, p. 363-69, 1994.
- KINDEN, D.A.; BROWM, M.F. Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizas of yellow poplar. II. Intracellular hyphae and vesicles. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 21, p. 1768-80, 1975.
- KOLLAR, A. Characterization of specific induction, activity, and isozyme polymorphism of extracellular cellulases from *Venturia inaequalis* detected *in vitro* and on the host plant. **Molecular and Plant-Microbe Interactions**, v. 7, n. 5, p. 603-11, 1994.
- KROPP, B.P.; TRAPPE, J.M. Ectomycorrhizal fungi of *Tsuga heterophylla*. **Mycologia**, v. 74, p. 479-88, 1982.
- KRÜGNER, T.L. A natureza da doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 34-44.
- KRÜGNER, T.L.; TOMAZELLO FILHO, M. Tecnologia de inoculação micorrízica em viveiro de *Pinus* spp. Piracicaba, IPEF, 1979. 6 p. (Circular Técnica 6).

KÚC, J. Phytoalexins. **Annual Review of Phytopathology**, v. 10, p. 207-232, 1972.

LACHKE, A.H. 1,4- β -D-Xylan Xylohydrolase of *Sclerotium rolfsii*. In: WOOD, W. A. & KELLOGG, S. T. (Eds). **Methods in Enzymology. Cellulose and Hemicellulose**. San Diego: Academic Press, 1988. vol. 160, p.679-84.

LAMB, R.J. Effect of D-glucose on utilization of single carbon sources by ectomycorrhizal fungi. **Transaction of the British Mycological Society**, v. 63, n. 2, p. 295-306, 1974.

LEGER, R.J.S.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Enzymatic characterization of entomopathogens with the Api Zym sytem. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 48, p. 375-376. 1986.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v. 47, p. 273-79, 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. 313-28, 1977.

LINKINS, A.E.; ANTIBUS, R.K. Mycorrhizae of *Salix rotundifolia*. In: LAURSEN, G.A. & AMMIRATI, F.F. (Eds.). **Arctic and Alpine Mycology**. Seatle: University of Washington Press, 1981. p.509-31.

- MAIJALA, P.; FAGERSTEDT, K.V.; RAUDASKOSKI, M. Detection of extracellular cellulolytic and proteolytic activity in ectomycorrhizal fungi and *Heterobasidium annosum* (Fr.) Bref. **New Phytologist**, v. 117, p. 643-48, 1991.
- MALAJCZUK, N.; MOLINA, R.; TRAPPE, J.M. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*. I. Pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with *Pinus radiata*. **New Phytologist**, v. 91, p. 467-82, 1982.
- MALAJCZUK, N.; MOLINA, R.; TRAPPE, J.M. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*. II. The ultrastructure of compatible and incompatible mycorrhizal fungi and associated roots. **New Phytologist**, v. 96, p. 43-53, 1984.
- MALAJCZUK, N.; LAPEYRIE, F. & GARBAYE, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. **New Phytologist**, v. 114, p. 627-31, 1990.
- MALUF, A.M.; MELO, I.S.; RABELLO, R.J. Caracterização preliminar de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares através de eletroforese em géis de amido. Piracicaba, **Reunião Brasileira de Micorrizas**, 3, p. 102, 1989.
- MANDELS, M. Microbial sources of cellulase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 5, p. 81-105, 1975.
- MANDELS, M.; PARRISH, F.W.; REESE, E.T. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. **Journal of Bacteriology**, v. 83, p. 400-8, 1962.

MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal of Bacteriology**, v. 79, p. 816-26, 1960.

MANKA, M. Cellulolytic activity of three *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. isolates pathogenic towards wheat seedlings. **Journal of Phytopathology**, v. 121, p. 113-17, 1988.

MARKS, G.C.; FOSTER, R.C. Structure, morphogenesis and ultrastructure of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C.; KOZLOWSKI, T.T. (Eds). **Ectomycorrhiza their ecology and physiology**. New York: Academic Press, 1973. p.2-35.

MARTIN, F.; DELARUELLE, C.; HILBERT, J.L. An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. **Mycological Research**, v. 94, n. 8, p. 1059-1064, 1990.

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

MARX, D.H. Role of mycorrhizae in forestation of surface mines. **Forest Service**, Lexington: USDA, 1980. p.109-16.

MASSICOTTE, H.B.; PETERSON, R.L.; ACKERLEY, C.A.; PICHÉ, Y. Structure and ontogeny of *Alnus crispa* - *Alpova diplophloeus* ectomycorrhizae. **Canadian Journal Botany**, v. 64, p. 177-92, 1986.

- MATCHAM, S.E.; JORDAN, B.R.; WOOD, D.A. Methods for assessment of fungal growth on solid substrates. In: **Microbiological Methods for Environmental Biotechnology**, p.5-18, 1984.
- McHALE, A.; COUGHLAN, M.P. Synergistic hydrolysis of cellulose by components of the extracellular cellulase system of *Talaromyces emersonii*. **FEBS Letter**, p.319-22, 1980.
- MENDGEN, K.; DEISING, H. Infection structures of fungal plant pathogens - a cytological and physiological evaluation. **New Phytologist**, v. 124, p. 193-213, 1993.
- MERCHANT, R.; MERCHANT, F.; MARGARITIS, A. Production of xylanase by the thermophilic fungus *Thielavia terrestris*. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 7, p. 513-16, 1988.
- MIELE, W.H.; LINKINS, A.E. Cellulase activity during the growth of *Achlya bisexualis* on glucose, cellulose and selected polysaccharides. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, p. 194-98, 1978.
- MOLINA, R. Pure culture synthesis and host specificity of red alder mycorrhizae. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p. 1223-28, 1979.
- MOLINA, R. Ectomycorrhizal specificity in the genus *Alnus*. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 325-34, 1981.
- MOLINA, R.; TRAPPE, J.M. Patterns of ectomycorrhizal specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi. **Forest Science**, v. 28, p. 423-58, 1982.

- MONTI, R.; JORGE, J.A. Xylanolytic enzymes production in *Humicola* sp. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 29, p. 42, 1986.
- MORALES, V.M.; MARTINEZ-MOLINA, E.; HUBBEL, D.H. Cellulase production by *Rhizobium*. **Plant and Soil**, v. 80, p. 407-15, 1984.
- NATARAJAN, K.; KANNAN, K. Cellulase production by *Amanita muscaria*. **Current Science**, v. 51, p. 559-61, 1982.
- NORKRANS, B. Studies in growth and cellulolytic enzymes of *Tricholoma*. **Symbolae Botanicae Upsalienses XI**, 127 p., 1950.
- NYLUND, J.E.; 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.
- NYLUND, J.E.; WALLANDER, H. Ergosterol analysis as a mean of quantifying mycorrhizal biomass. In: **Methods in Microbiology**, 1992. v.24, p.77-88.
- OGAWA, K.; TOYAMA, D.; FUJII, N. Microcrystalline cellulose-hydrolyzing cellulase (endo-cellulase) from *Trichoderma reesei* CDU-11. **Journal General Applied Microbiology**, v. 37, p. 249-59, 1991.
- OLIVEIRA, V.L.; SCHMIDT, V.D.B.; GOMES, N.C.; MAIA, D.C. Infectivity and efficacy of ectomycorrhizal isolates to *Eucalyptus viminalis* Labill and *E. dunnii* Maiden. Perth, Western Australia, **The International Symposium on Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**, Programa e Abstracts, 1992.

- PADMAJA, G.; AMMA, B.S. Cellulase activity in the roots of coconut palms affected by root (wilt) disease. **Journal of Plantation Crops**, v. 7, n. 2, p. 101-104, 1979.
- PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. v 1, p. 343-64.
- PASCHOLATI, S.F.; DEISING, H.; LEITE, B. ANDERSON, D.; NICHOLSON, R.L. Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 42, p. 37-51, 1993.
- PEREIRA, R.M.F.V. Caracterização morfológica, fisiológica, serológica e eletroforética de *Colletotrichum gloeosporoides* Ssensu Arx, isolados de pimentão (*Capsicum annum* L.) e jiló (*Solanum gilo* Radd.) e seu controle químico. Piracicaba, 1995. 155p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- PEREZ, F.S. Teor de ergosterol do micélio de isolados de *Pisolithus tinctorius* e de *Rhizopogon* sp. Piracicaba, 1996. 48 p. Dissertação (M.S) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- PEYRONEL, B.; FASSI, B.; FONTANA, A.; TRAPPE, J.M. Terminology of mycorrhizae. **Mycologia**, v. 61, p. 410-11, 1969.

PICHÉ, Y.; FORTIN, J.A.; PETERSON, R.L.; POSLUSZNY, U. Ontogeny of dichotomizing apices in mycorrhizal short roots of *Pinus strobus*. **Canadian Journal Botany**, v. 60, p. 1523-28, 1982.

PICHÉ, Y.; PETERSON, R.L.; HOWARTH, M.J.; FORTIN, J.A. A structural study of the interaction between the ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius* and *Pinus strobus* roots. **Canadian Journal Botany**, v. 61, p. 1185-93, 1983.

REESE, E.T.; SIU, R.G.H.; LEVINSON, H.S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 59, p. 485-97, 1950.

ROSENDAHL, S.; SEN, R.; HEPPEL, C.M.; AZCON-AGUILAR, C. Quantification of three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp) in roots of leek (*Allium porrum*) on the basis of activity of diagnostic enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, n. 4, p. 519-22, 1989.

ROTEM, Y.; SHOSEYOV, O.; SZTEJNBERG, A. The role of cellulase (endo 1,4- β -glucanase) in gummosis diseases in apricot. **Journal of Phytopathology**, v. 143, p. 7-10, 1995.

RYU, D.D.Y.; MANDELS, M. Cellulases: Biosynthesis and applications. **Enzyme Microbial Technology**, v. 2, p. 91-102, 1980.

SADANA, J.C.; PATIL, R.V. Synergism between enzymes of *Sclerotium rolfsii* involved in the solubilization of crystalline cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 140, p. 111-20, 1985.

- SALMANOWICZ, B.; NYLUND, E. High performance liquid chromatography determination of ergosterol as a measure of ectomycorrhiza infection in scots pine. **European Journal Forest Pathology**, v. 18, p. 291-98, 1988.
- SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, v. 1, n. 3, p. 54-8, 1975.
- SCHMIDT, V.D.B.; OLIVEIRA, V.L.; BELLEI, M.M. Dynamics of mycorrhizal colonization in *Eucalyptus dunnii* plantations in Santa Catarina (South Brazil). Perth, Western Australia, **The International Symposium on Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**, Programa e Abstracts, 1992.
- SCHWAN, R.F. Pectinolytic enzyme production by cocoa-degrading yeasts: production, characterization and distribution of polygalacturonase in wild type and mutant *Kluyveromyces marxianus*. Bath, 1994. 208 p. Thesis (Ph.D.) - University of Bath.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; DÍAZ, C.G.; PASCHOLATI, S.F. Caracterização enzimática de fungos pelo sistema API ZYM. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28., Ilhéus, 1995. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 343, 1995.
- SCOPES, R. **Protein purification. Principles and Practice**. New York: Springer-Verlag, 1982. 282p.
- SEITZ, L.M.; MOHR, H.E.; BURROUGHS, R.; SAUER, D.B. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. **Cereal Chemists**, v. 54, n. 6, p. 1207-1217, 1977.

SEITZ, L.M.; SAUER, D.B.; BURROUGHS, R.; MOHR, H.E.; HUBBARD, J.D. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, v. 69, p. 1202-1203, 1979.

SEN, R.; HEPPER, C.M. Characterization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp) by selective enzyme staining following polyacrylamide gel electrophoresis. **Soil Biological Biochemistry**, v. 18, n. 1, p. 29-34, 1986.

SOUTHERTON, S.G.; OSBOURN, A.G.; DOW, J.M.; DANIELS, M.J. Two xylanases from *Gaeumannomyces graminis* with identical N-terminal amino acid sequence. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 42, p. 92-107, 1993.

STANGARLIN, J.R. 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. 93 p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

STEWART, J.C.; LESTER, A.; MILBURN, B.; PARRY, J.B. Xylanase and cellulase production by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 8, p. 543-48, 1983.

STREAMER, M.; ERIKSSON, K.E.; PETTERSSON, B. Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. IV. Functional characterization of five endo-1,4- β -glucanases and one exo-1,4- β -glucanase. **European Journal of Biochemistry**, v. 59, p. 607-13, 1975

- SUH, H. W.; CRAWFORD, D.L.; KORUS, R.A.; SHETTY, K. Production of antifungal metabolites by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF. **Journal Industrial Microbiology**, v. 8, p. 29-36, 1991.
- TABER, W. A.; TABER, R. A. Carbon nutrition and respiration of *Pisolithus tinctorius*. **Transactions of the British Mycological Society**, v 89, p. 13-26, 1987.
- TRAPPE, J.M. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizas. **Botanical Review**, v. 28, p. 538-606, 1962.
- TREAT, W.J.; TABER, W.A. Production of β -glucosidase (cellobiase) by *Pisolithus tinctorius*. **Biotechnology Letters**, v. 10, p. 517-20, 1988.
- ULHOA, C.J.; FELIX, C.R.; CALDAS, R.A. β -glucosidase enzymes of the cellulolytic fungi *Picnoporus sanguineus*. **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, v. 29, p. 45, 1986.
- VENKATESHWARLU, N.; REDDY, S.M. Production of cellulases and xylanases by some thermophilic fungi. **Indian Phytopathology**, v. 43, p. 77-79, 1990.
- VERHOEFF, K.; LIEM, J.I.; SCHEFFER, R.J.; SURYA, I. Cellulolytic activity of *Botrytis cinerea* *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Phytopathology**, v. 106, p. 97-103, 1983.
- WAGNER, K.; HITZ-GERMANN, L.; SENG, J.M.; GESSLER, C. Cellulolytic ability of the scab fungus *Venturia inaequalis*. **Journal of Phytopathology**, v. 123, p. 217-21, 1988.

- WICK, R.L.; SCHROEDER, D.B. *In vitro* production of pectolytic and cellulolytic enzymes by *Fusarium tricinctum*. **Mycologia**, v. 74, p. 460-66, 1982.
- WOLTER, K.E.; HIGHLEY, T.L.; EVANS, F.J. A unique polysaccharide and glycoside-degrading enzyme from the wood decay fungus *Poria placenta*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 97, p. 1499-1504, 1980.
- WOOD, T.M. Properties of cellulolytic enzyme systems. In: GOUCHLAM, M.P. (Ed.) **Cellulose: production, properties and applications**. Meeting Galway: Society Hast Colloquium, 1985. 611p.
- WOOD, T.M. Fungal cellulases. **Biochemistry of Plant Polysaccharides**, v. 20, p. 46-53, 1992.
- WOOD, T.M.; McCRAE, S.I. The cellulase of *Trichoderma koningii* - purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. **Biochemical Journal**, v. 171, p. 61 - 72, 1978.
- WOODWARD, J.; ARNOLD, S.L. The inhibition of β -glucosidase activity in *Trichoderma reesei* C30 cellulase by derivatives and isomers of glucose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 1553-62, 1981.
- WU, S.C.; KAUFFMANN, S.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Purification, cloning and characterization of two xylanases from *Magnaporthe grisea*, the rice blast fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, p. 506-14, 1995.

- YOKOMIZO, N.K.S. Associação ectomicorrízica de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch com espécies de *Eucalyptus* L'Heritier. Piracicaba, 1981. 54 p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ZHU, H.; HIGGINBOTHAM, K.O.; DANCİK, B.P. Intraspecific genetic variability of isozymes in the ectomycorrhizal fungus *Suillus tomentosus*. **Canadian Journal of Botany**, v. 66, p. 588-94, 1988.

APÊNDICE

Apêndice 1. Curva padrão para a determinação de glicose através do método de Lever.

Apêndice 2. Curva padrão para determinação de *p*-nitrofenol.

Apêndice 3. Curva padrão para a dosagem de proteínas através do método de Bradford, utilizando reagente concentrado e albumina de soro bovino.

Apêndice 4. Reagentes utilizados no sistema API-ZYM:**a) Zym A:**

Tri-hidroximetil amino metano	250 g
Ácido hidrocloreico 37%	110 ml
Lauril sulfato	100 g
Água destilada	1000 ml

b) Zym B:

Fast Blue BB	3,5 g
2-metoxietanol	1000 ml

api

API ZYM

ECHELLE DE LECTURE · READING SCALE

Quantité de substrat hydrolysé Quantity of hydrolysed substrate	≥ 40 nanomoles	30 nanomoles	20 nanomoles	10 nanomoles	5 nanomoles	0 nanomole
Activité chiffrée Activity mark	5	4	3	2	1	0
Control – Témoin						
2 · naphthyl · phosphate						
2 · naphthyl · butyrate						
2 · naphthyl · caprylate						
2 · naphthyl · myristate						
L · leucyl · 2 · naphthylamide						
L · valyl · 2 · naphthylamide						
L · cystyl · 2 · naphthylamide						
N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide						
N-glutaryl-phénylalanine-2-naphthylamide						
2 · naphthyl · phosphate						
Naphtol-AS-BI-phosphate						
6-Br-2-naphthyl-αD-galactopyranoside						
2-naphthyl-βD-galactopyranoside						
Naphtol-AS-BI-βD-glucuronide						
2-naphthyl-αD-glucopyranoside						
6-Br-2-naphthyl-βD-glucopyranoside						
1-naphthyl-N-acétyl-βD-glucosaminide						
6-Br-2-naphthyl-αD-mannopyranoside						
2-naphthyl-αL-fucopyranoside						

api

69280 Marcy-l'Étoile / France / tél. 78 87 20 00 / télex 330 967
BIO MÉRIEUX SA au capital de 45 068 400 F / Imprimé en France / RCS Lyon B 673 620 399

Imprimé en Neuviller 01 500 86111

40.0001-3-D

Apêndice 5. Escala de notas utilizadas pelo sistema API - ZYM.

Apêndice 6. Preparo das soluções para a análise eletroforética.

a) Tampão de corrida:

Tris	0,75 g
Glicina	3,6 g
Água destilada	1000 ml

b) Bis/Acrilamida:

NN-bis-metileno-acrilamida	2,4 g
Acrilamida	87,6 g
- Completar para 300 ml com água destilada.	

c) Gel separador (10%):

Água destilada	3,35 ml
Tris-HCl (pH 8,9)	2,777 ml
Bis/Acrilamida	3,706 ml
TEMED	3 µl
Persulfato de amônio-PA (32 mg/ml)	0,167 ml

d) Gel concentrador (4%):

Água destilada	3,5 ml
Tris-PO ₄ 0,5 M (pH 6,9)	0,5 ml
Bis/Acrilamida	0,75 ml
TEMED	5 µl
PA	0,285 ml

e) Coloração para esterase (Alfenas et al., 1991):

α,β-naftil-acetato 1% em acetona	3,0 ml
Fast blue RR	100 mg
Tris-HCl 0,05 M (pH 7,1) (q.s.p.)	100 ml

- Incubar o gel a 30-37°C até as bandas aparecerem (5 a 10 min). Descartar a solução e fixar o gel em solução de glicerol a 10%.

Apêndice 7. Curvas padrão mostrando a relação entre o peso seco do micélio de *Pisolithus tinctorius* isolados 1604 (A) e 185 (B) e a quantidade de ergosterol presente. Barras representam o erro padrão da média.