“Teor de Ergosterol do Micélio de Isolados de *Pisolithus tinctorius* e de *Rhizopogon* sp”

Flávia da Silveira Perez - Bióloga

Orientador: Prof. Dr. TASSO LEO KRUGNER

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia.
Área de Concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba - Estado de São Paulo - Brasil

Dezembro - 1996

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

Perez, Flávia da Silveira

Teor de ergosterol do micélio de isolados de *Pisolithus tinctorius* e de *Rhizopogon* sp / Flávia da Silveira Perez. - - Piracicaba, 1996.

56 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.

Bibliografia.

1. Cromatografia líquida 2. Meio de cultura 3. Micorriza 4. Microbiologia agrícola 5. Substrato I. Título

CDD 589.221

Teor de Ergosterol do Micélio de Isolados de *Pisolithus tinctorius* e de *Rhizopogon* sp.

FLÁVIA DA SILVEIRA PEREZ

Aprovada em 10.03.1997

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Tasso Leo Krugner

ESALQ - USP

Prof. Dr. Celso Garcia Auer

EMBRAPA

Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo

ESALQ - USP

Prof. Dr. TASSO LEO KRUGNER

Aos meus pais Dennison e Maria Lúcia,

Ofereço.

À minha filha Fernanda,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Dennison e Maria Lúcia, pelo apoio constante.

Ao Professor Tasso Leo Krugner, pelos ensinamentos, orientação, incentivo, amizade e apoio constantes durante o curso.

A Marco Antonio Galli pela ajuda e amizade.

Ao Professor Murilo de Melo pela ajuda, pela cessão do laboratório e pelas sugestões apresentadas.

Aos Professores Sérgio F. Pascholati e Luis Eduardo Aranha Camargo pela cessão de seus laboratórios.

A todos os professores, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela colaboração e amizade.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	ii
Resumo	iii
Summary	iv
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	4
2.1. Aplicação de fungos ectomicorrízicos específicos na silvicultura	4
2.2. Quantificação de ectomicorrizas e biomassa fúngica	9
2.3. O uso de ergosterol na quantificação de micorriza e biomassa fúngica	12
2.4. Variações intra e interespecíficas no conteúdo de ergosterol do micélio fúngico	17
3. Material e Métodos	21
3.1. Experimentos realizados	21
3.2. Obtenção e cultivo dos isolados	21
3.3. Preparação das amostras	25
3.3.1. Extração	25
3.4. Determinação do teor de ergosterol	27
4. Resultados e Discussão	28
4.1. Experimento 1	28
4.2. Experimento 2	32
4.3. Experimento 3	33
Conclusões	35
Referências Bibliográficas	36
APÊNDICES	50

Lista de Figuras

Figura nº _____ página

- 1 Esteróis mais comuns, (A) nos fungos (Ergosterol) e (B) nas plantas (Sitosterol). R se refere à configuração no C-20 ou C-24. (C) estrutura do ergosterol. _____ 12
- 2 Cromatogramas representativos de extratos miceliais dos isolados de *Pisolithus tinctorius* (B-F) e *Rhizopogon* sp (A). e = ergosterol; A = *Rhizopogon*; B = 1604; C = 185; D = 1609; E = 1612; F = 1603; G = 1613 _____ 31

Lista de Tabelas

Tabela nº _____ página

1. Designação, procedência e ano de isolamento dos isolados de *Pisolithus tinctorius* e *Rhizopogon* sp utilizados _____ 22
2. Composição do meio de cultura MMN _____ 24
3. Análise química da perlita utilizada no experimento 2 _____ 24
4. Biomassa micelial e teor de ergosterol produzidos por diferentes isolados de *Pisolithus tinctorius* (Pt) e de um isolado de *Rhizopogon* sp (R) cultivados em meio líquido (MMN) durante 4 semanas _____ 30
5. Biomassa micelial e quantidade de ergosterol produzidos por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* cultivados em substrato líquido (MMN) e sólido (MMN + perlita) durante 1 mês _____ 32
6. Biomassa micelial e ergosterol produzidos por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* cultivados em meio líquido (MMN) durante 4, 5 e 6 semanas _____ 34

“Teor de Ergosterol do Micélio de Isolados de *Pisolithus tinctorius* e de *Rhizopogon* sp”

Autor: Flávia da Silveira Perez

Orientador: Prof. Dr. Tasso Leo Krugner

Resumo

O conteúdo de ergosterol dos micélios de duas espécies de fungos ectomicorrízicos foi determinado utilizando-se cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Cinco isolados de *Pisolithus tinctorius* (quatro de eucalipto e uma de *Pinus*) e um isolado de *Rhizopogon* sp foram analisados após crescerem em meio de cultura líquido (Melin - Norkrans Modificado - MMN) por um mês. O teor de ergosterol dos isolados de *P. tinctorius* variou entre 2,4 - 6,2 µg/mg de matéria seca e o de *Rhizopogon* sp foi de 11 µg/mg de matéria. Quando cresceram em substrato sólido (perlita umedecida com MMN), o conteúdo de ergosterol de dois isolados de *P. tinctorius* (1604 de eucalipto e 185 de *Pinus*) foi consideravelmente menor em relação ao meio líquido. O período de incubação (4 - 6 semanas) aumentou e depois diminuiu o conteúdo de ergosterol do isolado 1604 de *P. tinctorius*. Para o isolado 185, no entanto, o efeito foi de aumento do conteúdo de ergosterol e estabilização.

“Mycelial Ergosterol Content of Isolates of

Pisolithus tinctorius and *Rhizopogon* sp.”

Author: Flávia da Silveira Perez

Adviser: Prof. Dr. Tasso Leo Krugner

Summary

The mycelial ergosterol content of two ectomycorrhizal fungi (*Pisolithus tinctorius* and *Rhizopogon* sp) was determined by using high performance liquid chromatography (HPLC). Five isolates of *P. tinctorius* (four from *Eucalyptus* and one from *Pinus*) and one isolate of *Rhizopogon* sp were analyzed after growth for one month in a liquid medium (Modified Melin Norkrans - MMN). The ergosterol content varied from 2,4 to 6,2 µg/mg of dry matter for the *P. tinctorius* isolates, whereas for the *Rhizopogon* sp isolate it was 11,0 µg/mg of dry matter. The ergosterol levels of two isolates of *P. tinctorius* (1604 from *Eucalyptus* and 185 from *Pinus*) were significantly lower after growth in a solid substrate (perlite + MMN solution) for one month when compared with those obtained after growth in the liquid medium (MMN without perlite). The incubation period (4 - 6 weeks) increased initially and then decreased the ergosterol

content of isolate 1604 of *P. tinctorius*. For isolate 185, however, the ergosterol content increased and then became stable.

1. Introdução

As ectomicorrizas são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de algumas árvores, tal como o *Pinus* (MARX et alii, 1992). A incapacidade de plantas não micorrizadas de crescerem em ambientes pouco férteis, com temperaturas extremas e secas periódicas, e seu bem sucedido estabelecimento após a inoculação do solo por um fungo micorrízico apropriado, estão relatados em vários trabalhos (ALVAREZ & TRAPPE, 1983; MARX et alii, 1992).

Vários fatores ambientais, sejam do solo ou acima dele, que afetem o crescimento da raiz da planta, influenciam também o desenvolvimento da micorriza, assim como os fatores que regulam a sobrevivência do fungo no solo e seu crescimento na raiz, e uma maior eficiência de algumas espécies de fungos, sendo muitas vezes mais benéficas para as árvores do que espécies que ocorrem naturalmente em seus sítios (MARX, 1980; MARX et alii, 1992). Pesquisas têm sido feitas na seleção de espécies de fungos convenientes para o aumento da sobrevivência das árvores e do crescimento após o plantio (TRAPPE, 1977; MARX, 1980; CASTELLANO & TRAPPE, 1985; MARX & CORDELL, 1989). *Pisolithus tinctorius* (Pers) Coker & Couch, tem sido utilizado em

várias partes do mundo, tanto em escala experimental como industrial, para formação de micorrizas em *Pinus* e *Eucalyptus* (CASTELLANO, 1990; MARX et alii, 1992).

Em pesquisas sobre micorrizas, é freqüente a necessidade de determinação da intensidade da infecção micorrízica, e muitos métodos têm sido utilizados para este fim. A técnica mais freqüentemente utilizada é a de contar, ou estimar visualmente o número de raízes micorrizadas e expressar o resultado em porcentagem do número total de raízes. Este método é tedioso e subjetivo e não leva em conta o micélio extramatricial (GRAND & HARVEY, 1982; NYLUND & WALLANDER, 1992).

A separação do micélio fúngico da planta infectada para a determinação de sua biomassa, é um tarefa muito difícil. No entanto, o crescimento do fungo pode ser monitorado pela determinação de um componente químico característico do fungo em desenvolvimento. A determinação da quitina, um componente da parede celular do fungo, também tem sido utilizada, porém, a quantidade de quitina não é necessariamente proporcional à quantidade de citoplasma das hifas, e a extração é laboriosa e demorada (JOHNSON & MCGILL 1990; NYLUND & WALLANDER, 1992).

Recentemente, o ergosterol, um esterol encontrado na membrana celular dos fungos mas não em plantas, provou ser um bom indicador bioquímico de biomassa fúngica viva em folhas, grãos e raízes infectadas (NYLUND & WALLANDER, 1992). Pesquisas têm revelado, contudo, que ocorrem variações nos níveis de ergosterol entre diferentes isolados da mesma espécie de fungo, entre diferentes espécies e condições de cultivo (NYLUND & WALLANDER, 1992).

O presente trabalho tem por objetivo comparar os níveis de ergosterol de diferentes isolados de *Pisolithus tinctorius* e de um isolado de *Rhizopogon* sp, além de analisar possíveis variações no teor de ergosterol devidas ao uso de diferentes substratos e períodos de incubação.

2. Revisão de Literatura

2.1. Aplicação de fungos ectomicorrízicos específicos na silvicultura

A rizosfera da planta sustenta um grande número de microrganismos (MARX & KRUPA, 1978). As associações entre as raízes e os microrganismos podem ser saprofíticas, parasíticas e simbióticas. A forma de associação simbiótica mais comum nas raízes das plantas superiores é a micorriza, permitindo a cada um sobreviver em ambientes desfavoráveis, como de baixa fertilidade do solo, secas periódicas, temperaturas extremas e outros estresses naturais (MARX & KRUPA, 1978; MARX et alii, 1992). As endomicorrizas ocorrem mais comumente, sendo formadas em mais de 90% das 300.000 espécies de plantas vasculares, enquanto que as ectomicorrizas ocorrem em 10% da flora mundial, em árvores pertencentes as Pinaceae, Betulaceae, Fagaceae, Salicaceae, Juglandaceae, Myrtaceae, Ericaceae, além de outras famílias (MARX et alii, 1992).

Numerosos fungos têm sido identificados como formadores de micorrizas. Em todo o mundo, mais de 5.000 espécies podem formar ectomicorrizas em mais de 2.000 espécies de plantas lenhosas: nos Basidiomicetos, alguns Hymenomicetos como o *Suillus*,

Boletus e *Laccaria*; nos Gasteromicetos, os gêneros *Rhizopogon*, *Scleroderma* e *Pisolithus*, e nos Ascomicetos, algumas espécies das ordens Eurotiales, Tuberales e Pezizales formam ectomicorrizas (DIGHTON & MASON, 1985; FRIES, 1987; MARX et alii, 1992). Os fungos ectomicorrízicos ajudam no desenvolvimento e crescimento das árvores, e para algumas, como o *Pinus*, são indispensáveis para o crescimento em condições naturais (MARX et alii, 1992). A necessidade da formação de micorriza pelo *Pinus* foi demonstrada em vários ensaios em áreas arborizadas em formação e em países sem as árvores ectomicorrízicas nativas e seus simbiontes fúngicos (MIKOLA, 1973; MARX & BRIAN, 1975; MARX, 1980).

As ectomicorrizas são compostas de muitas ramificações extensas, e suas hifas se prolongam por consideráveis distâncias no solo, deixando as árvores micorrizadas com uma área fisiologicamente ativa maior para a absorção de nutrientes e água que árvores não micorrizadas, aumentando a habilidade das hospedeiras de capturar água e alimento do solo (MARX et alii, 1992). Além disso, aumentam a tolerância à seca, a altas temperaturas no solo, a toxinas orgânicas e inorgânicas e a extremos de acidez no solo causados por altos níveis de alumínio e enxofre (MARX & KRUPA, 1978; MARX et alii, 1992). Adicionalmente, as ectomicorrizas ajudam na resistência a infecções por patógenos da raiz como o *Pythium* e a *Phytophthora* (MARX & KRUPA, 1978).

Freqüentemente existe a necessidade de observar a eficiência das ectomicorrizas, pois muitos fatores podem afetar o desenvolvimento das mesmas. Qualquer condição ambiental ou do solo que influencie no crescimento da raiz, também influencia no desenvolvimento ectomicorrízico (EKWEBELAN & REID, 1983;

FRANCE & REID, 1983; O'NEILL et alii, 1987; MARX, 1990). O primeiro pré-requisito para o desenvolvimento da ectomicorriza é que a planta hospedeira produza uma raiz alimentadora suscetível; o segundo, que haja no rizoplane inóculo de um fungo ectomicorrízico; terceiro, as condições químicas, físicas e biológicas do solo devem favorecer a colonização simbiótica (MARX et alii, 1992). O potencial fotossintético e a fertilidade do solo parecem ser os fatores mais importantes a influenciar a suscetibilidade das raízes das árvores à infecção micorrízica (EKWEBELAM & REID, 1983; MARX et alii, 1992). Luz intensa e fertilidade baixa ou moderada promovem o desenvolvimento da micorriza, enquanto que uma intensidade de luz abaixo de 20% da luz do sol total e excessiva fertilidade do solo reduzem e até previnem esse desenvolvimento (MARX et alii, 1977; FRANCE & REID, 1983; EKWEBELAM & REID, 1983; MARX, 1990). O desfolhamento mecânico que reduz a superfície fotossintética, reduz o desenvolvimento ectomicorrízico (LAST et alii, 1979). Segundo O'NEILL et alii (1987) o aumento da fotossíntese, causado pelo enriquecimento com CO₂ atmosférico aumenta o desenvolvimento micorrízico. Muitos fatores regulam a sobrevivência do fungo simbiote no solo ou seu crescimento na raiz, tais como os extremos de temperatura no solo, pH, umidade, e a presença de microrganismos antagonistas, reduzindo seu inóculo potencial no solo (MARX et alii, 1984). Outros fatores como a origem e a idade do isolado utilizado também podem influenciar no desenvolvimento micorrízico (MARX, 1981).

No mundo todo, fungos ectomicorrízicos em vários tipos de inóculo têm sido introduzidos em solos deficientes, para fornecer árvores com ectomicorrizas adequadas

(MARX et alii, 1984; LE TACON et alii¹, e LANGLOIS & GAGNON², ambos citados por MARX et alii, 1992; MARX & CORDELL, 1989). Algumas espécies de fungos são mais benéficas que outras para as árvores, e, às vezes, mais eficientes que aqueles que ocorrem naturalmente em seus sítios (MARX et alii, 1992). Muitos trabalhos têm sido feitos na seleção, propagação, manipulação e manutenção de algumas das espécies de fungos mais convenientes para aumentar a sobrevivência e o crescimento das árvores (TRAPPE, 1977; MARX, 1980; MARX & CORDELL, 1989). São vários os critérios para seleção de um fungo; entre eles estão a capacidade fisiológica de formar abundantes ectomicorrizas em seedlings do hospedeiro desejado (MARX³, citado por MARX et alii, 1992; MARX, 1981), a habilidade de crescer rapidamente em cultura pura (MARX et alii, 1984), a capacidade do inóculo de sobreviver no solo por 4 a 6 semanas e a adaptação ecológica do fungo ao tipo de sítio e às condições ambientais (TRAPPE, 1977; MARX et alii, 1992). Muitos isolados de diferentes árvores hospedeiras e regiões devem ser testados ao menos inicialmente, para determinar o quanto de variação existe entre isolados (MARX³, citado por MARX, 1992; MARX, 1981; FRIES, 1987).

Pisolithus tinctorius após testado, foi considerado um bom fungo, pois tem uma boa distribuição, tanto geográfica quanto de árvores hospedeiras, tolera vários

¹ LE TACON, F.; GARBAYE, J.; BOUCHARD, D.; CHEVALIER, G.; OLIVER, J.M.; GUIMBERTEAU, J.; POITOU, N., and FROCHOT, H. Field results from ectomicorrhizal inoculation in France. Pp. 51-74 in M. Lalonde and Y. Piche (eds). Canadian Workshop on Micorrhizae in Forestry. CRBF Faculté de Foresterie et de Géodesi, Université Laval, Ste.-Foy, Quebec. 1988.

² LANGLOIS, C. G.; and GAGNON, J. The production of micorrhizal conifer seedlings in Quebec: the progression of the project. Pp. 9-13 in M. Lalonde and Y. Piche (eds), Canadian Workshop of Mycorrhizae in Forestry. CRBF Faculté de Foresterie et de Géodesi, Université Laval, Ste.-Foy, Quebec.

³ MARX, D. H. Sinthesis of ectomicorrhizae by diferent fungi on northern red oak seedlings. U.S. Departament of Agriculture Forest Service Research Note SE-282. Southeastern Forest Experiment Station, Asheville, N.C. 1979.

estresses ambientais, e é de fácil propagação e manipulação em cultura pura (MARX et alii, 1982; MARX et alii, 1984; MARX et alii, 1989; MARX & CORDELL, 1989). Além disso, a sobrevivência e o crescimento de seedlings de *Pinus* com ectomicorrizas de *P. tinctorius* é significativamente maior do que em seedlings com ectomicorrizas que ocorrem naturalmente, e as árvores com esse fungo toleram muito melhor os fatores ambientais estressantes do que as árvores-controle (MARX et alii, 1988). Segundo CASTELLANO (1990), 66 espécies de fungos ectomicorrízicos têm sido utilizadas experimentalmente para formar micorriza em 49 espécies de árvores, sendo que mais de 40% das publicações são sobre *P. tinctorius* em 29 espécies de árvores diferentes. Os testes iniciais e o desenvolvimento de inóculos vegetativos usados para fins comerciais e de pesquisa são relatados em vários trabalhos (MARX, 1980; MARX et alii, 1984; CASTELLANO & MOLINA, 1989; MARX & CORDELL, 1989). Essa fórmula de inóculo tem sido usada para formar micorriza em várias espécies de árvores, tais como *Abies*, *Carya*, *Picea*, *Pinus*, *Quercus*, *Eucalyptus*, *Castanea*, *Fagus*, e *Salix* (MARX, 1980; ALVAREZ & TRAPPE, 1983; MARX et alii, 1984; DIGHTON & MASON, 1985; MARX et alii, 1988).

2.2. Quantificação de ectomicorrizas e biomassa fúngica

Um procedimento tradicionalmente utilizado para a quantificação de infecções micorrízicas é o de contagem ou estimativa visual de extremidades de raízes micorrizadas (GRAND & HARVEY, 1982) sendo os resultados expressos em porcentagem do número total de extremidades de raízes. No entanto, esta técnica é considerada tediosa e subjetiva, pois não leva em conta o micélio extra-matricial, a infecção invisível a olho nu, e a influência da infecção micorrízica no sistema de raízes da planta, uma vez que uma planta micorrizada usualmente tem mais raízes que uma não infectada (MARX, 1990; NYLUND & WALLANDER, 1992). Têm sido observados casos em que a contagem das raízes indicando 100% de infecção micorrízica correspondeu a uma grande variedade de valores de biomassa fúngica medida por outros métodos (SALMANOVICZ & NYLUND, 1988).

Outra técnica utilizada é a de coloração de hifas ativas por diacetato de fluoresceína (SODERSTROM, 1977; GRAND & HARVEY, 1982). No entanto, as limitações deste método incluem a interferência do solo na coloração e a perda significativa de hifas viáveis durante a preparação das amostras, o que pode subestimar a biomassa fúngica (JOHNSON & MCGILL, 1990).

O crescimento do fungo na raiz micorrizada pode ser monitorado pela determinação de um componente químico característico do fungo em desenvolvimento. A maioria dos fungos tem parede celular contendo quitina (WU, L.C. & STAHMANN, 1975). Portanto, durante algum tempo foi utilizada a quantificação da quitina, para

estimar a biomassa fúngica em materiais de plantas infectadas (RIDE & DRYSDALE, 1972), em madeira em decomposição (SWIFT, 1973), em restos de folhas (FRANKLAND et alii, 1978), em grãos de cereais (NANDI, 1978), em madeira (BRAID & LINE, 1981), em ectomicorrizas (WHIPPS, 1987), e para estimar infecções micorrízicas (VIGNON et alii, 1986). No entanto, enquanto o conteúdo da quitina é proporcional à quantidade de parede celular, esta pode não ser proporcional à quantidade de citoplasma, que está normalmente concentrado nas extremidades das hifas, deixando a massa da hifa vacuolada (NYLUND & WALLANDER, 1992). Outra fonte de erros é a tendência do conteúdo de quitina variar com a idade do micélio (MATCHAM et alii, 1985). A extração da quitina é uma técnica laboriosa e demorada (JOHNSON & MCGILL, 1990; NYLUND & WALLANDER, 1992), apresentando problemas como interferência de componentes da raiz; como as hexosaminas (VIGNON et alii, 1986) e os aldeídos (PLASSARD et alii, 1983), além de ter uma baixa recuperação (52 a 87%) (JOHNSON & MCGILL, 1990). Segundo SEITZ et alii (1979), o método de quitina não detecta o crescimento fúngico antes de 48 horas de incubação. NEWELL et alii (1988) demonstraram que o método não faz distinção entre hifas vivas ou mortas, pois o conteúdo de quitina continua inalterado mesmo após a morte das raízes e hifas. Ao comparar alguns métodos de quantificação de biomassa microbiana no solo, GRANT & WEST (1986) concluíram que o uso de componentes ligados à parede celular, como a quitina, como indicadores de nível de biomassa fúngica é insatisfatório, pois esse composto também é encontrado em paredes celulares bacterianas e exoesqueletos de insetos. WEST et alii (1987), constataram que as alterações nos níveis de quitina não

foram proporcionais às alterações na biomassa fúngica, e seus resultados indicaram que uma grande porção da quitina medida foi derivada de matéria orgânica morta.

O método de detecção de enzimas extracelulares ligadas ao crescimento para detectar o desenvolvimento micelial de fungos em palha de milho compostada foi descrito por WOOD (1979), e tem sido usado para determinar o crescimento de fungos específicos em vários substratos, tais como *Aspergillus orizae* em arroz (AIDOO et alii, 1981) e *Agaricus bisporus* em grãos e meio líquido (MATCHAM et alii, 1985). Em um estudo subsequente (WOOD, 1980), a produção da enzima extracelular lacase pelo fungo *A. bisporus* em cultura líquida, variou significativamente entre diferentes meios de cultura. MATCHAM et alii (1985), relataram uma variação na produção da enzima lacase entre meios de cultura sólido e líquido, despertando dúvidas sobre o uso desse método para determinar com precisão quantidades desconhecidas de fungos em substratos sólidos.

Mais recentemente, surgiu a técnica de quantificação de biomassa fúngica através da determinação do teor de ergosterol (SEITZ et alii, 1977, 1979; GRIFFITHS et alii, 1985; MATCHAM et alii, 1985; SALMANOVICZ & NYLUND, 1988; MARTIN et alii, 1990).

2.3. O uso de ergosterol na quantificação de micorriza e biomassa fúngica

O ergosterol, 24 β - metilcolesta - 5,7,22 E trien 3 β - ol ou ergosta - 5,7,22 - trien - 3 β - ol, é um lipídeo da classe dos esteróides (fig 1), componente predominante da membrana celular da grande maioria dos fungos, enquanto que é ausente na maioria das plantas (HUANG et alii, 1985; WEETE et alii, 1985; WEETE, 1989; YOKOKAWA, 1992). É considerado a mais importantes das pró-vitaminas D e é sintetizado pelos fungos a partir de açúcares simples como a glucose (HUANG et alii, 1985). Moléculas de acetil-CoA sofrem condensação e reduções para formar mevalonato, que é convertido em esqualeno, que é por sua vez transformado em lanosterol, depois em 24-metileno-dihidrolanosterol, e finalmente em ergosterol (WEETE, 1989).

Figura 1 - Esteróis mais comuns. (A) nos fungos (ergosterol) e (B) nas plantas (sitosterol). R se refere à configuração no C-20 ou C-24. (C) estrutura do ergosterol.

Diferente dos esteróis das plantas superiores, como o sitosterol, o ergosterol (isolado primeiramente do fungo *Claviceps purpurea* causador do esporão do centeio) tem um cromóforo 5,7 diene, portanto, sua absorção específica de luz ultra violeta permite que ele seja caracterizado e quantitativamente estimado tanto por espectrofotometria (MARTIN et alii, 1990), quanto por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), utilizando um detector de ultra violeta com o comprimento de onda adequado (GOULSTON & MERCER, 1969; GRIFFITHS et alii, 1985).

Segundo NYLUND & WALLANDER (1992), o ergosterol é um bom indicador de crescimento fúngico pois pode proporcionar uma boa correlação com a biomassa metabolicamente ativa de um fungo, uma vez que é um componente da membrana citoplasmática. Os primeiros ensaios sobre a determinação de ergosterol foram feitos para investigar a invasão fúngica em grãos estocados (SEITZ et alii, 1977, 1979), após o que vários trabalhos sobre o assunto têm sido publicados, para estimar, por exemplo, a fração fúngica em detritos (LEE et alii, 1980; GRIFFITH & PERRY, 1994), o conteúdo de ergosterol em cereais infestados (CAHAGNIER et alii, 1983, 1993; GORDON & WEBSTER, 1984; IBTISAM et alii, 1992; REGNER et alii, 1994); a resistência foliar a um fungo patogênico (GRIFFITHS et alii, 1985), a biomassa fúngica do solo (MATCHAM et alii, 1985; GRANT & WEST, 1986; WEST et alii, 1987; STAHL et alii, 1995), a biomassa fúngica em plantas em decomposição (NEWELL et alii, 1987, 1988; GESSNER et alii, 1991; GESSNER & CHAUVET, 1993; NEWELL, 1994); a biomassa fúngica em *Pinus* situados em florestas (FRITZE et alii, 1994), em

micélios extramatriciais de fungos endomicorrízicos MA (FREY et alii, 1994) e em estudos sobre ectomicorrizas (NYLUND & WALLANDER, 1992).

Os trabalhos pioneiros no uso do ergosterol (SEITZ et alii, 1977, 1979) utilizaram metodologias que envolviam a homogeneização das amostras e extração em metanol, filtragem, saponificação de extratos com hidróxido de potássio (KOH), fracionamento por um solvente orgânico (éter de petróleo) e quantificação por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Várias modificações desse método foram relatadas, tais como o fracionamento da amostra saponificada com pentano, microfiltragem e dissolução em metanol (NEWELL et alii, 1987), a extração feita em etanol, com a adição, durante a saponificação, de um cristal de ácido pirogálico como anti-oxidante e fracionamento com hexano (SALMANOVICZ & NYLUND, 1988), e a extração de pequenas amostras em etanol absoluto utilizando almofarizes e centrifugação, sendo o sobrenadante analisado sem outro tratamento posterior (MARTIN et alii, 1990). DAVIS & LAMAR (1992), ao avaliar dois métodos, modificados de SEITZ et alii (1979), já mencionado anteriormente, e de GRIFFITHS et alii (1985), onde a extração e saponificação são combinadas, e o ergosterol é quantificado em soluções de metanol, demonstraram que o segundo procedimento de extração proporciona melhores níveis de precisão e recuperação. Recentemente, PADGETT & POSEY (1994) avaliaram várias técnicas de ergosterol e relataram que o tratamento com metanol é melhor que o etanol e que o KOH aumenta a recuperação do método.

A primeira aplicação do método de ergosterol na pesquisa de ectomicorrizas foi relatada por SALMANOVICZ & NYLUND (1988). WALLANDER & NYLUND

(1989, 1991, 1992) realizaram estudos sobre os efeitos de fósforo e nitrogênio no desenvolvimento da ectomicorriza em *Pinus*. JOHNSON & MCGILL (1990, 1991) compararam as técnicas de ergosterol e quitina para quantificar infecção ectomicorrízica em *Pinus contorta*. MARTIN et alii (1990) testaram um método de extração de ergosterol simplificado em vários isolados de fungos ectomicorrízicos e em ectomicorrizas de *Pisolithus tinctorius* com *Eucalyptus globulus*. ANTIBUS & SINSABAUGH (1990), examinaram a variação no conteúdo de ergosterol de nove fungos ectomicorrízicos, cultivados em diferentes temperaturas e fontes de carbono. WALLANDER et alii (1994), analisaram o efeito de vários tratamentos no desenvolvimento micorrízico em *Pinus silvestris*. VAN PRAAG et alii (1994) verificaram variações no conteúdo de ergosterol de raízes micorrizadas de *Picea* e *Fagus*.

A eficiência do uso de ergosterol na determinação do crescimento fúngico foi demonstrada em vários trabalhos. Segundo SEITZ et alii (1979), a relação entre a quantidade inicial de ergosterol em um substrato, e o aumento nessa quantidade causada pelo crescimento do fungo, determina a validade do uso desse componente como um indicador de crescimento do fungo, pois a baixa produção de ergosterol pelo fungo *Aspergillus amstelodami* em seu trabalho refletiu um menor crescimento daquela espécie. Sugere ainda que o ergosterol é um indicador mais sensível ao crescimento inicial do fungo do que a quitina, podendo ser detectado após 24 horas de incubação, além de ser um método mais rápido e fácil. MATCHAM et alii (1984, 1985), ao comparar os métodos de quitina e ergosterol, demonstraram que o segundo é menos sujeito a interferências químicas que o primeiro, e portanto pode ser aplicado a vários substratos.

Segundo SCHUNURER (1993) as mudanças no conteúdo de ergosterol se relacionam com as mudanças no crescimento das hifas, em substratos sólidos. A análise do conteúdo de ergosterol de micorrizas vivas e mortas formadas em plantas cultivadas in vitro, revelou que o ergosterol desapareceu inteiramente das raízes mortas (NYLUND & WALLANDER, 1992), o que, segundo NEWELL et alii (1988) demonstra a eficiência do método em distinguir entre a biomassa fúngica ativa e inativa. A degradação do ergosterol das amostras durante o processo pela luz ou outros fatores, são desprezíveis, por conseguinte, a reprodutibilidade do método é boa (NEWELL et alii, 1988; JOHNSON & MCGILL, 1990). De acordo com JOHNSON & MCGILL (1990), a recuperação obtida é de 93 a 97%, e, visto que as plantas não têm ergosterol, não há interferência do substrato na sensibilidade do método, podendo ser analisados grandes volumes de amostras com poucos componentes fúngicos. Utilizando-se a técnica de MARTIN et alii (1990), amostras menores que 25 mg de peso seco podem ser utilizadas, e uma calibragem entre 0,1 a 0,5µg é adequada para a maioria dos instrumentos. Recentemente, NEWELL (1994), comparando várias espécies de fungos decompositores, constatou que o conteúdo de ergosterol foi correlacionado à massa micelial, o mesmo ocorrendo em STAHL et alii (1995).

NYLUND & WALLANDER (1992) sugeriram que as deficiências básicas da aplicabilidade da análise de ergosterol para quantificação de ectomicorrizas, são aquelas que dizem respeito às variações entre espécies e isolados. Porém, em culturas axênicas, ou em estudos onde apenas uma espécie é inoculada, esses problemas são insignificantes.

2.4. Variações intra e interespecíficas no conteúdo de ergosterol do micélio fúngico

Pesquisas têm revelado que ocorrem variações nos níveis de ergosterol entre diferentes isolados da mesma espécie de fungos, entre diferentes espécies e condições de cultivo (NYLUND & WALLANDER, 1992). OLSEN (1973), ao estudar fungos patogênicos e saprófitas, encontrou valores que vão de 1,0 a 7,0 mg de ergosterol/g de peso seco do micélio fúngico. SEITZ et alii (1979) analisaram duas espécies de *Aspergillus* e uma de *Alternaria*, cultivados em arroz triturado úmido e em culturas líquidas, e não detectaram variações significantes, nem entre espécies (2,3 a 5,9 mg/g de micélio), nem entre diferentes substratos e períodos de incubação, pois alcançaram níveis de ergosterol relativamente constantes após dois dias de cultivo, mantidos até o fim do período de estudo de 3 semanas. MATCHAM et alii (1985), trabalhando com *Agaricus bisporus* em culturas líquidas e em grãos de centeio autoclavados, constataram que não houve diferenças significativas entre o conteúdo de ergosterol dos micélios cultivados nos dois substratos, após 30 dias de incubação e entre os vários isolados testados (1,9 a 2,3 µg/mg de micélio).

No entanto, HUANG et alii (1985) ao estudarem a composição de esteróides em cogumelos comestíveis, encontraram grande variação nos níveis de ergosterol entre as seis espécies analisadas (entre 0,1 e 4,7mg/g de micélio). Além disso, relataram a variação do ergosterol de acordo com a parte do cogumelo e com o estágio de desenvolvimento para a espécie *Volvariella volvacea*, e diferenças grandes entre isolados

de *Lentinus edodes*. NEWELL et alii (1987), utilizando três espécies de ascomicetos decompositores, cultivados em meio líquido, em pedaços de folhas e em extratos aquosos de folhas, relataram que o conteúdo de ergosterol de *Phaeosphaeria typharum* variou muito de acordo com o substrato utilizado, e que condições que induzem à autólise parcial dos micélios tiveram efeito forte nos níveis de ergosterol. Encontraram também grandes variações entre as espécies, com valores entre 4,2 a 9,9µg de ergosterol/mg de micélio, sendo que *Buergenerula spartina* alcançou uma concentração de 16,4µg/mg de micélio em cultura líquida. Também NOUT et alii (1987), ao analisarem o conteúdo de ergosterol de *Rhizopus oligosporus* em substratos artificiais líquidos e sólidos, notaram uma maior produção de ergosterol em substrato sólido (variações de 2,0 a 24µg/mg de peso seco). Adicionalmente, quando o fungo cresceu em substrato natural (grãos de soja), o conteúdo de ergosterol foi alto (60 a 90µg/mg de peso seco), e decresceu à medida que aumentava o tempo de incubação. SALMANOVICZ & NYLUND (1988) ao estudarem quatro fungos ectomicorrízicos de *Pinus*, verificaram que em culturas puras cultivadas em meio líquido, o conteúdo de ergosterol foi similar nos diferentes fungos e variou pouco com o tempo de incubação, a não ser em culturas de muitos meses. No entanto, o corpo de frutificação de *Amanita muscaria* apresentou o dobro de ergosterol de sua cultura pura. Devido a pouca variação entre as espécies de fungos ectomicorrízicos, SALMANOVICZ & NYLUND (1988) concluíram que a intensidade de uma infecção micorrízica pode ser estimada sem considerar a identidade dos micobiontes participantes, em análises rotineiras de material de campo.

Contrariamente, MARTIN et alii (1990), ao quantificarem ergosterol em raízes micorrizadas, constataram grandes variações entre diferentes espécies e isolados. No fungo *Pisolithus tinctorius*, os valores de ergosterol entre isolados de 2,0 a 8,4 µg/mg de peso fresco, e entre os isolados de 2 espécies de *Laccaria*, o ergosterol variou largamente tanto inter como intraespecificamente. Também, quando cultivados em meio de cultura sólido, o ergosterol variou bastante com a idade do micélio (0,2 a 1,6 µg/mg de peso fresco). Do mesmo modo, ANTIBUS & SINSABAUGH (1990) ao estudarem o conteúdo de ergosterol de onze isolados de nove espécies de fungos ectomicorrízicos encontraram valores de 3,0 a 10,0µg de ergosterol/ mg de matéria seca.

WALLANDER et alii (1992) verificaram que a aplicação do método de ergosterol traz alguns problemas. Fungos diferentes contém quantidades diferentes de ergosterol, o que significa que os valores de ergosterol não podem ser transformados em biomassa quando o fungo analisado é desconhecido (fungos diferentes podem ter entre 1 a 50 µg de ergosterol /mg de micélio, e em raízes ectomicorrizadas coletadas no campo foram encontradas variações entre 0,68 a 1,43 µg/mg para cinco tipos de micorrizas). Além disso, o conteúdo de ergosterol em alguns estudos se mostrou variável, devido a diferentes condições de cultivo, e à concentração de ergosterol ser maior na periferia da colônia (onde há mais hifas viáveis) do que no centro (onde o fungo já começou a morrer). As mesmas conclusões foram relatadas por GESSNER & CHAUVET (1993), que verificaram, em oito espécies de hifomicetos aquáticos, níveis de ergosterol variando entre 2,3 a 11,5 µg/ mg de matéria seca de micélio. Dados similares foram coletados por BERMINGHAM et alii (1995), que detectaram, em hifomicetos aquáticos, variações no

conteúdo de ergosterol entre espécies e entre diferentes períodos de incubação, relacionando estas com a existência de hifas de diferentes idades, concluindo que com o aumento do tempo de cultivo, aumenta a quantidade de hifas senescentes.

3. Material e Métodos

Os experimentos do presente trabalho foram conduzidos nos laboratórios do Departamento de Fitopatologia e do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), ambos pertencentes à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” em Piracicaba.

3.1. Experimentos realizados

Foram feitas análises de teor de ergosterol em seis isolados de *Pisolithus tinctorius* e um de *Rhizopogon* sp (experimento 1); em dois isolados de *P. tinctorius* cultivados em dois substratos diferentes (experimento 2); e em dois isolados de *P. tinctorius* após três períodos distintos de incubação em meio líquido (experimento 3).

3.2. Obtenção e cultivo dos isolados

Seis isolados de *P. tinctorius* de eucalipto foram obtidos diretamente da micoteca do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (tabela 1). O isolado 185 foi obtido da coleção do Dr. Donald H. Marx

(Forestry Sciences Laboratory, Athens, Georgia, EUA) e o de *Rhizopogon* (isolado de *Pinus* sp.) foi cedido pela professora Vetúria Lopes de Oliveira do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (tabela 1).

Os isolados de *P. tinctorius* e *Rhizopogon* sp foram cultivados em meio sólido, o “Modified Melin-Norkrans” (MMN) (tabela 2), a 25°C, no escuro, durante um mês, para produção de inóculo. Os isolados 1604 e 185 foram escolhidos para os experimentos 2 e 3, enquanto que no experimento 1 foram utilizadas todas as culturas de *P. tinctorius* listadas na tabela 1, e o isolado de *Rhizopogon*.

Tabela 1 - Designação, procedência e ano de isolamento dos isolados de *Pisolithus tinctorius* utilizados.

ISOLADO	ESPÉCIE	HOSPEDEIRO	LOCAL E DATA DO ISOLAMENTO
185	<i>P. tinctorius</i>	<i>Pinus taeda</i>	Oklahoma, EUA (1975)
1603	<i>P. tinctorius</i>	<i>Eucalyptus</i> sp	Mogi-Guaçu SP (1988)
1604	<i>P. tinctorius</i>	<i>E. grandis</i>	Rio Claro, SP (1988)
1609	<i>P. tinctorius</i>	<i>E. citriodora</i>	São Manoel, SP (1993)
1612	<i>P. tinctorius</i>	<i>E. grandis</i>	Mogi-Guaçu, SP (1993)
1613	<i>P. tinctorius</i>	<i>E. grandis</i>	Altinópolis, SP (1993)

Após o período de incubação, foram retirados das colônias discos miceliais de 3 a 5 mm de diâmetro e inoculados em frascos de 125 ml contendo 50 ml de MMN

Após o período de incubação, foram retirados das colônias discos miceliais de 3 a 5 mm de diâmetro e inoculados em frascos de 125 ml contendo 50 ml de MMN líquido com a distribuição de 5 discos por frasco. Foram feitas 5 repetições (frascos) por isolado. Adicionalmente, para o experimento 2, foram inoculados 3 discos miceliais por placa, em placas de petri com diâmetro de 45 mm e altura de 20 mm contendo uma mistura de perlita (material processado a partir de rocha vulcânica) (tabela 3) e MMN líquido na proporção aproximada de 3:1 (V:V), com objetivo de criar um substrato sólido úmido para o crescimento do fungo. A perlita é previamente seca em estufa (160°C por 20 minutos) e pesada juntamente com a placa sendo o MMN líquido adicionado após a pesagem. Foram feitas cinco repetições (placas) por isolado.

Para todos os experimentos foram empregadas as mesmas condições de cultivo: temperatura de 25°C, no escuro, com cultura estacionária. Para os experimentos 1 e 2, o tempo de incubação dos frascos foi de um mês, enquanto para o experimento 3 foram usados os tempos de incubação de 4,5 e 6 semanas. Para o experimento 1 o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, enquanto para os experimentos 2 e 3 foram feitos delineamentos fatoriais de 2 x 2 e 2 x 3 respectivamente. Para todos os experimentos foram feitas 5 repetições por isolado.

Tabela 2 - Composição do meio de cultura MMN.

INGREDIENTES	CONCENTRAÇÃO
CaCl ₂	0,05 g
NaCl	0,025 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,25 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,15 g
FeCl ₃ (1%)	1,2 ml
Tiamina	100 µg
Extrato de malte	3 g
Sacarose	10 g
Agar (opcional)	15 g
Água destilada	1000 ml

Fonte: MARX (1969).

Tabela 3 - Análise química da perlita utilizada no experimento 2.

	pH	MO (%)	P (ppm)	K**	Ca**	Mg**	H+Al**	S.B.**
Perlita	6,2	0,7	24	0,08	4,9	0,2	0,8	5,2

* Laboratório de Análises de Solos - Departamento de Ciência do Solo,

ESALQ - USP

** meq/100 cm³

3.3 Preparação das amostras

Os procedimentos básicos envolvem a extração, saponificação, fracionamento e purificação das amostras, segundo protocolo de GALLI, M. (1996), adaptado de NYLUND & WALLANDER (1992). Tais procedimentos foram precedidos de liofilização (secagem em temperatura e pressão reduzidas) do material micelial, seguida de pesagem (determinação do peso seco). No caso do experimento 2 com perlita, a pesagem foi feita com o material ainda nas placas, e o peso do micélio calculado por diferença de peso em relação à pesagem feita antes do cultivo.

3.3.1. Extração

No caso da extração do ergosterol do micélio cultivado em meio líquido, foi feita a fragmentação do tecido fúngico em almofariz, após adição de nitrogênio líquido. Aos fragmentos foram adicionados 3 ml de solução extratora (etanol 95%), em tubos de ensaio. Para a extração do ergosterol do micélio cultivado em meio com perlita (experimento 2), após a pesagem do material, o conteúdo das placas foi transferido para frascos de 200 ml e submetido a agitação durante 2 horas em 40 ml de solução extratora (etanol 95% + 1 cristal de ácido pirogálico), sendo o sobrenadante então colocado em separado. Mais 15 ml de solução extratora foram adicionados ao precipitado (contendo material fúngico e perlita), seguido de nova agitação (por 5 minutos) e de nova retirada do sobrenadante, que foi então juntado ao primeiro sobrenadante extraído. Esta solução

foi submetida a centrifugação por 10 minutos a 11.000 rpm (centrífuga Sorvall SS-4), após o que o sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio.

As etapas de saponificação, fracionamento e purificação foram iguais para todos os experimentos. Para a saponificação, a cada tubo de ensaio contendo a solução extraída foi adicionado 1 ml de KOH 60% e depois aquecido a 90°C por 30 minutos.

Foram adicionados 4 ml de hexano + 1 ml de água à mistura saponificada, e o tubo foi agitado por um minuto, para que houvesse fracionamento. A camada superior de hexano, que contém o ergosterol, foi transferida para tubos de 15 ml. Depois foram adicionados mais 3 ml de hexano à mistura saponificada e, após agitação de 30 segundos, a camada superior foi transferida e juntada à fase hexânica retirada anteriormente (tubos de 15 ml).

Os tubos contendo 7 ml da fase hexânica que contém o ergosterol foram colocados em banho-maria a 60°C por 4 a 5 horas, para que houvesse a evaporação do hexano. Após a evaporação, foram adicionados, a cada tubo, 5 ml de metanol e foram aquecidos novamente em banho-maria a 60°C por alguns minutos e depois agitados para a solubilização do ergosterol. Para a filtragem das amostras foram utilizadas seringas com filtros de poros com 0,4 µm. As amostras obtidas foram protegidas contra a luz e estocadas por 24 horas em geladeira para análise posterior.

3.4. Determinação do teor de ergosterol

A análise do teor de ergosterol das amostras e da solução padrão (com concentração de 1 µg/5 µl de metanol) foram feitas em cromatógrafo Shimatzu LC 60 A equipado com coluna Supelco[®] LC 18-150 x 4,5 mm para separação e detecção de ergosterol e com detector de UV. Os parâmetros utilizados foram os seguintes: fluxo de solvente (etanol 100%) a 1 ml/min, leitura de densidade óptica a 282nm, temperatura ambiente. O ergosterol apresenta tempo de retenção de 4,3 minutos. O volume conhecido de amostra injetada foi de 5 ou 10 µl.

4. Resultados e Discussão

4.1. Experimento 1

Na determinação do teor de ergosterol das duas espécies de fungos, verificou-se haver diferenças significativas entre os isolados de *P. tinctorius* (2,4 a 6,2 µg/mg) e *Rhizopogon* sp (11 µg/mg) (tabela 4, figura 2, apêndice 1). Estes dados concordam com trabalhos de outros autores que relataram variações interespecíficas no conteúdo de ergostérol de vários fungos: OLSEN (1973), valores de 1,0 a 7,0 mg/g de micélio; HUANG et alii (1985), 0,1 a 4,7 mg/g; NEWELL et alii (1987), 4,2 a 9,9 µg/mg; MARTIN et alii (1990), 2,0 a 15,0 µg/mg; ANTIBUS & SINSABAUGH (1990), 3,0 a 10,0 µg/mg; WALLANDER et alii (1992), 0,68 a 1,43µg/mg; GESSNER & CHAUVET (1993), 2,3 a 11,5 µg/mg; BERMINGHAM et alii (1995), variações de 0,3 a 2,0µg/mg de micélio fúngico. Porém, alguns autores relataram pouca variação no teor de ergosterol

entre diferentes fungos, como SEITZ et alii (1979), 2,3 a 5,9 mg/g de micélio, e SALMANOVICZ & NYLUND (1988), 2,88 a 3,59 mg/g de micélio.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o conhecimento da espécie de fungo participante da ectomicorriza é um importante fator na quantificação da infecção no campo, contrariando as conclusões de SALMANOVICZ & NYLUND (1988) que não consideraram importante este fator.

Houve diferenças significativas entre os isolados de *P. tinctorius*, cujo conteúdo de ergosterol variou de 2,4 a 6,2 µg/mg de peso seco (tabela 4). Os resultados estão de acordo com os de HUANG et alii (1985), que relataram variações entre isolados de *L. edodes* (0,06% a 0,27% da matéria seca), e com os de MARTIN et alii (1990) que verificaram níveis de ergosterol de 2,0 a 8,4 µg/mg de micélio entre isolados de *P. tinctorius*, e entre isolados de *Laccaria*, de 0,9 a 15,0 µg/mg de micélio. No entanto, MATCHAM et alii (1985) relataram pouca variação entre isolados de *A. bisporus* (1,9 a 2,3 µg/mg).

Os resultados do presente trabalho mostram que o uso da quantificação de ergosterol para medir o grau de infecção micorrízica em condições de campo sem conhecimento anterior do isolado utilizado é inadequado.

Tabela 4 - Biomassa micelial e teor de ergosterol produzidos por diferentes isolados de *Pisolithus tinctorius* (Pt) e de um isolado de *Rhizopogon* sp (R) cultivados em meio líquido (MMN) durante 4 semanas.

ISOLADOS	PESO DA MATÉRIA SECA (mg)	CONCENTRAÇÃO DE ERGOSTEROL (μ g de ergosterol/mg de micélio)*
Pt 185	117,8	6,2 b
Pt 1603	84,2	3,4 d
Pt 1604	86,9	5,6 b
Pt 1609	72,6	4,7 c
Pt 1612	152,5	2,4 e
Pt 1613	80,5	4,2 c
R	41,7	11,0 a

* Médias de 5 repetições (frascos) por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%. C.V. = 6,82%.

Figura 2 - Cromatogramas representativos de extratos miceliais dos isolados de *P. tinctorius* (B - G) e *Rhizopogon* sp (A). A = *Rhizopogon*; B = 1604; C = 185; D = 1609; E = 1612; F = 1603; G = 1613; e = ergosterol

4.2. Experimento 2

O teor de ergosterol dos micélios cultivados em MMN líquido foi de aproximadamente o dobro do teor de ergosterol obtido com os micélios cultivados em MMN líquido + perlita, para ambos os isolados testados (tabela 5, apêndice 2). Estes resultados não concordam com os de NOUT et alii (1987), que relataram uma maior produção de ergosterol em meio sólido (20 µg/mg de micélio) que em meio líquido (15 µg/mg de micélio) após 7 dias de incubação. Porém, em seu estudo foi utilizado meio de cultura sólido com ágar, para o fungo *Rhizopus oligosporus*. Diferentemente, o presente trabalho utilizou perlita e meio líquido para criar um substrato sólido úmido para o cultivo de *Pisolithus tinctorius*, durante o período de um mês.

Tabela 5 - Biomassa micelial e quantidade de ergosterol produzidas por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* cultivados em substrato líquido (MMN) e sólido (MMN + perlita) durante um mês

ISOLADOS	MEIO LÍQUIDO		MEIO SÓLIDO	
	Biomassa (mg)	Concentração de ergosterol (µg/mg de micélio)*	Biomassa (mg)	Concentração de ergosterol (µg/mg de micélio)*
185	113,0	5,4 a	75,3	2,7 b
1604	79,9	5,9 a	41,5	2,6 b

*Médias de 5 repetições por tratamento. Médias na horizontal seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%. C.V = 7,10%.

4.3. Experimento 3

Houve um aumento significativo na concentração de ergosterol do isolado 1604 no período de 5 semanas, seguido de uma queda após 6 semanas. Os resultados concordam com os de NOUT et alii (1987), MARTIN et alii (1990) e BERMINGHAM et alii (1995), que detectaram um decréscimo no teor de ergosterol ao aumentar o período de incubação. Este efeito foi menos pronunciado para o isolado 185 (tabela 6, apêndice 3). Estes dados concordam com os de SEITZ et alii (1979), que constataram que após o segundo dia de cultivo houve pouca variação no teor de ergosterol entre períodos de incubação, até o final de estudo de três semanas (aproximadamente 2,9 a 3,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco para o fungo *A. amstelodami*), e com os de SALMANOVICZ & NYLUND (1988), que relataram variações entre períodos de incubação de 3,04 a 3,59 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco para o fungo *H. crustiforme* e 3,06 a 3,31 $\mu\text{g}/\text{mg}$ para o fungo *L. laccata*.

Uma vez que o crescimento micelial durante as seis semanas foi contínuo (aumentando o peso seco) (tabela 6), pode ter ocorrido uma interrupção na produção de ergosterol pelo micélio mais antigo da cultura e/ou uma degradação, após a quinta semana, do ergosterol já produzido, ou ainda, uma exaustão do meio de cultivo.

“A dificuldade da aplicação do método de ergosterol é devida à variação do teor de ergosterol que depende das condições de crescimento do fungo e das variações intra e interespecíficas. Porém, em culturas axênicas, ou em estudos onde a micorriza é formada por apenas uma espécie de fungo, esses problemas são desprezíveis, desde que

se conheça previamente a influência dos outros fatores como o meio de cultivo e o tipo de substrato, sobre a cultura.

Recomenda-se a realização de estudos visando o comportamento de espécies e isolados de fungos ectomicorrízicos em culturas puras para auxiliar no entendimento futuro da intensidade da infecção micorrízica estimada pelo teor de ergosterol.”

Tabela 6 - Biomassa micelial e ergosterol produzidos por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* cultivados em meio líquido (MMN) durante 4, 5 e 6 semanas.

ISOLADO	PERÍODO DE INCUBAÇÃO					
	4 semanas		5 semanas		6 semanas	
	Biomassa (mg)	Ergosterol (µg/mg de peso seco)*	Biomassa (mg)	Ergosterol (µg/mg de peso seco)*	Biomassa (mg)	Ergosterol (µg/mg de peso seco)*
185	117,6	6,4 b	127,8	6,9 a	146,3	6,8 ab
1604	49,6	5,5 c	89,7	6,8 a	105,3	6,0 b

* Médias de 5 repetições. Médias na horizontal seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%. C.V. = 4,10%

Conclusões

De acordo com os resultados do presente trabalho, pôde-se concluir o seguinte:

1 - O conteúdo de ergosterol do micélio variou significativamente entre isolados de *Pisolithus tinctorius*.

2 - Houve diferença significativa no teor de ergosterol entre os fungos *Pisolithus tinctorius* e *Rhizopogon* sp.

3 - O teor de ergosterol do micélio de *P. tinctorius* foi influenciado pelo substrato utilizado para seu cultivo. A utilização do substrato com perlita causou redução na produção de ergosterol, em relação ao substrato líquido, pelos isolados testados.

4 - O tempo de incubação, dependendo do isolado utilizado, exerceu influência significativa no teor de ergosterol do micélio de *P. tinctorius*, aumentando-o ou diminuindo-o após algumas semanas de cultivo.

Referências Bibliográficas

1. AIDOO K.E.; HENDRY , R.; WOOD, B.J.B. Estimation of fungal growth in a solid substrate fermentation system. **European Journal of Applied Microbiology**, v. 2, nº 1, p. 6-9, apr. 1981.
2. ALVAREZ, I.F. & TRAPPE, J.M. Effects of application a rate and cold soaking pretreatment of *Pisolithus* spores on effectiveness as nursery inoculum on western conifers. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 13, nº 3, p. 533-37, jun. 1983.
3. ANTIBUS, R.K. & SINSABAUGH, R.L. Quantification of fungal biomass in micorrhizae by ergosterol analysis. In NORTH AMERICAN CONFERENCE OF MYCORRHIZAE, 8, Jackson, 1990. **Abstracts**. Jackson: University of Wyoming, Agricultural Experiment Estation, 1990.
4. BERMINGHAM, S.; MALTBY, L.; COOKE, R. A critical assessment of the validity of ergosterol as an indicator of fungal biomass. **Mycological Research**, v.99, nº 4, p. 479-84, apr. 1995.
5. BRAID, G.H. & LINE, M.A. A sensitive chitin assay for the estimation of fungal biomass in hardwoods. **Holzforschung**, v.35, nº 1, p. 10-5, jan. 1981.

6. CAHAGNIER, B.; MOLARD, R.D.; POISSON, J. Evolution of the ergosterol content of cereal grains during storage. **Sciences des Aliments**, v.3, n° 2, p.219-44, jun.1983.
7. CAHAGNIER, B.; MOLARD, R.D.; LESAGE, L. Mould growth and conidiation in cereal grains as affected by water activity and temperature. **Letters in Applied Microbiology**, v. 17, n° 1, p. 7-13, jul. 1993.
8. CASTELLANO, M.A. Outplanting performances of micorrhizal inoculated seedlings: a review. **New Forests**. In Proceedings of the 8th North American Conference on Mycorrhizae, Jackson Wyoning, 1990. p.49.
9. CASTELLANO, M.A.; MOLINA, R. Mycorrhizae. In: LANDIS,T.D; TINUS, R.W.; McDONALD, S.E.; BARNETT, J.P.ed **The Container Tree Nursery Manual**. Agriculture Handbook 674. Washington, D.C.: Department of Agriculture Forest Service. 1989. v. 5, cap. 2, p. 101-67.
10. CASTELLANO, M.A. & TRAPPE, J.M. Ectomycorrhizal formation and plantation performance of Douglas fir nursery stock inoculated with *Rhizopogon* spores. **Canadian Journal of Forest Research**, v.15, n° 4, p. 613-17, aug. 1985.
11. 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. 189-98, mar. 1992.
12. DIGHTON, J. & MASON, P.A. Mycorrhizal dynamics during forest tree development. In: MOORE, D.; CASSELTON, L.A.; WOOD, D.A.;

- FRANKLAND, J.C. ed **Developmental Biology of Higher Fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 1985. p. 117-39.
13. EKWEBELAM, S.A. & REID, C.P.P. Effect of light, nitrogen, fertilization, and mycorrhizal fungi on growth and photosynthesis of lodgepole pine seedlings. **Canadian Journal Forest Research**, v.13, n° 6, p.1099-106, dec. 1983.
14. FRANCE, R.C. & REID, C.P.P. Interactions of nitrogen and carbon in the physiology of ectomycorrhizae. **Canadian Journal of Botany**, v. 61, n° 3, p.964-84, mar. 1983.
15. FRANKLAND, J.C.; LINDLEY, D.K.; SWIFT, M.J. A comparison of two methods for the estimation of mycelial biomass in leaf litter. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 10, n° 4, p. 323-33, apr. 1978.
16. FREY, B.; BUSER, H.R.; SCHUEPP, H. Identification of ergosterol in vesicular-arbuscular mycorrhizae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 13, n° 4, p.229-34, apr. 1992.
17. FREY, B.; VILARINO, H.S.; ARINES, J. Chitin and ergosterol content of extraradical and intraradical mycelium of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n° 6, p. 711-17, jun. 1994.
18. FRIES, N. Somatic incompatibility and field distribution of the ectomycorrhizal fungus *Suillus luteus* (Boletaceae). **New Phytologist**, v. 107, n° 4, p. 735-9, dec. 1987.

19. FRITZE, H.; SMOLANDER, A.; LEVULA, T.; KITUNE, N.V.; MALKONEN, E.
Wood-ash fertilization and fire treatments in a Scots pine forest stand: Effects on the organic layer, microbial biomass and microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, v. 17, nº1, p. 57-63, jan. 1994.
20. GALLI, M.A. Influência de fontes de matéria orgânica na formação de ectomicorizas em mudas de *Eucalyptus cidriodora* inoculados com *Pisolythus tinctorius*. Piracicaba. Jul. 1996. 89 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).
21. GESSNER, M.O.; BAUCHROWITZ, M.A.; ESCAUTIER, M. Extraction and quantification of ergosterol as a measure of fungal biomass in leaf litter. **Microbial Ecology**, v. 22, nº 3, p. 285-91, may. 1991.
22. GESSNER, M.O. & CHAUVET, E. Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 59, nº 2, p. 502-7, feb. 1993.
23. GORDON, T. R. & WEBSTER, R.K. Evaluation of ergosterol as an indicator of infestation of barley seed by *Drechslera graminea*. **Phytopathology**, v. 74, nº 9, p. 1125-7, sep. 1984.
24. GOULSTON, G. & MERCER, E.I. Ergosta - 5,7,24(28) - trien - 3 β - ol, a new intermediate in ergosterol biosynthesis in *Phycomyces blakesleeanus*. **Phytochemistry**, v.8, nº 10, p.1945-8. 1969.
25. GRAND, L.F. & HARVEY, A.E. Quantitative measurement of ectomycorrhizae on plant roots. In: SCHENK, N.C. ed, **Methods and Principles of Mycorrhizal**

- Research.** St. Paul, Minnesota. The American Phytopathological Society. 1982.
Cap.14, p. 157-64.
26. GRANT, W. D. & WEST, A.W. Measurement of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine in soil: evaluation as indicators of microbial biomass. **Journal of Microbiological Methods**, v.6, n° 11, p. 47-53, oct. 1986.
27. GRIFFITH, M.B. & PERRY, S.A. Fungal biomass and leaf litter processing in streams of different water chemistry. **Hydrobiologia**, v. 294, n° 1, p. 51-60, dec. 1994.
28. GRIFFITHS, H.M.; JONES, D.G.; AKERS, A. A bio-assay for predicting the resistance of wheat leaves to *Septoria nodorum*. **Annals of Applied Biology**, v. 107, n° 2, p.293-300, oct. 1985.
29. HUANG, B.H.; YUNG, K.H.; CHANG, S.T. The sterol composition of *Volvariella volvacea* and other edible mushrooms. **Mycologia**, v.77, n° 6, p.959-63, nov/dec. 1985.
30. IBTISAM, E.T.; HARRIS, D.; MAGAN, N. The relationship between fungal growth and ergosterol content of wheat grain. **Mycological Research**, v. 96, n° 11, p. 965-70, nov. 1992.
31. JOHNSON, B.N. & MCGILL, W.B. Comparison of ergosterol and chitin as quantitative estimates of mycorrhizal infection and *Pinus contorta* seedlings response to inoculation. **Canadian Journal Forest Research**, v. 20, n° 6, p.1125-31, dec. 1990.

32. JOHNSON, B.N. & MCGILL, W.B. Ontological and enviromental influences on ergosterol content and activities of polyamine biosynthesis enzymes in *Hebeloma crustiforme* mycelia. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, n° 10, p.682-89, oct. 1990.
33. LAST, F.T.; PELHAM, J.; MASON, P.A.; INGLEBY, K. Influence of leaves on sporophore production by fungi forming sheathing mycorrhizas with *Betula* ssp. **Nature**, v. 280, n° 5718, p. 168-69, 12 jul. 1979.
34. LEE, C.; HOWARTH, R.W.; HOWES, B.L. Sterol in decomposing *Spartina alterniflora* and the use of ergosterol in estimating the contribution of fungi to detrital nitrogen. **Limnology and Oceanography**, v.25, n° 2, p. 290-303, mar. 1980.
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. 1059-64, dec. 1990.
36. MARX, D.H. The influence of citotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, v. 59, n° 3, p. 153-63, mar. 1969.
37. MARX, D.H. Ectomycorrhizal fungus inoculations: a tool for improving forestation practices. In: MIKOLA, P. (ed). **Tropical Mycorrhiza Research**. Oxford, Claredon Press, 1980, p. 13-71.

38. MARX, D.H. Variability in ectomycorrhizal development and growth among isolates of *Pisolithus tinctorius* as affected by source, age, and reisolation. **Canadian Journal of Forest Research**, v.11, n° 1, p. 168-74, feb. 1981.
39. MARX, D.H. Soil pH and nitrogen influence on *Pisolithus* ectomycorrhizae development and growth of loblolly pine seedlings. **Forest Science**, v.36, n° 2, p. 224-45, jun. 1990.
40. MARX, D.H. & BRYAN, W.C. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. **Forest Science**, v. 21, n° 2, p. 245-54, jun. 1975.
41. MARX, D.H. & CORDELL, C.E. The use of specific ectomycorrhizae to improve artificial forestation practices. In: WHIPPS, J.M. & LUMSDEN (eds). **Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth**. Cambridge, British Mycological Society, Cambridge University Press. 1989. p. 1-25.
42. MARX, D.H.; CORDELL, C.E.; CLARK III, A. Eighth year performance of loblolly pine with *Pisolithus* ectomycorrhizae on a good-quality forest site. **Southern Journal of Applied Forestry**, v.12, n° 3, p. 275-80, aug. 1988.
43. MARX, D.H.; CORDELL, C.E.; KENNEY, D.S.; MEXAL, J.G.; ARTMAN, J.D.; RIFFLE, J.W.; MOLINA, R.J. Comercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on bare-root tree seedlings. **Forest Science**. Monograph 25, jan, 1984. 101 p.
44. MARX, D.H.; CORDELL, C.E.; MAUL, S.B.; RUEHLE, J.L. Ectomycorrhizal development on pine by *Pisolithus tinctorius* in bare-root and container

- seedlings nurseries. I. Efficacy of various vegetative inoculum formulations. **New Forests**, v. 3, p. 57-66. 1989.
45. MARX, D.H.; HATCH, A.B.; MENDICINO, J.F. High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. **Canadian Journal of Botany**, v. 55, n° 12, p. 1560-74, jun. 1977.
46. MARX, D.H. & KRUPA, S.V. Mycorrhizae. A. Ectomycorrhizae. In: DOMERGUES, Y.R. & KRUPA, S.V. (eds) **Interactions Between Nonpathogenic Soil Microorganisms and Plants**. Elsevier, Amsterdam p. 373-400. 1978.
47. MARX, D.H.; MAUL, S.B.; CORDELL, C.E. Application of specific ectomycorrhizal fungi in world forestry. In: LEATHAM, G.F. ed. **Frontiers in Industrial Mycology**. New York. Chapman and Hall. 1992. pp. 78-98.
48. MARX, D.H.; RUEHLE, J.L.; KENNEY, D.S.; CORDELL, C.E.; RIFFLE, J.W.; MOLINA, R.J.; PAWUK, W.H.; NAVRATIL, S.; TINUS, R.W.; GOODWIN, O.C. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. **Forest Science**, v.28, n° 2, p. 373-400, jun. 1982.
49. MATCHAM, S.E.; JORDAN, B.R.; WOOD, D.A. Methods for assessment of fungal growth on solid substrates. In: GRAINGER, J. M & LYNCH, J.M. (eds) **Enviromental Biotechnology**. London, New York, Academic Press, Society for Applied Bacteriology (Technical series). 1984. p. 5-18.

50. MATCHAM, S.E.; JORDAN, B.R.; WOOD, D.A. Estimation of fungal biomass in a solid substrate by tree independent methods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n° ½, p. 108-12, jan. 1985.
51. MIKOLA, P. Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practice. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, (eds). **Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology**. New York, Academic Press. 1973. p. 383-411.
52. NANDI, T. Glucosamine analysis of fungus infected wheat as a method to determine the effect of anti-fungal compounds in grain preservation. **Cereal Chemistry**, v. 55, n° 2, p. 121-6, mar/apr. 1978.
53. NEWELL, S.Y. Total and free ergosterol in mycelia of saltmarsh ascomycetes with access to whole leaves or aqueous extracts of leaves. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 60, n° 9, p. 3479-82, sep. 1994.
54. NEWELL, S.Y.; ARSUFFI, T.L.; FALLON, R.D. Fundamental procedures for determining ergosterol content of decaying plant material by liquid chromatography. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 54, n° 7, p. 1876-9, jul. 1988.
55. NEWELL, S.Y.; MILLER, J.D.; FALLON, R.D. Ergosterol content of salt-marsh fungi: effect of growth conditions and mycelial age. **Mycologia**, v. 79, n° 5, p. 688-95, set/out. 1987.
56. NOUT, M.J.R.; BONANTS - VAN LAARHOVEN, T.M.G.; JONGH, P.; KOSTER, P.G. Ergosterol content of *Rhizopus oligosporus* NRRL 5905 grown in liquid

- and solid substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n° 5, p. 456-61, aug. 1987.
57. NYLUND, J.E. & WALLANDER, H. Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. In: VARMA, A.K.; READ, D.J.; NORRIS, J.R.(eds). **Methods in Microbiology**. London, Academic Press, 1992. Vol 24 Techniques for the Study of Mycorrhiza, p. 77-88.
58. OLSEN , R.A. Triterpeneglycosides as inhibitors of fungal growth and metabolism. 5. Role of sterol content of some fungi. **Physiologia Plantarum**, v. 28, p. 507-15. 1973.
59. O'NEILL, E.G.; LUXMOORE, R.H.; NORBY, R.J. Increases in mycorrhizal colonization and seedlings growth in *Pinus echinata* and *Quercus alba* in na enriched CO₂ atmosphere. **Canadian Journal of Forest Research**, v.17, n° 5, p. 878-83, nov. 1987.
60. PADGETT, D.E. & POSEY, H. An evaluation of the efficiencies of several ergosterol extraction techniques. **Mycological Research**, v. 97, n° 12, p. 1476-80, dec. 1994.
61. PLASSARD, C; MOUSAIN, D.; SALSAC, L. Dosage de la chitine sur des ectomycorrhizes de pin maritime (*Pinus pinaster*) à *Pisolithus tinctorius*: évaluation de la masse mycélienne et de la mycorrhization. **Canadian Journal of Botany**, v. 61, n° 3, p. 692-9, mar. 1983.
62. REGNER, S.; SCHNURER, J.; JOHNSON, A. Ergosterol content in relation to grain Kernel weigth. **Cereal Chemistry**, v. 71, n° 1, p. 55-8, jan/feb. 1994.

63. RIDE, J.P. & DRYSDALE, R.B. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. **Physiological Plant Pathology**, v. 2, n° 1, p. 7-15, jan. 1972.
64. SALMANOVICZ, B. & NYLUND, J.-E. High performance liquid chromatography determination of ergosterol as a measure of ectomycorrhiza infection in Scots pine. **European Journal of Forest Pathology**, v.18, n° 2, p. 291-8, jun. 1988.
65. SCHUNURER, J. Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, n° 2, p. 552-5, feb. 1993.
66. SEITZ, L.M.; MOHR, H.E.; BURROUGHS, R.; SAUER, D.B. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. **Cereal Chemistry**, v. 54, n° 6, p. 1207-17, nov/dec. 1977.
67. SEITZ, L.M.; MOHR, H.E.; BURROUGHS, R.; SAUER, D.B.; HUBBARD, J.D. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, v. 69, n° 11, p. 1202-3, nov. 1979.
68. SODERSTROM, B. Vital staining of fungi in pure culture and in soil with fluorescein diacetate. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 9, n° 1, p.59-63, jan. 1977.
69. STAHL, P.D.; PARKIN, T.B.; EASH, N.S. Sources of error in direct microscopic methods for estimation of fungal biomass in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n° 8, p. 1091-7, aug. 1995.

70. SWIFT, J.M. The estimation of mycelial biomass by determination of the hexosamine content of wood tissue decayed by fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, n° 4, p. 321-32, apr. 1973.
71. TRAPPE, J.M. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. **Annual Review of Phytopathology**, v. 15, n° 1, p. 203-22, dec. 1977.
72. VAN PRAAG, H.J.; LOGNAY, G.; CARLETTI, G.; WEISSEN, F.; SEVERIN, M. Temporal and spatial variations of root tip density and ergosterol content of mycorrhizal roots of *Picea abies* karst and *Fagus sylvatica*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n° 7, p. 833-40, jul. 1994.
73. VIGNON, C.; PLASSARD, C.; MOUSAIN, D.; SALSAC, L. Assay of fungal chitin and estimation of mycorrhizal infection. **Physiologie Végétale**, v. 24, n° 2, p. 201-7, feb. 1986.
74. WALLANDER, H. & NYLUND, J.-E. Nitrogen nutrition and mycorrhiza development. **Agriculture, Ecosystems and Enviroments**, v. 28, n° ¼, p. 547-52, feb. 1989.
75. WALLANDER, H. & NYLUND, J.-E. Effects of excess of nitrogen on carbohydrate concentration and mycorrhizal development of *Pinus sylvestris* L. seedlings. **New Phytologist**, v. 119, n° 3, p. 405-11, nov. 1991.
76. WALLANDER, H. & NYLUND, J.-E. Effects of excess of nitrogen and phosphorus starvation on the extramatrical mycelium of ectomycorrhizas of *Pinus sylvestris* L. **New Phytologist**, v. 120, n° 4, p. 495-503, apr. 1992.

77. WALLANDER, H. & NYLUND, J.-E.; EKBLAD, A. Measurement of the amount of fungal tissue in mycorrhizal roots in soil. In: The International Symposium on Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry. Perth, 1992. **Programme and Abstracts**. Perth, University of Western Australia, 1992. p. 48-9.
78. WALLANDER, H. & NYLUND, J.-E.; SUNDBERG, B. The influence of IAA, carbohydrate and mineral concentration in host tissue on ectomycorrhizal development on *Pinus sylvestris* L. in relation to nutrient supply. **New Phytologist**, v. 127, n° 3, p.521-7, jul. 1994.
79. WEETE, J.D. Structure and function of sterols in fungi. **Advances in Lipid Research**, v. 23, p. 115-67. 1989.
80. WEETE, J.D.; KULIFAJ, M.; MORTANT, C.; NES, W.R.; SANCHOLLE, M. Distribution of sterols in fungi. II. Brassicasterol in *Tuber* and *Terfezia* species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n° 12, p. 1127-30, dec. 1985.
81. WEST, A.W.; GRANT, W.D.; SPARLING, G.P. Use of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine content of soils to monitor changes in microbial populations. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n° 5, p. 607-12, may. 1987.
82. WHIPPS, J.M. Method for estimation of chitin content of mycelium of ectomycorrhizal fungi grown on solid substrates. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 89, n° 2, p. 199-203, sep. 1987.

83. WOOD, D.A. A method for estimating biomass of *Agaricus bisporus* in a solid substrate, composted wheat straw. **Biotechnology Letters**, v. 1, n° 3, p. 255-60, apr. 1979.
84. WOOD, D.A. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. **Journal of General Microbiology**, v. 117, n° 2, p. 327-38, apr. 1980.
85. WU, L.-C. & STAHMANN, M.A. Chromatografic estimation of fungal mass in plant materials. **Phytopathology**, v. 65, n° 9, p. 1032-4, sep. 1975.
86. YOKOKAWA, H. Sterol composition of mushrooms. **Journal of Japanese Oil Chemistry Society**, v. 41, n° 12, p. 1215-19, dec. 1992.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO SOBRE TEOR DE ERGOSTEROL DOS
ISOLADOS DE *P. tinctorius* E *Rhizopogon* sp.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	VALOR F	PROB > F
isolado	6	234,3111265	39,0518544	291,5725	0,00001
resíduo	28	3,7501891	0,1339353		
Total	34	238,0613156			

Média Geral = 5,362857

Coefficiente de Variação = 6,824%

APÊNDICE 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO SOBRE O EFEITO
DO SUBSTRATO NO TEOR DE ERGOSTEROL DE DOIS ISOLADOS DE
Pisolithus tinctorius.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	VALOR F	PROB > F
isolado (Iso)	1	0,1312500	0,1312500	1,4976	0,23734
meio (Mei)	1	45,5416565	45,5416565	519,6283	0,00001
Iso x Mei	1	0,4559897	0,4559897	5,2028	0,03475
resíduo	16	1,4022840	0,0876428		
Total	19	47,5311803			

Média geral = 4,171000

Coefficiente de Variação = 7,098%

APÊNDICE 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO SOBRE O EFEITO DO
TEMPO DE INCUBAÇÃO NO TEOR DE ERGOSTEROL DE DOIS ISOLADOS
DE *Pisolithus tinctorius*.

CAUSAS DA VARIACÃO	GL	SQ	QM	VALOR F	PROB > F
Isolado (Iso)	1	2,9578910	2,9578910	43,1299	0,00002
Semanas	2	3,9517017	1,9758508	28,8105	0,00001
(Sem)	2	1,1052496	0,5526248	8,0580	0,00242
Iso x Sem	24	1,6459438	0,0685810		
Resíduo					
Total	29	9,6607861			

Média geral = 6,387333

Coefficiente de variação = 4,100%