

Utilização de fontes de carbono e caracterização esterásica de fungos ectomicorrízicos

Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada^{1*}, Sérgio Florentino Pascholati² e Tasso Leo Krugner²

¹Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

²Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq/USP), Av. Pádua 11, 13418-900, Piracicaba, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência.

RESUMO. O eucalipto é uma espécie arbórea capaz de formar associações micorrízicas. No entanto, uma das dificuldades em se trabalhar com inoculações em nível de viveiro é a diferença fisiológica entre os isolados de fungos micorrízicos, o que pode influenciar na compatibilidade entre a planta hospedeira e o fungo simbiote. Dessa forma, neste trabalho comparou-se três isolados de *Pisolithus tinctorius* obtidos de *Eucalyptus* spp. e um de *Pinus taeda* e um isolado de *Rhizopogon* sp. obtido de *Pinus* sp., com relação à capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono. A avaliação dos fungos foi baseada no crescimento micelial em meio de cultura sólido MNM e caracterização enzimática de isoesterases. Os resultados obtidos indicam que os isolados de *P. tinctorius* podem ser diferenciados quanto à utilização de fontes de carbono e que *P. tinctorius* isolado de *P. taeda* e *Rhizopogon* sp. apresentam comportamento semelhante, o que poderia auxiliar na seleção de isolados para serem utilizados como inóculo. Também foi possível diferenciar os isolados pelo padrão eletroforético de α -esterase.

Palavras-chave: eucalipto, micorriza, *Pisolithus*, esterase.

ABSTRACT. Utilization of carbon sources and esterase characterization of ectomycorrhizal fungi. The eucalyptus is a species that forms associations with filamentous fungi called mycorrhiza. However the main problem in the use of starter inoculants in the plant nursery is the physiological differences between fungal isolates, which may interfere in the compatibility between host plant and fungal symbiosis. Three strains of *Pisolithus tinctorius* isolates from *Eucalyptus* spp., one isolate from *Pinus taeda* and one *Rhizopogon* sp, also an isolate from *Pinus*, have been evaluated and compared with regard to their ability to diverse carbon sources. Evaluation was based on mycelial growth in solid MNM medium and enzymatic characterization in native gel separation of α -esterases. Results showed that isolates of *P. tinctorius* from Eucalyptus could be differentiated in their ability to use carbon sources, which would be an aid in the selection of starter culture. Similar results were also found in *Pinus taeda* and *Rhizopogon* sp isolates. It was also possible to characterize the isolates by electrophoresis-detected α -esterase.

Key words: eucalyptus, mycorrhiza, *Pisolithus*, α -esterases,.

Introdução

O *Eucalyptus* sp. é uma espécie arbórea que tem como uma de suas principais características a capacidade de formar associações simbióticas mutualísticas com fungos micorrízicos. Os efeitos benéficos dessa simbiose resultam em plantas com maiores taxas de sobrevivência e crescimento mesmo em condições adversas, quando comparadas com plantas não micorrizadas. Um fator importante a ser considerado no processo de inoculação em viveiro é a possível diferença fisiológica entre os isolados de fungos ectomicorrízicos, o que pode influenciar na

compatibilidade entre a planta hospedeira e o fungo simbiote. 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 concluíram que ambos formavam ectomicorrizas, mas o isolado de eucalipto apresentava crescimento e colonização mais rápidos (89% de raízes micorrizadas após sete dias de inoculação) em

relação ao isolado de *Pinus* (somente 2% de raízes micorrizadas após sete dias de inoculação). Os resultados sugeriam que, possivelmente, existia algum fator relacionado ao processo de reconhecimento do hospedeiro pelos fungos simbioses que ocasionava o desenvolvimento diferencial da simbiose. Esse fator envolveria diferenças bioquímicas e fisiológicas entre os isolados de *P. tinctorius*. Uma destas diferenças fisiológicas pode estar relacionada à utilização de diferentes açúcares, principalmente aqueles presentes na constituição da parede celular vegetal como a celulose, hemicelulose e pectina. A caracterização destes parâmetros (fontes de carbono e padrão esterásico) poderá auxiliar na separação de *Pisolithus tinctorius* obtidos de diferentes plantas hospedeiras (*Pinus* e *Eucalyptus* spp, por exemplo).

Assim este trabalho teve por objetivos caracterizar *in vitro* os isolados de *P. tinctorius* associados a *Eucalyptus* spp. e a *Pinus taeda* e de *Rhizopogon* sp. isolado de *Pinus* sp., através da utilização de diferentes fontes de carbono e atividade de isoenzimas de esterase.

Material e métodos

Os fungos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch isolados 1603, 1604 e 1605 foram obtidos de *Eucalyptus* sp., *E. grandis* e *E. saligna*, respectivamente. *P. tinctorius* isolado 185 e *Rhizopogon* sp. Coker e Couch foram obtidos de *Pinus taeda* e *Pinus* sp., respectivamente. Todos os isolados foram cultivados em placas de Petri com o meio de cultura sólido Melin-Norkrans modificado (MNM) (Marx, 1969), incubados em escuro a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 25 dias e estocados a 4°C para serem utilizados como fonte de inoculo.

Utilização de fontes de carbono

Os isolados dos fungos ectomicorrízicos foram comparados, através de medidas de crescimento micelial, quanto à capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono. Para isto, foram cultivados em meio MNM sólido, onde o extrato de malte foi substituído por extrato de levedura (0,3%) 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% (representada por chapa de celulose moída obtida junto ao Instituto de Pesquisas Florestais - Ipef/Esalq/USP); 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. Todas as fontes de carbono foram colocadas na proporção de 1% (massa/volume), exceto quando mencionado outro valor.

Em cada placa de Petri, com os respectivos meios de cultivo, foi repicado um disco de micélio (4 mm de diâmetro) de cada um dos isolados, retirado das bordas das colônias, com 25 dias de crescimento em MNM. As placas foram incubadas em escuro a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 dias. Para cada tratamento foram utilizadas três repetições. O crescimento radial (em cm) das colônias foi avaliado a cada 10 dias, através de duas medidas diametralmente opostas.

Caracterização isoenzimática de esterase (E.C. 3.1.1.1)

Os isolados fúngicos foram cultivados em meio MNM líquido em escuro, a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e sob agitação constante. Após o período de incubação de 24 dias, 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 homogeneizados 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 Daltons) e concentrados com polietilenoglicol 20.000, a 4°C . Após 3h, o resíduo nas membranas foi ressuspenso 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 a 4°C) e mantido a 4°C por 12h, sendo em seguida centrifugado, sob refrigeração, a 20.000 g por 25 min. O *pellet* foi ressuspenso em 2 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M e dialisado. As amostras do micélio e do filtrado tiveram a concentração protéica ajustada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e então utilizadas na eletroforese.

Para a análise eletroforética, foi utilizado gel nativo de poliácridamida 4% (gel concentrador) e 10% (gel separador). 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 três vezes com tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) e incubado em solução de α -naftil acetato 1% e *Fast Blue RR* até o aparecimento das bandas. Após a coloração, o gel foi fixado em solução de glicerol a 10% (Brune *et al.*, 1998).

Resultados e discussão

Utilização de fontes de carbono

Os isolados apresentaram 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 (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento micelial dos fungos micorrízicos *P. tinctorius* (*P.t.*) isolados 1603, 1604 e 1605 obtidos de *Eucalyptus* e 185, obtido de *Pinus* e *Rhizopogon* sp, isolado de *Pinus*, em diferentes fontes de carbono.

Fontes de carbono ¹	Pt 1603	Pt 1604	Pt 1605	Pt 185	<i>Rhizopogon</i>
	Crescimento Radial (cm)				
Controle ²	0 C	0 C	0 C	1,96 A	1,32 B
Glicose	1,5 C	2,13 C	1,15 C	5,6 B	7,65 A
Sacarose	0,6 C	1,35 BC	0,9 C	2,5 A	1,87 AB
Frutose	1,12 C	1,8 C	1,86 C	3,95 B	7,2 A
Xilose	0 B	0 B	1,56 A	1,75 A	0 B
Maltose	0,76 C	1,5 C	3,86 B	6,1 A	5,3 A
Celobiose	1,33 B	2,4 B	1,75 B	8,6 A	7,46 A
Celob. + glic. ³	1,78 BC	2,58 B	1,45 C	8,02 A	7,62 A
CMC ⁴	0 C	0 C	0 C	1,06 A	0,36 B
CMC + glic. ³	1,37 C	2,2 B	0,6 D	2,9 A	1,53 BC
Pectina	0 C	0 C	1,28 B	3,66 A	3,1 A
Pectina + glic. ³	1,08 C	0 D	3,63 B	5,0 A	4,7 A
Celulose nativa	0 B	1,1 B	0 B	0 B	2,7 A
Cel. nat. + glic. ³	1,52 D	3,0 C	3,2 C	4,38 B	5,6 A

¹Fungos cultivados em meio sólido Melin-Norkrans modificado (MNM) + 0,3% de extrato de levedura + 1% do carboidrato de interesse (exceto para celulose nativa e pectina com valores 0,5%). ²Controle: meio MNM + 0,3% de extrato de levedura. ³Fontes de carbono suplementado com 0,1% de glicose (glic.). ⁴CMC: carboximetilcelulose. ⁵Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Valores representam a média de três repetições

O isolado *P.tinctorius* 1603 (Tabela 1) foi capaz de utilizar nove 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%. Tal isolado 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%). Fontes mais simples como a glicose, celobiose, frutose e maltose também foram utilizadas por este isolado. 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 carbono). Houve um pequeno 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 (Tabela 1) também cresceu em nove 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 poder-se-ia dizer que 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 consideram que a presença de glicose no meio de cultivo pode inibir a indução (causar repressão catabólica) de enzimas celulolíticas (Gong e Tsao, 1979). No entanto, tomando-se como exemplo o crescimento de *P. tinctorius* 1604 em celulose nativa, isto parece não 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 às atividades e novamente exibiria crescimento micelial.

O isolado *P. tinctorius* 1605 (Tabela 1) cresceu em 11 das fontes de carbono testadas, apresentando maior crescimento micelial na presença de maltose. Este isolado foi também capaz de utilizar as fontes complexas como celulose nativa e carboximetilcelulose, estas duas apenas na presença de glicose 0,1%, e pectina, tanto na presença quanto na ausência de glicose. Dos três 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. (Tabela 1), isolados de *Pinus* foram mais eficientes na utilização das fontes de carbono do que os fungos isolados de *Eucalyptus*, pois cresceram em 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 utilizou as 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 e 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. Lamb (1974) também estudou a capacidade dos fungos ectomicorrízicos *Rhizopogon luteolus* e *R. roseolus* em utilizar diferentes fontes de carbono, entre as quais glicose, frutose, xilose, sacarose, celobiose, celulose e pectina, verificando que apenas glicose e celobiose proporcionaram um rápido crescimento para ambos os isolados e que as fontes de carbono complexas, bem como a sacarose, somente eram utilizadas quando o meio de cultivo era suplementado com glicose.

Caracterização dos isolados pelo padrão isoenzimático de esterases

Todos os isolados testados apresentaram atividade esterásica no micélio (esterase intracelular) (Figura 1). O isolado *P. tinctorius* 1603 apresentou três 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 três isoenzimas semelhantes às do isolado 1603, diferindo para a banda IV (MR 0,31) que apresentou uma intensidade comparativamente maior. O isolado *P. tinctorius* 1605 também apresentou três 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 *P. taeda*, apresentou quatro 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 seis 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.

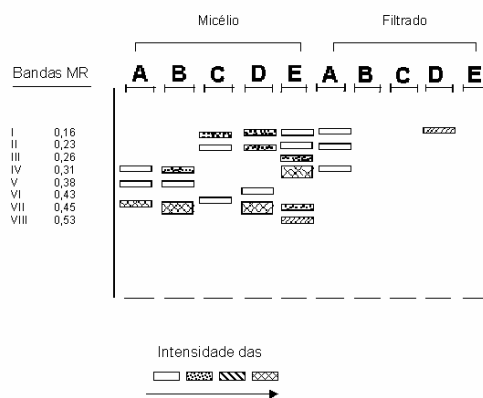


Figura 1. Representação esquemática das bandas eletroforéticas obtidas em gel nativo de poliacrilamida de extrato protéico de micélio e de filtrado de cultura de *P. tinctorius*, isolados 1603 (A), 1604 (B), 1605 (C) e 185 (D), e de *Rhizopogon* sp. (E). MR: mobilidade relativa

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 1603 apresentou três 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 uma isoenzima de esterase extracelular com MR 0,16 (banda I).

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 cinco isoenzimas de fosfatase ácida em oito isolados de *P. tinctorius*. Cao e Crawford (1993), utilizando eletroforese em gel nativo de poli(acrilamida) encontraram cinco diferentes isoenzimas de esterase para o isolado *P. tinctorius* S370, três para *P. tinctorius* S471 e duas 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 nove enzimas (fosfatases ácida e alcalina, alanina aminopeptidase, leucina aminopeptidase, hexoquinase, aspartato aminotransferase, malato desidrogenase, fosfogluco 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 pode ser feita por características morfológicas dos esporos formados nos solos ou nas raízes e pela análise dos padrões isoenzimáticos. Sen e Hepper (1986) caracterizaram seis espécies de *Glomus* (*G. caledonium*, *G. clarum*, *G. mosseae*, *G. epigaeum*, *Glomus* sp. isolado Danish e *Glomus* sp. E2) por eletroforese em gel de poli(acrilamida) para detecção de seis enzimas (esterase, glutamato oxaloacetato transaminase, hexoquinase, malato desidrogenase, peptidase e fosfoglucomutase). Os autores concluíram que as seis 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*, *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 *G. margarita* (MR 0,62 e 0,57) e para *S. heterogama* (MR 0,16 e 0,26).

Referências

- BACH, E.E. *Comparação morfológica, patogênica, sorológica e eletroforética de Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs, isolado de milho, sorgo e capim massambará. 1991. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.
- 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.248-254, 1976.
- BRUNE, W. *et al.* Identificações específicas de enzimas em géis. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins - Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa: UFV, 1998. p.201-328.
- CAO, W.G.; CRAWFORD, D.L. Carbon nutrition and hydrolytic and cellulolytic activities in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, v. 39, p. 529-35, 1993.
- 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.
- HO, I. Comparation of eight *Pisolithus tinctorius* isolates for growth rate, enzyme activity and phytohormone production. *Can. J. For. Res.*, Ottawa, v. 17, p. 31-37, 1987.
- KELLER, G. Isozymes in isolates of *Suillus* species from *Pinus cembra* L. *New Phytol.*, Cambridge, v. 120, p. 351-58, 1992.
- KEPHART, S.R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Am. J. Bot.*, v. 77, p. 693-712, 1990.
- LAMB, R.J. Effect of D-glucose on utilization of single carbon sources by ectomycorrhizal fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, Cambridge, v. 63, n. 2, p. 295-306, 1974.
- MALAJCZUK, N.; LAPEYRIE, F.; GARBAYE, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. *New Phytol.*, Cambridge, v.114, p.627-631, 1990.
- MALUF, A.M.; MELO, I.S.; RABELLO, R.J. Caracterização preliminar de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares através de eletroforese em géis de amido. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE MICORRIZAS, 3, Piracicaba, 1989. *Anais...*, Piracicaba, p.102, 1989.
- 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*, St Paul, v.59, p.153-163, 1969.
- NORKRANS, B. Studies in growth and cellulolytic enzymes of *Tricholoma*. *Symbolae Botanicae Upsalienses* **XI**, 127 p., 1950.
- SEN, R.; HEPPEL, C.M. Characterization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp) by selective enzyme staining following polyacrylamide gel electrophoresis. *Soil Biol. Biochem.*, Kidlington, v. 18, n. 1, p. 29-34, 1986.
- TABER, W.A.; TABER, R. A. Carbon nutrition and respiration of *Pisolithus tinctorius*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, Cambridge, v 89, p. 13-26, 1987.
- ZHU, H.; HIGGINBOTHAN, K.O.; DANCİK, B.P. Intraspecific genetic variability of isozymes in the ectomycorrhizal fungus *Suillus tomentosus*. *Can. J. Bot.*, Ottawa, v. 66, p. 588-94, 1988.

Received on June 18, 2002.

Accepted on September 04, 2002.