CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ISOENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE *Pisolithus* spp.

Anderson Marcos de Souza[1], Dulcinéia de Carvalho[2], Sebastião Carlos da Silva Rosado[2], Nilza de Lima Pereira Sales[3]

RESUMO: *Pisolithus spp.* é um fungo cosmopolita, que vive em simbiose com várias espécies arbóreas, principalmente *Eucalyptus* e *Pinus*. Com o objetivo de avaliar a diversidade de isolados de *Pisolithus* spp., procedentes do Brasil, USA e Canadá, características morfológicas e marcador genético foram utilizados visando à indicação de genótipos potenciais com ampla base genética, a serem utilizados em programas de melhoramento da simbiose ectomicorrízica. Tanto as características morfológicas como o marcador genético possibilitaram agrupar os isolados quanto à sua taxa de divergência, sendo que, para características morfológicas, esta taxa variou de 0 a 82% e para o marcador enzimático de 0 a 79%. Para ambos, observaram-se grandes distâncias entre os grupos formados, o que propiciará maiores ganhos na seleção de cruzamentos realizados entre isolados de grupos diferentes. De acordo com as características morfológicas, os cruzamentos aptos a ampliar a base genética foram P4 x P21 e P4 x P25 e para o marcador enzimático P13 x P18 e P15 x P33.

Palavras-chave: Ectomicorriza, características morfológicas, isoenzimas, *Pisolithus*.

MORPHOLOGICAL AND ISOZYMIC CHARACTERIZATION OF *Pisolithus* spp. ISOLATES

ABSTRACT: *Pisolithus spp. is a cosmopolitan fungus living in symbiosis with a number of tree species, mainly* Eucalyptus *and* Pinus. *Isolates from Brazil, USA and Canadá were used for the evaluation of the diversity of* Pisolithus *spp. Morphological characteristics and genetic marker were analysed for the identification of potential genotypes with broad genetic base that could be used in programs aiming at improving the ectomycorrhizal symbiosis. It was possible to group the isolates on the basis of morphological characteristics and genetic marker. The divergence rate for morphological characteristics ranged from 0 to 82% and for enzyme from 0 to 79%. The crosses apt to broaden the genetic base for morphological characteristics were P4 x P21 and P4 x P25 and enzymes were P13 x P18 and P15 x P33.*

Key words: Ectomycorrhizal, morphological characteristics, isoenzymes, Pisolithus.

---

[1] Doutorando em Engenharia Florestal na UFLA, Caixa Postal 37, 37.200-000 – Lavras, MG.
[2] Professores do Departamento de Ciências Florestais da UFLA, Caixa Postal 37, 37.200-000 – Lavras, MG.
[3] Engenheira Florestal, Dra.

1. INTRODUÇÃO

A degradação dos ecossistemas naturais e o uso inapropriado do solo são os principais agentes de desertificação e degradação de diferentes regiões do planeta.

Em face a essa situação, o reflorestamento é uma atividade que, além de conter o fenômeno de desertificação, contribui para a restauração e restabelecimento dos ecossistemas naturais degradados. Aliadas a esta atividade, várias estratégias vêm sendo utilizadas com o intuito de amenizar o impacto de fatores estressantes sobre as espécies vegetais cultivadas. Dentre elas, destacam-se os programas de melhoramento genético por meio da seleção de genótipos superiores.

Tanto o melhoramento genético de plantas como o melhoramento genético de simbiontes capazes de sobreviver, crescer e produzir em sítios desfavoráveis são de grande importância no restabelecimento e restauração destas áreas.

Pisolithus spp. é um fungo ectomicorrízico cosmopolita, que vive em simbiose com várias espécies de árvores, principalmente com as do gênero *Eucalyptus* e *Pinus.* Esta simbiose é de grande importância para as árvores hospedeiras, principalmente quando plantadas em sítios de baixa fertilidade, pois o parceiro fúngico melhora a absorção e o transporte de água e nutrientes do solo, aumenta a tolerância à acidez, à toxidez de metais pesados, a temperaturas elevadas do solo e aumenta a resistência às doenças do sistema radicular.

O sucesso de qualquer programa de micorrização é, sem dúvida, influenciado pela estrutura, variabilidade e estratégia reprodutiva destas populações naturais de fungos. Dessa forma, estudos genéticos são necessários para conhecer a magnitude desta variabilidade para a melhor compreensão das características ecológicas e fisiológicas, que permitirão o estabelecimento de novas estratégias de melhoramento genético.

E, para acessar esta variabilidade, é indispensável o uso de marcadores morfológicos e genéticos, que possibilitarão caracterizar, identificar e avaliar o comportamento de genótipos a serem utilizados em programas de melhoramento da simbiose.

Diante desse fato, os objetivos deste estudo foram estudar a diversidade de isolados de *Pisolithus* spp. Por meio de características morfológicas e marcadores genéticos (isoenzimas), bem como comparar a variabilidade obtida por estes diferentes procedimentos, visando detectar e selecionar genótipos de ampla base genética aptos a serem utilizados em programas de melhoramento da simbiose ectomicorrízica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico de *Pisolithus* spp. Utilizado no estudo

Este estudo foi realizado no Laboratório de Melhoramento Florestal do Departamento de Ciências Florestais, na Universidade Federal de Lavras (MG). Foram utilizadas culturas de diferentes isolados do fungo ectomicorrízico *Pisolithus* spp. Estas culturas foram originárias de cruzamento com várias combinações de isolados monocarióticos [procedentes de Lavras, MG (MA1, MB2 e MB3), obtidos de acordo com Carvalho et al. (1997)], com isolados dicarióticos de diferentes procedências (USA – 270; BRASIL – MA1 x MB3, MB2 x MB3, I1, 441 e Canadá - H6), conforme tabela 1.

2.2. Caracterização morfológica

Para a caracterização morfológica dos isolados foram avaliadas 11 características listadas na Tabela 2 e, para cada característica, utilizaram-se 10 repetições.

As avaliações possibilitaram construir uma tabela descritiva de todas as características morfológicas para os isolados estudados. A partir desta foi feito o estudo de similaridade entre os isolados, usando o agrupamento pelo método UPGMA (unweigheted pair-group method arithmetic average Rohlf, 1992), utilizando programa Statistica 5.0 (Slice et al., 1994)

Tabela 1. Isolados de *Pisolithus* spp., origem e compatibilidade sexual de cruzamentos em cultura pura em meio MMN (Marx, 1969), utilizados neste estudo.
Table 1. *Isolates of Pisolithus spp, origin and sex compatibility of crosses in pure culture in MMN (Marx,1969), medium utilized in this study)*

	Isolados	Origem	Hospedeiro	Mating types (ploidia)
P1	MA1	Brasil	*Eucalyptus*	A3B3(n)
P2	MB2	Brasil	*Eucalyptus*	A2B2(n)
P3	MB3	Brasil	*Eucalyptus*	A1B1(n)
P4	270	USA	*Pinus*	? (n + n)
P5	H6	Canadá	*Eucalyptus*	? (n + n)
P6	MA1 x 270(S3+)	-	*Eucalyptus e Pinus*	A3B3 + ? (n + n)
P7	MA1 x (MB2xMB3)(S4+)	Brasil	*Eucalyptus*	A3B3 + (A2B2+A1B1)
P8	MA1 x (MA1xMB3)(S3+)	Brasil	*Eucalyptus*	A3B3 + (A3B3+A1B1)
P9	MB2 x (MB2xMB3)(S4-)	Brasil	*Eucalyptus*	A2B2 + (A2B2+A1B1)
P10	MB2 x H6(S4+)	-	*Eucalyptus*	A2B2 + ? (n + n)
P11	MB3 x H6(S4-)	-	*Eucalyptus*	A1B1 + ? (n + n)
P12	MB2 x 270(S4+)	-	*Eucalyptus e Pinus*	A2B2 + ? (n + n)
P13	MB3 x 270(S4+)	-	*Eucalyptus e Pinus*	A1B1 + ? (n + n)
P14	MA1 x 270(ZI)	-	*Eucalyptus e Pinus*	A3B3 + ? (n + n)
P15	MB2 x (MB2xMB3)(ZI)	Brasil	*Eucalyptus*	A2B2 + (A2B2+A1B1)
P16	MB2 x H6(ZI)	-	*Eucalyptus*	A2B2 + ? (n + n)
P17	MB3 x H6(ZI)	-	*Eucalyptus*	A1B1 + ? (n + n)
P18	MB2 x 270(ZI)	-	*Eucalyptus e Pinus*	A2B2 + ? (n + n)
P19	MB3 x 270(ZI)	-	*Eucalyptus e Pinus*	A1B1 + ? (n + n)
P20	MB2 x MB3 (ZI)	Brasil	*Eucalyptus*	A2B2 + A1B1
P21	MA1 x MB3 (ZI)	Brasil	*Eucalyptus*	A3B3 + A1B1
P22	MA1 x MB2 (ZI)	Brasil	*Eucalyptus*	A3B3 + A2B2
P23	MA1 x H6(ZI)	-	*Eucalyptus*	A3B3 + ? (n + n)
P24	MA1 x 441(ZI)	-	*Eucalyptus*	A3B3 + ? (n + n)
P25	MA1 x I1(ZI)	Brasil	*Eucalyptus*	A3B3 + ? (n + n)
P26	MB2 x 441(ZI)	-	*Eucalyptus*	A2B2 + ? (n + n)
P27	MB2 x I1(ZI)	Brasil	*Eucalyptus*	A2B2 + ? (n + n)
P28	MB3 x 441(ZI)	-	*Eucalyptus*	A1B1 + ? (n + n)
P29	MB3 x I1(ZI)	Brasil	*Eucalyptus*	A1B1 + ? (n + n)
P30	H6 x 441(ZI)	-	*Eucalyptus*	? (n + n) + ? (n + n)
P31	H6 x I1(ZI)	-	*Eucalyptus*	? (n + n) + ? (n + n)
P32	441 x I1(ZI)	-	*Eucalyptus*	? (n + n) + ? (n + n)
P33	270 x H6(ZI)	-	*Eucalyptus e Pinus*	? (n + n) + ? (n + n)
P34	270 x 441(ZI)	-	*Eucalyptus e Pinus*	? (n + n) + ? (n + n)
P35	270 x I1 (ZI)	-	*Eucalyptus e Pinus*	? (n + n) + ? (n + n)
P36	I1	Brasil	*Eucalyptus*	? (n + n)
P37	441	Brasil	*Eucalyptus*	? (n + n)

(n) – isolado monocariótico; (n + n) – isolado dicariótico e ? mating type desconhecido

2.3. Caracterização isoenzimática

Aos 28 dias de cultivo em meio MMN (Marx, 1969), o micélio de cada isolado foi coletado, pesado e armazenado em nitrogênio líquido por alguns minutos. Para cada 100 mg de micélio fresco, adicionaram-se 200 μL de solução extratora (Alfenas et al., 1998). Durante a maceração, pequenas quantidades de polivinilpolipirrolidona (PVPP) foram adicionadas para remover compostos fenólicos e aumentar a estabilidade das enzimas. O macerado foi obtido por meio da maceração manual em almofariz de porcelana previamente resfriado e mantido sobre placa de gelo. Após a maceração, centrifugaram-se as amostras a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, procedeu-se a migração das enzimas.

2.3.1. Eletroforese de isoenzimas

Os géis foram confeccionados em cubas de eletroforese (Pharmacia-Hoeffer SE-600). O gel de separação foi a 12,5%, contendo 19 mL de solução estoque de acrilamida (30%); 11,5 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,9; 15 mL de H_2O destilada; 150 μL de persulfato de amônio (10% p/v) e 10 μL de TEMED. O gel de concentração foi a 4%, contendo 2,68 mL de solução estoque de acrilamida (30%); 5 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 12 mL de H_2O destilada; 80 μL de persulfato de amônio (10% p/v) e 20 μL de TEMED. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi tris glicina. A migração foi desenvolvida a 10 mA e a 4°C para cada gel, totalizando cinco horas e trinta minutos

As atividades enzimáticas dos sistemas fosfatase ácida (ACP – EC 3.1.3.2) e β - esterase (EST – EC 3.1.1.1) foram reveladas de acordo com a metodologia descrita por Alfenas et al (1998). Na avaliação dos géis, cada banda foi considerada como um único caráter, e isto possibilitou a construção de uma matriz de zero e um. Para estimar a similaridade entre os isolados, utilizou-se o programa NTSYS 1.8 (Rolf, 1992).

A representação simplificada das distâncias genéticas foi feita por dendrogramas obtidos pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (Rohlf, 1992). Para estes dados foi utilizado o programa Statistica 5.0 (Slice et al., 1994).

Tabela 2. Características utilizadas na análise morfológica de *Pisolithus* spp. conforme Burgess et al. (1995).
Table 2. *Characteristics utilized in the morphological analysis of Pisolithus spp. according to Burgess et al. (1995)*

Características avaliadas	Taxas comparativas
Textura	Ausente; aveludada; flutuante; floculenta; áspera
Formação de cordão	Ausente ou presente
Cor do ágar	Colorido ou não colorido
Formação de halo	Ausente ou presente
Forma da colônia inferior	Submersa, aérea ou grudada
Forma da colônia superior	Submersa, aérea ou grudada
Margem da colônia	Regular ou irregular
Cor da colônia	Creme, amarelo, amarelo escuro, ocre ou marrom
Peso (mg/dia)	Baixo (< 3), médio (3 - 6) e alto (> 6)
Crescimento (mm/dia)	Baixo (< 1,5) e alto (> 1.5)
Densidade (mg/mm)	Baixo (< 3), médio (3 – 6) e alto (> 6)

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Caracterização morfológica

Aos 28 dias de cultivo, todos os isolados de *Pisolithus* spp. apresentaram diferenças com relação às características morfológicas analisadas (Tabela 3).

As características textura, cor de colônia, peso, crescimento e densidade foram as que apresentaram as maiores variações. As características forma de colônia inferior e forma de colônia superior não apresentaram variações entre os isolados. Dados semelhantes foram obtidos por Burgess et al. (1995) que, estudando isolados de *Pisolithus*, também encontraram variação quanto às características dos isolados.

Toda esta variabilidade existente entre os isolados de *Pisolithus* permite classificar e caracterizar os isolados, tanto por especificidade de hospedeiro como por procedência geográfica. Estas informações coincidem com os resultados obtidos por Watling et al. (1995) e Burgess et al. (1995).

Analisando o dendrograma (Figura 1) formado pelo agrupamento da caracterização morfológica, verificou-se que, a 55% de distância, três grupos foram formados. O grupo 1, formado por 9 isolados: [P31 (H6 x I1 ZI), P24 (MA1 x 441 ZI), P17 (MB3 x H6 ZI), P10 (MB2 x H6 S4+), P23 (MA1 x H6 ZI), P30 (H6 x 441 ZI), P11 (MB3 x H6 S4-), P16 (MB2 x H6 ZI) e P5 (H6)]; o grupo 2, formado por 10 isolados: [P36 (I1), P18 (MB2 x 270 ZI), P6 (MA1 x 270 S3+), P35 (270 x I1 ZI), P34 (270 x 441 ZI), P33 (270 x H6 ZI), P19 (MB3 x 270 ZI), P13 (MB3 x 270 S4+), P12 (MB2 x 270 S4+) e P14 (MA1 x 270(ZI)]; e o grupo 3, formado por 17 isolados: [P26 (MB2 x 441 ZI), P21 (MA1 x MB3 ZI), P15 (MB2 x (MB2xMB3) ZI), P8 (MA1 x (MA1xMB3) S3+), P27 (MB2 x I1 ZI), P3 (MB3), P22 (MA1 x MB2 ZI), P2 (MB2), P32 (441 x I1 ZI), P29 (MB3 x I1 ZI), P9 (MB2 x (MB2xMB3) S4-), P37 (441), P28 (MB3 x 441 ZI), P7 (MA1 x (MB2xMB3) ZI), P8 (MA1 x (MA1xMB3) S3+), P27 (MB2 x I1 ZI), P3 (MB3), P22 (MA1 x MB2 ZI), P2 (MB2), P32 (441 x I1 ZI), P29 (MB3 x I1 ZI), P9 (MB2 x (MB2xMB3) S4-), P37 (441), P28 (MB3 x 441 ZI), P7 (MA1 x (MB2xMB3) S4+), P20 (MB2 x MB3 ZI), P25 (MA1 x I1ZI) e P1 (MA1). No grupo 1, verificou-se que os isolados P23, P30, P16 e P5 foram os mais próximos, com uma similaridade de 90% e que o isolado P31 foi o mais divergente do grupo. No grupo 2, verificou-se que os isolados P18, P6, P13 e P12 foram os mais próximos, com similaridade de 90% e que o isolado P36 foi o mais divergente do grupo. No grupo 3, o que apresentou um maior número de isolados (45%), verificou-se que os isolados P21 (MA1 x MB3 ZI), P15 (MB2 x (MB2xMB3) ZI), P27 (MB2 x I1 ZI), P3 (MB3), P22 (MA1 x MB2 ZI), P29 (MB3 x I1 ZI), P9 (MB2 x (MB2xMB3) S4-), P25 (MA1 x I1 ZI) e P1 (MA1) foram os mais próximos, com similaridade de 90%, e o isolado P2 foi o mais divergente.

A análise pelo método UPGMA permitiu, ainda, fazer uma distinção quanto à distribuição dos isolados genitores e seus híbridos para cada grupo formado. No grupo 1 predominaram o genitor P5 (H6), de procedência canadense e seus respectivos híbridos (P10, P11, P16, P17, P23, P24, P30 e P31). No grupo 2, predominaram o genitor P4 (270), de procedência americana e seus respectivos híbridos (P6, P12, P13, P14, P18, P19, P33, P34 e P35). No grupo 3, predominaram os genitores monocarióticos brasileiros (P1, P2 e P3) e seus respectivos híbridos, formados dos seus cruzamentos e de suas interações (P7, P8, P9, P15, P20, P21, P22). Observou-se, também, no grupo 3, que dos seis híbridos obtidos do genitor P37 (441), quatro encontraram-se neste grupo (P26, P28, P30 e P32).

Os resultados das análises morfológicas demonstraram que houve uma relação direta dos isolados com a espécie hospedeira. Observou-se que o isolado P4, que é colonizador de *Pinus,* foi o mais divergente (55%). Isto reforça os re-

sultados obtidos por Ho (1987), com dados de variação fenotípica de *Laccaria*; Jacobson & Miller (1992), com *Suillus* e Lei et al. (1990), com *Pisolithus*.

Tabela 3. Caracterização morfológica de diferentes isolados de *Pisolithus* spp.
Table 3. *Morphologic characterization of different isolates of Pisolithus spp.*

Isolados	Textura	Cordão	Cor do Ágar	Halo	FCI	FCS	Margem da colônia	Cor da colônia	Peso mg/dia	Crescimento mm/dia	Densidade mg/mm
P1	Av	A	NC	A	G	Ae	R	AE	3-6	<1,5	>6
P2	Fl	A	NC	A	G	Ae	R	A	3-6	<1,5	3-6
P3	Fl	A	NC	A	G	Ae	R	C	3-6	<1,5	3-6
P4	Av	A	LG	P	G	Ae	I	M	>6	>1,5	3-6
P5	Av	A	LG	P	G	Ae	R	O	3-6	<1,5	<3
P6	Av	A	LG	P	G	Ae	I	M	>6	<1,5	>6
P7	Fl	P	NC	A	G	Ae	R	AE	<3	<1,5	3-6
P8	Fl	A	NC	A	G	Ae	R	A	<3	<1,5	3-6
P9	Flu	A	NC	A	G	Ae	I	A	3-6	<1,5	3-6
P10	Av	P	LG	A	G	Ae	R	O	3-6	>1,5	3-6
P11	Av	P	LG	A	G	Ae	R	O	3-6	<1,5	3-6
P12	Av	A	LG	P	G	Ae	R	M	>6	<1,5	3-6
P13	Av	P	LG	P	G	Ae	R	M	>6	<1,5	3-6
P14	Av	P	LG	P	G	Ae	R	M	<3	>1,5	3-6
P15	Fl	A	NC	A	G	Ae	R	A	3-6	<1,5	3-6
P16	Av	A	LG	A	G	Ae	R	O	3-6	<1,5	3-6
P17	Av	P	LG	A	G	Ae	R	O	>6	>1,5	>6
P18	Av	P	LG	P	G	Ae	I	M	3-6	<1,5	3-6
P19	Av	P	LG	P	G	Ae	I	M	3-6	<1,5	3-6
P20	Flu	A	NC	P	G	Ae	R	AE	<3	<1,5	<3
P21	Fl	A	NC	A	G	Ae	R	A	3-6	<1,5	3-6
P22	Fl	A	NC	A	G	Ae	R	A	>6	<1,5	3-6

Continua...

Continuação Tabela 3...

P22	Fl	A	NC	A	G	Ae	R	A	>6	<1,5	3-6
P23	Av	P	LG	A	G	Ae	R	O	>6	<1,5	3-6
P24	Av	P	LG	A	G	Ae	R	AE	3-6	>1,5	>6
P25	Flu	A	NC	A	G	Ae	R	AE	>6	<1,5	>6
P26	Fl	A	NC	A	G	Ae	R	A	3-6	<1,5	3-6
P27	Flu	A	NC	A	G	Ae	R	AE	3-6	<1,5	3-6
P28	Flu	P	NC	A	G	Ae	R	AE	3-6	<1,5	3-6
P29	Flu	P	NC	A	G	Ae	I	AE	3-6	<1,5	3-6
P30	Av	P	LG	A	G	Ae	R	O	3-6	<1,5	3-6
P31	As	P	LG	A	G	Ae	I	AE	>6	>1,5	>6
P32	Flu	P	NC	A	G	Ae	I	AE	>6	<1,5	3-6
P33	Flu	P	LC	P	G	Ae	I	M	>6	<1,5	3-6
P34	Flu	P	LC	P	G	Ae	I	M	>6	<1,5	3-6
P35	Flu	P	LC	P	G	Ae	I	M	>6	<1,5	3-6
P36	Flu	P	NC	P	G	Ae	I	AE	>6	<1,5	>6
P37	Av	P	NC	A	G	Ae	R	AE	3-6	>1,5	3-6

Características morfológicas avaliadas: Textura - aveludada (Av), floculenta (Fl), flutuante (Flu), áspera (As); cordão – ausente(A) ou presente (P); cor do Ágar - não colorido (NC) ou ligeiramente colorido (LC); halo – ausente (A) ou presente (P); forma da colônia inferior – grudada(G); Forma da colônia superior – aérea (Ae); margem da colônia – regular (R) ou irregular (I); cor da colônia - amarelo escuro (AE), amarelo (Am), creme (C), marrom (M), ocre (O); peso - <3mg/dia, 3-6mg/dia, >6mg/dia; crescimento - <1,5mm/dia, >1,5mm/dia; densidade - <3mg/mm, 3-6mg/mm, >6mg/mm;

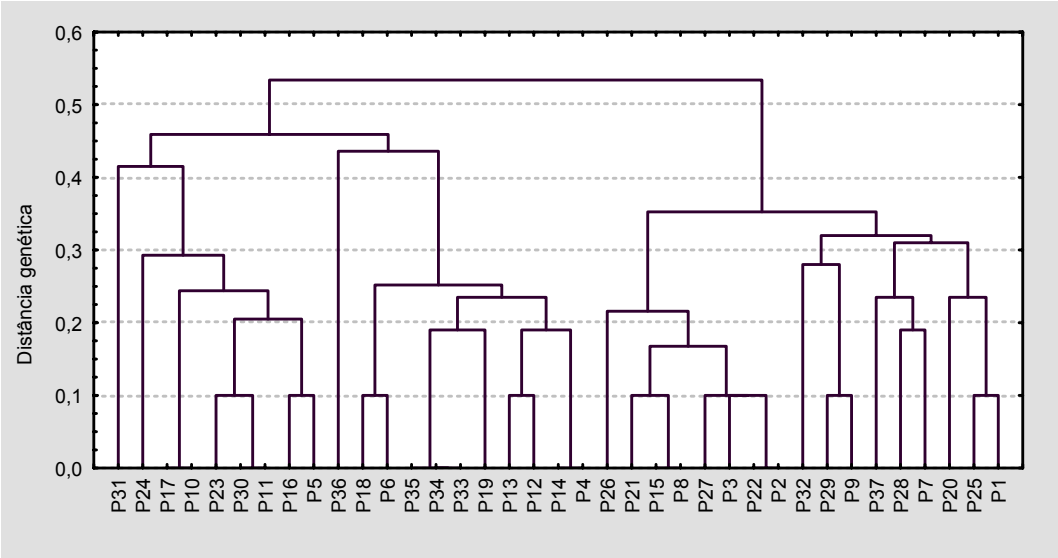


Figura 1. Dendrograma obtido através da análise morfológica de isolados *Pisolithus* spp.
Figure 1*.Dendrogram obtained through the morphologic analysis of Pisolithus spp. isolates.*

A distância média entre os isolados foi de 42% e a amplitude das distâncias variou de 0 a 82%. Estes resultados demonstraram que existem possibilidades de obtenção de ganho genético a partir destes cruzamentos controlados entre isolados de diferentes origens. A alta amplitude das distâncias possibilita a manipulação destes isolados em programas de melhoramento de simbiose permitindo a seleção de genótipos que ampliam a base genética a ser explorada. Os isolados P4 e P21, P4 e P25 apresentaram distâncias entre si superiores a 80% de divergência. Os isolados P4 e P14, P10 e P17, P33 e P34, P33 e P35, P34 e P35, pelas análises das características morfológicas, foram semelhantes (100%).

Utilizando a composição de agrupamento obtido pelo método UPGMA, foi construída uma matriz de divergência genética entre e dentro dos 3 grupos obtidos e também foram identificados quais os isolados promissores para maximização das distâncias entre os grupos (Tabela 4).

As distâncias entre os grupos foram maiores do que dentro dos grupos, isto indica que a diversidade poderá ser aumentada por cruzamentos realizados entre os grupos. Estes cruzamentos poderão ser formados pela utilização dos cruzamentos mostrados abaixo da diagonal .

3.2. Caracterização isoenzimática

As análises dos perfis isoenzimáticos revelados para as enzimas ACP e EST mostraram diferenças entre os isolados de *Pisolithus* spp. estudados.

Os perfis isoenzimáticos dos diferentes isolados de *Pisolithus* spp., após eletroforese em gel de poliacrilamida, revelados para as enzimas ACP e EST, podem ser vistos pelos zimogramas obtidos para estes dois sistemas enzimáticos uti-

lizados (Figura 2). As análises dos zimogramas permitiram detectar 14 bandas polimórficas, sendo sete para a enzima ACP e sete para a enzima EST. Dois locos distintos foram detectados para os sistemas enzimáticos analisados (Tabela 5).

Tabela 4. Matriz de distância genética (%) entre os grupos definidos na caracterização morfológica dos isolados de *Pisolithus* spp.
Table 4. *Genetic distance matrix (%) among the groups defined in the morphologic characterization of isolates of Pisolithus spp.*

	G1	G2	G3
G1	**73%*** (P31/P5)		
G2	73% (P36/P6)	**55%*** (P12-P36)	
G3	73% (P22/P31)	73% (P2/P18)	**37%*** (P2/P29)

* na diagonal – maximização das distâncias dentro dos grupos abaixo da diagonal: maximização das distâncias entre os grupos

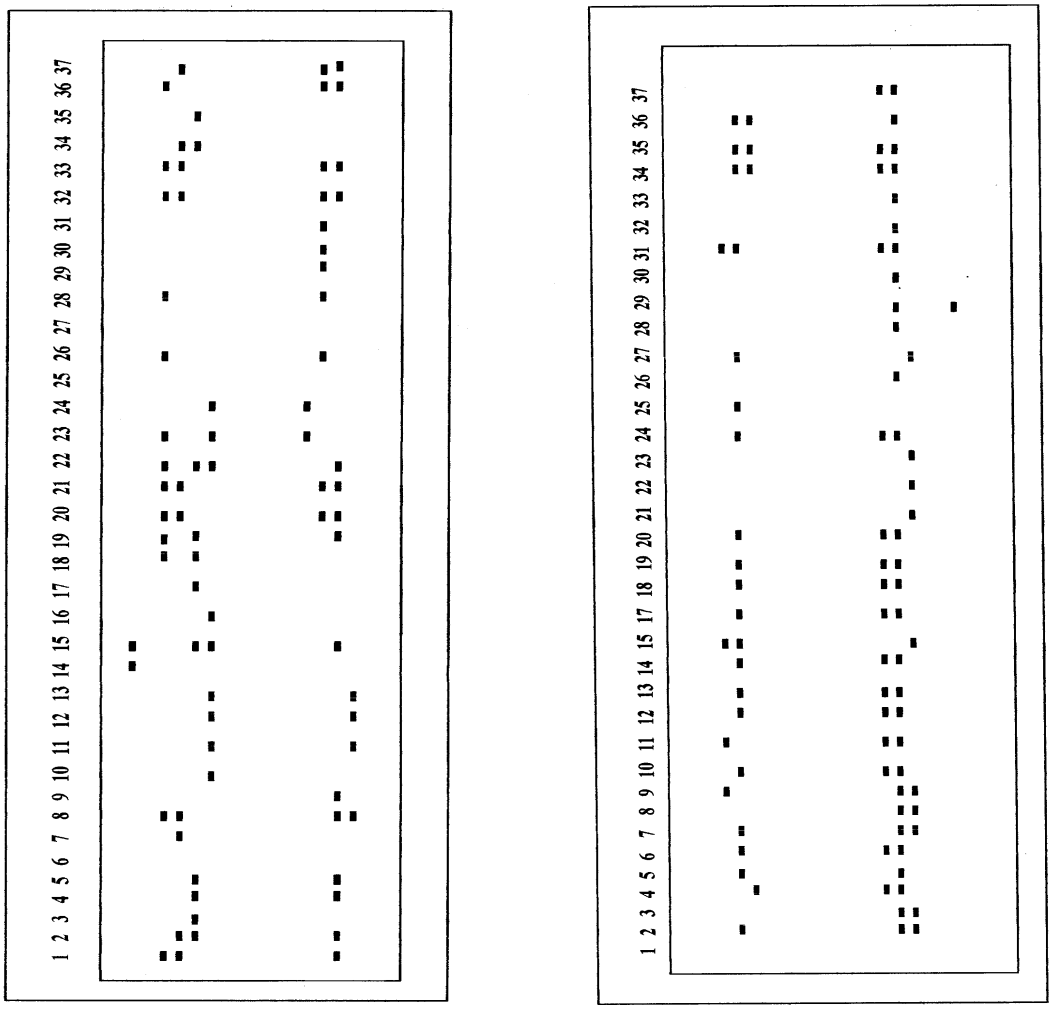
A análise binária dos perfis isoenzimáticos possibilitou a construção de uma matriz de dissimilaridade. A partir desta matriz foi obtido o dendrograma utilizando o método de agrupamento UPGMA, o qual pode ser observado na Figura 3. A análise dos perfis isoenzimáticos permitiu agrupar os isolados de *Pisolithus* spp. que apresentaram características semelhantes.

Analisando o dendrograma formado pelo agrupamento dos perfis isoenzimáticos, verificou-se que, a 55% de similaridade, foram formados três grupos. O grupo 1, formado pelo isolado P15 (MB2 x (MB2xMB3) ZI); o grupo 2, formado por oito isolados: [P24 (MA1 x 441 ZI), P23 (MA1 x H6 ZI), P9 (MB2 x (MB2xMB3) S4-), P22 (MA1 x MB2 ZI), P8 (MA1 x MA1xMB3) S3+), P21 (MA1 x MB3 ZI), P20 (MB2 x MB3 ZI) e P7 (MA1 x (MB2 x MB3)S4+)]; e o grupo 3, formado por 28 isolados: [P33 (270 x H6 ZI), P37 (441), P32 (441 x I1 ZI), P31 (H6 x I1 ZI), P29 (MB3 x I1 ZI), P28 (MB3 x 441 ZI), P26 (MB2 x 441 ZI), P19 (MB3 x 270 ZI), P18 (MB2 x 270 ZI), P17 (MB3 x H6 ZI), P14 (MA1 x 270 ZI), P13 (MB3 x 270 S4+), P12 (MB2 x 270 S4+), P11 (MB3 x H6 S4-), P30 (H6 x 441 ZI), P10 (MB2 x H6 S4+), P6 (MA1 x 270 S3+), P35 (270 x I1 ZI), P34 (270 x 441 ZI), P36 (I1), P4 (270), P27 (MB2 x I1 ZI), P25 (MA1 x I1 ZI), P3 (MB3), P16 (MB2 x H6 ZI), P5 (H6), P2 (MB2) e P1 (MA1)]. No grupo 2, verificou-se que os isolados P7 e P20 foram os mais próximos, com similaridade de 85%, e que os isolados P24 e P23 foram os mais divergentes . O grupo 3 foi o que agrupou um maior número de isolados (75%). Verificou-se que os isolados P26, P19, P18, P17, P10 e P6 foram os mais próximos, com similaridade de 93%. O isolado P13 foi o mais divergente do grupo.

O agrupamento dos isolados pelo método UPGMA possibilitou fazer uma distinção com relação à distribuição dos isolados em cada grupo. Observou-se que, no grupo 2, predominaram os híbridos obtidos dos genitores monocarióticos brasileiros (P1, P2 e P3). Dos 7 híbridos formados, 6 (P7, P8, P9, P20, P21 e P22) encontram-se neste grupo. O grupo 3 foi formado basicamente por todos os híbridos obtidos dos genitores dicarióticos (P4, P5, P36 e P37).

De acordo com o agrupamento dos perfis isoenzimáticos, o isolado P15 foi o mais divergente e este se assemelha aos demais, com índice de similaridade de 43%.

A distância média entre os isolados foi de 40% e a amplitude das distâncias variou de 0 a 79%. Estes resultados demonstraram que existem boas possibilidades de ganho genético se os isolados de *Pisolithus* spp. forem cruzados para gerar híbridos. A alta amplitude das distâncias possibilita a manipulação destes isolados em programas de melhoramento de simbiose, permitindo a seleção de genótipos que ampliam a base genética a ser estudada. Os isolados P13 e P18, P15 e P23 apresentaram distâncias entre si superiores a 73% e 79% de divergência. Os isolados P12 e P13, P20 e P21, P26 e P27, P29 e P31, P32 e P3, pelas análises de seus perfis enzimáticos, foram semelhantes.



(a) ACP (b) EST

Figura 2. Zimogramas obtidos dos perfis isoenzimáticos de isolados de *Pisolithus* spp. para as enzimas ACP (a) e EST (b)

Figure 2*. (Zimograms obtained from the isoenzyme profiles of Pisolithus spp. isolates for enzymes ACP and EST).*

Tabela 5. Enzimas, código, número de bandas e locos observados em diferentes isolados de *Pisolithus* spp.
***Table 5**. Enzymes, code, number of bands and loci observed in different isolates of Pisolithus spp.*

Enzima	Abreviações usadas no estudo	Código da enzima	Bandas polimórficas	Locos distintos
Fosfatase ácida	ACP	3.1.3.2	7	2
Esterase	EST	3.1.1.1	7	2
Total			14	4

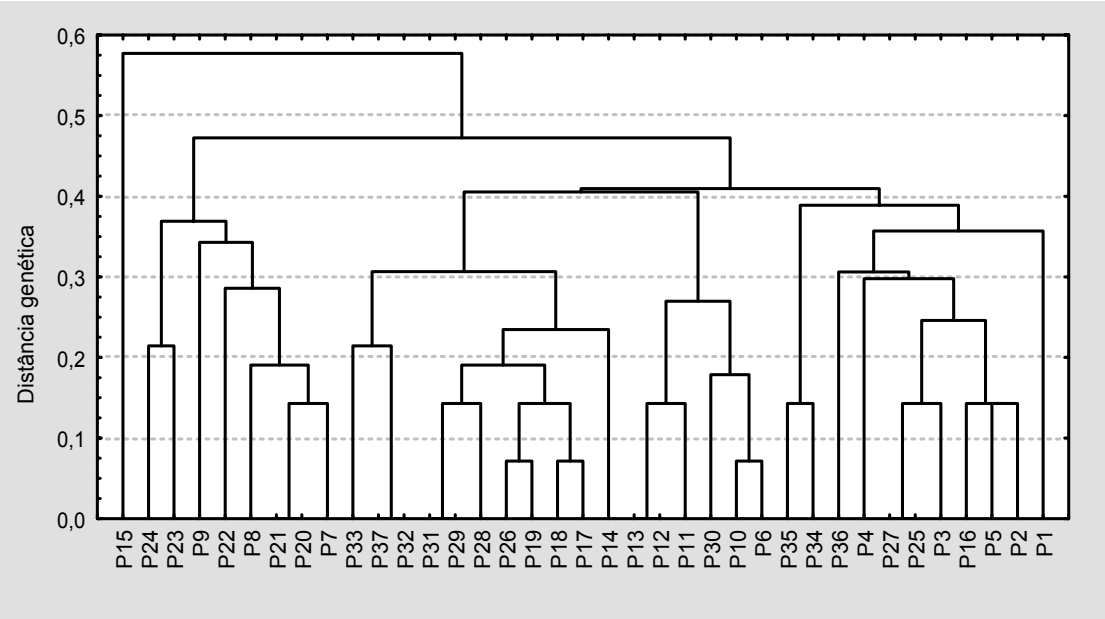


Figura 3. Dendrograma obtido pelas análises dos perfis de isoenzimáticos de *Pisolithus* spp.
***Figure 3.** Dendrogram obtained by the analysis of the isoenzyme profiles of Pisolithus ssp.*

Utilizando-se a composição de agrupamento obtido pelo método UPGMA, foi construída uma matriz de distância entre e dentro dos três grupos obtidos e também foram identificados quais os isolados promissores para maximização das distâncias entre os grupos (Tabela 6).

Para o grupo G2, as distâncias entre os grupos foram maiores do que dentro dos grupos (Tabela 6), indicando que a variabilidade genética poderá ser aumentada por cruzamentos realizados entre os isolados destes grupos. Para o grupo G3, a distância dentro do grupo foi maior do que entre os grupos, o que indica que a variabilidade será aumentada se os isolados (P18 e P13) forem cruzados, como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Matriz de distância genética (%) entre os grupos definidos na caracterização morfológica dos isolados de *Pisolithus* spp.
Table 6. *Genetic distance matrix (%) among the groups defined in the morphological characterization of the Pisolithus spp. isolates*

	G1	G2	G3
G1	**X**		
G2	50% (P7/P15)	**43%*** (P20-P23)	
G3	71% (P15/P18)	57% (P24/P18,P23/17,P23P10)	**73%*** (P18/P13)

* na diagonal – maximização das distâncias dentro dos grupos abaixo da diagonal: maximização das distâncias entre os grupos

4. CONCLUSÕES

As características morfológicas e o marcador genético (isoenzimas) permitiram detectar a diversidade dos isolados de *Pisolithus* spp.

Os cruzamentos de isolados potenciais para ampliar a base genética, indicados pelo uso das características morfológicas, foram P4 (270) e P21(MA1 x MB3 ZI) e P4 (270) e P25 (MA1 x I1 ZI).

Os cruzamentos de isolados potenciais para ampliar a base genética, indicados pelo uso dos marcadores enzimáticos, foram P13 (MB3 x 270 S4+) e P18(MB2 x 270 ZI) e P15 [MB2 x (MB2 x MB2)] e P33 (270 x H6 ZI).

O uso das características morfológicas e o marcador genético (isoenzimas) permitiram o agrupamento dos isolados com relação às procedências geográficas, porém, com resultados diferentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, C. A. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins:** fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. 554 p.

BURGESS, T.; DELL, B.; MALAJCZUK, N.; BERNARD, D. Variation in Pisolithus based on basidiome and basidiopore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. **Mycological Research,** Cambridge, v. 99, n. 1, p. 1-13, Jan. 1995.

CARVALHO, D.; ROSADO, S. C. S.; SOUZA, A. M.; OLIVEIRA, A. F. Produção de culturas monocarióticas e compatibilidade sexual intra e interpopulacional para o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius (*Pers) Coker & Couch. **Cerne,** Lavras, v. 3, n. 1, p. 143-160, 1997.

HO, I. Comparison of eight *Pisolithus tinctorius* isolates for growth rate, enzyme activity and phytohormone production. **Canadian Journal of Forestry Research,** Ottowa, v. 17, n. 1, p. 31-53, Jan. 1987.

JACOBSON, K. M.; MILLER, O. K. Physiological variation between tre-associated populations of *Suillus granulatus* as determined by in vitro mycorrhizal syntesis experiments. **Canadian Journal of Botany,** Ottawa, v. 70, n. 1, p. 26-31, Jan. 1992.

LEI, J.; LAPEYRIE, F.; MALAJCZUK, N.; DEXHEIMER, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers) Coker & Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake *in vitro.* II Ultrastructural

and biochemical changes at the early stage of mycorrhiza formation. **New Phytologist,** New York, v. 116, n. 1, p. 115-122, Sept. 1990.

MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I Antagonism of mycorrhzial fungi to root pathogenic infection fungi and soil bacteria. **Phytopathology,** Lancaster, v. 59, n. 2, p. 153-163, Feb. 1969.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system:** version 1.70. New York: [s. n.], 1992. 470 p.

SLICE, D. E.; KIM, J.; WALKER, J. **Ntsys-Numerical taxonomy and Multivariate Analysis System:** versão 1.80. [S.1.]: [s.n.], 1994. Não paginado.

WATLING, R.; TAYLOR, A.; LEE, S.S.; SIMS, K. L.; ALEXANDER, I. J. A rainforest *Pisolithus*; ists taxonomy and ecology. **Nova Hedwigia,** Stuttgarta, v. 61, n. 3/4, p. 417-429, 1995.