

GABRIELA MALVÁREZ MACEDO

**Aplicação das metodologias PCR/RFLP para
caracterização de fungos ectomicorrízicos
em eucalipto**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre.
Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia,
Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Prof. Vetúria L. de Oliveira

FLORIANÓPOLIS

1999

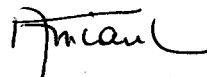
**"APLICAÇÃO DAS METODOLOGIAS DE PCR/RFLP PARA
CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS
EM EUCALIPTO"**

POR

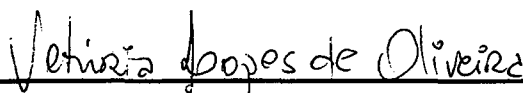
GABRIELA MARBE MALVÁREZ MACEDO

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Comissão Examinadora.**

Comissão Examinadora:



Prof. Ana Maria Viana
Coord. Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia
CCB-UFSC



Profa. Dra. Vetúria Lopes de Oliveira - Orientadora
(MIP/CCB/UFSC)



Prof. Raymond S. Pacovsky
(ESALQ/Piracicaba/SP)



Prof. Paulo Emílio Lovato
(ENR/CCA/UFSC)

Florianópolis, setembro de 1999

Agradecimentos

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade oferecida para a realização deste curso e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Vetúria Lopes de Oliveira, pela amizade e constante apoio.

Aos Professores Raymond Pacovsky e Paulo Lovato.

À Professora Lillián Frioni, pela oportunidade e o apoio.

Aos colegas dos laboratório,
em Florianópolis: Admir, Mônica, Zeca, Fred, Luiz.
em Montévideu: Andrea, Ana Z., Christiam.

Na Faculdade de Agronomia (Montevidéu)
ao Departamento Forestal
ao Laboratório de Biotecnologia
à Cátedra de Bioquímica

À minha Família e Amigos pelo apoio incondicional.

E a todos aqueles que tenham de algum modo participado da realização deste trabalho.

Sumário

Lista de Quadros	vii
Lista de Figuras	viii
Resumo	x
Abstract	xi
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	3
2.1. Atividade florestal no Uruguai	3
2.2. Impacto ambiental de plantações com espécies exóticas	5
2.3. As micorrizas em <i>Eucalyptus</i>	9
2.4. Análise de comunidades micorrízicas	13
3. Adaptação da técnica de PCR/RFLP para a caracterização de fungos ectomicorrízicos em cultura e em simbiose com <i>E. grandis</i>	23
3.1. Material e Métodos	23
3.1.1. Obtenção do micélio de culturas puras de fungos micorrízicos	23
3.1.2. Obtenção das plantas de <i>E. grandis</i>	25
3.1.3. Obtenção de micorrizas <i>in vitro</i>	25
3.1.4. Extração de ADN	27
3.1.5. Amplificação da região ITS dos fungos micorrízicos	28
3.1.6. Restrição da região ITS amplificada	30

3.2.	Resultados e Discussão	33
3.2.1.	Extração de ADN	33
3.2.1.1.	Extração de ADN de micélio de culturas puras de fungos micorrízicos e <i>E. grandis</i>	33
3.2.1.2.	Extração de ADN de micorrizas obtidas de plantas em viveiro e transplantadas para solo	36
3.2.2.	Amplificação da região ITS dos fungos micorrízico	36
3.2.2.1.	Amplificação do ADN de micélio de culturas puras de fungos micorrízicos e micorrizas obtidas <i>in vitro</i> ..	36
3.2.2.2.	Amplificação do ADN de micorrizas de <i>E. grandis</i> obtidas em viveiros	38
3.3.	Restrição da região ITS amplificada de ADN de fungos e suas micorrizas obtidas <i>in vitro</i>	38
4.	Caracterização de fungos ectomicorrízicos em micorrizas de <i>E. grandis</i> obtidas em viveiros por PCR/RFLP	44
3.1.	Material e Métodos	44
4.1.1.	Morfotipagem e separação de micorrizas de plantas de <i>E. grandis</i> obtidas em viveiros	44
4.1.2.	Extração de ADN	46
4.1.3.	Amplificação da região ITS com os <i>primers</i> ITS1F/NL6Bmun e ITS1F/NL6Amun	48
4.1.4.	Restrição da região amplificada	49
4.2.	Resultados e Discussão	50
4.2.1.	Tipos de micorrizas de plantas de <i>E. grandis</i> antes e após transplântio	50
4.2.2.	Extração de ADN	53
4.2.3.	Amplificação da região ITS com os <i>primers</i> ITS1F/NL6Bmun e ITS1F/NL6Amun	53
4.2.4.	Restrição da região amplificada	53
5.	Conclusões	60

6. Considerações finais	61
7. Referências bibliográficas	63
8. Anexos	75

Lista de Quadros

1. Isolados de fungos ectomicorrízicos utilizados para a extração de ADN e inoculação de *E. grandis in vitro* 24
2. Resultados das diferentes etapas da metodologia em relação aos isolados: extração de ADN, amplificação com NSA3/NLC2 e ITS1F/NLB3 (PCR) e restrição com *Mbo* I e *Hinf* I (RFLP) 41
3. Resultados das diferentes etapas da metodologia aplicada a amostras de micorrizas de *E. grandis* obtidas *in vitro* com diferentes fungos 42
4. Características dos viveiros selecionados, indicando a localização, sistema de produção de plântulas e a porcentagem de colonização ectomicorrízica no momento do transplante (Malvárez et al., 1997)..... 45
5. Características químicas dos dois solos utilizados para o transplante das mudas de *E. grandis*. 46
6. Número de pares de bases dos produtos de restrição da região ITS amplificada com ITS1F/NL6Amun, pelas enzimas *Mbo* I e *Hinf* I para as micorrizas de *E. grandis* obtidas em dois viveiros 55
7. Número de pares de bases dos produtos de restrição da região ITS amplificada com ITS1F/NL6Amun, pelas enzimas *Mbo* I e *Hinf* I para as micorrizas de *E. grandis* obtidas de plantas do Viveiro Soust, transplantadas a dois solos: com antecedentes de plantações de *Eucalyptus* spp. (Parque Roosevelt) e sem antecedentes (Canelonelones) 56
8. Número de pares de bases dos produtos de restrição da região ITS amplificada com ITS1F/NL6Amun, pelas enzimas *Mbo* I e *Hinf* I para as micorrizas de *E. grandis* obtidas de plantas do Viveiro Siglo XVIII, transplantadas a dois solos: com antecedentes de plantações de *Eucalyptus* spp. (Parque Roosevelt) e sem antecedentes (Canelonelones) 56

6. Lista de Figuras

1. Sistema de síntese micorrízica *in vitro* entre *E. grandis* e os diferentes isolados de fungos ectomicorrízicos 26
2. Aspecto do ADN obtido de diferentes isolados fúngicos ectomicorrízicos e de *E. grandis* 33
3. Sistema de síntese micorrízica *in vitro* entre isolados fúngicos ectomicorrízicos e plântulas de *E. grandis*..... 34
4. Aspecto de raízes e micorrizas de *Eucalyptus grandis* formadas por alguns dos isolados fúngicos testados. 35
5. Visualização do ADN da região ITS de diferentes fungos e suas micorrizas após amplificação (PCR) com os iniciadores NSA3/NLC2 e eletroforese em gel de agarose. 37
6. Visualização dos produtos da restrição do ADNr de diferentes amostras de fungos ectomicorrízicos e micorrizas por duas enzimas, *Mbo*I (a) e *Hinf* I (b) após amplificação com os iniciadores NSA3/NLC2 seguido de amplificação com ITS1F/NLB3. 39
7. Representação esquemática do gel da figura 6, apresentando os resultados da digestão com a enzima *Mbo*I dos produtos de amplificação com os iniciadores iniciadores NSA3/NLC2 seguido de amplificação com ITS1F/NLB3 40
8. Aspecto das micorrizas do morfotipo A obtidas no viveiro Soust. (170X) 50
9. Aspecto das micorrizas do morfotipo B obtidas no viveiro Soust. (160X) 51
10. Aspecto das micorrizas encontradas nas amostras do Viveiro II (Siglo XVIII) (160X) 51

- 11.** Aspecto das micorrizas observadas nas plantas do Viveiro Soust transferidas ao solo do Parque Roosevelt (solo I) (450X) 52
- 12.** Representação esquemática dos produtos da região ITS amplificada com ITS1F/NL6Amun, pelas enzimas *Hinf I* e *Mbo I* do ADN fúngico para 8 amostras de micorrizas do Viveiro soust. As bandas em cores indicam os diferentes padrões de digestão encontrados nas amostras. 55

Resumo

Os estudos sobre impacto ambiental de *Eucalyptus* spp. têm, geralmente, ignorado o papel da microbiota do solo, como o dos fungos simbióticos que colonizam as raízes (micorrizas). As micorrizas afetam diversos aspectos do funcionamento dos ecossistemas terrestres. Com uma maior conscientização da importância ecológica das micorrizas, a pesquisa está sendo direcionada a experimentos e levantamentos que permitam elucidar aspectos da distribuição e contribuição das micorrizas no funcionamento dos ecossistemas. Nesse sentido, a biologia molecular está adquirindo grande importância nos estudos dessas comunidades. Considerando as poucas informações sobre os simbiontes micorrízicos nas condições de produção de plântulas de *Eucalyptus* spp. no Uruguai, foram adaptadas técnicas de PCR/RFLP para a caracterização dos fungos ectomicorrízicos associados com *E. grandis*. Primeiramente foi amplificado o ADNr da região ITS dos fungos em culturas e de micorrizas obtidas *in vitro*. Foram utilizados os *primers* NSA3/NLC2 com uma segunda reação com ITS1F/NLB3, seguido de restrição com as enzimas *MboI* e *HinfI*. A metodologia utilizando esses *primers* foi efetiva, permitindo caracterizar através de um padrão de bandas, o fungo, tanto em cultura quanto na micorriza. Para micorrizas obtidas de dois viveiros e transplantadas para diferentes solos, foram utilizados os *primers* NL6Amun e NL6Bmun em combinação com ITS1F, seguido de restrição com as mesmas enzimas. Nas amostras de viveiros, foram encontrados dois morfotipos diferentes de micorrizas no viveiro Soust (A e B) e só o morfotipo B no viveiro SXVIII. Quando transplantadas para um solo com antecedentes de plantações, foi encontrado apenas o morfotipo A. As plantas transplantadas para um solo sem antecedentes, apresentaram só o morfotipo B. A amplificação do ADNr das micorrizas obtidas dos viveiros e das plantas transplantadas aos dois solos, só foi efetiva com o par ITS1F/NL6Amun, evidenciando predominância de fungos ascomicetos nessas condições e um número maior de tipos de micorrizas que o determinado por morfotipagem. A metodologia empregada se apresenta como uma ferramenta de grande utilidade para complementar os métodos tradicionais de estudo de comunidades fúngicas.

Palavras chave: *Eucalyptus grandis* - ectomicorrizas - PCR - RFLP - ecologia molecular

Abstract

Studies on the environmental impact of *Eucalyptus* spp. have generally ignored the role of soil microorganisms, such as the fungi which are in symbiosis with plant roots (mycorrhizas). Mycorrhizas affect diverse aspects of ecosystems functioning. With the increasing awareness of the ecological significance of mycorrhizas, research is focusing on studies and surveys which tend to elucidate the distribution and the contribution of mycorrhizas to ecosystems functioning. In this process, molecular biology has acquired great significance in the study of communities. Considering the scarce information about mycorrhizal symbioses in *Eucalyptus* spp. in Uruguay, PCR/RFLP techniques were adapted to characterize ectomycorrhizal fungi associated with *E. grandis*. First, the ITS region of the fungal rDNA was amplified from samples in pure culture and *in vitro* synthesized mycorrhizas. Primers NSA3/NLC2 were used followed by a nested reaction with ITS1F/NLB3. The amplified fragments were then digested with the restriction enzymes *Mbo* I and *Hinf* I. The methodology with these primers was effective, allowing characterization of specific fungi using a band pattern determined for pure fungi in culture and mycorrhiza *in vitro*. For mycorrhiza from two nurseries and from plants transplanted into different soils, amplification was done with primers NL6Bmun or NL6Amun, in combination with ITS1F. Amplified ITS from rDNA was then digested with the same restriction enzymes. Two different mycorrhiza morphotypes were found in nursery Soust (A and B) and just one (B type) in nursery SXVIII. For plants transplanted into a soil previously planted with eucalypt, only type A was found. Type B was the only morphotype found in plants transplanted into a soil without eucalypt antecedents. For these samples, amplification of rDNA was only effective with primers ITS1F/NL6Amun, showing the predominance of ascomycetes mycorrhizas in those conditions. In most cases, restriction patterns showed, a higher diversity than morphotyping. The modified methodology is a valuable tool to complement traditional approaches in community and ecosystem studies.

Key words: *Eucalyptus grandis* - ectomycorrhiza - PCR - RFLP - molecular ecology

1. Introdução

As espécies do gênero *Eucalyptus* são as mais utilizadas em programas de florestamento na América do Sul devido à grande capacidade de adaptação e ao rápido crescimento dessas árvores. Porém, a utilização dessas espécies exóticas em plantações comerciais tem gerado ampla polêmica em relação aos efeitos que elas podem ter nos ecossistemas. Diversos autores enfatizam as vantagens e desvantagens da utilização do eucalipto para reflorestamento ou florestamentos em novas áreas. Apesar das diferentes posições em relação ao tema, todas elas têm em comum o desconhecimento das associações simbióticas entre as raízes e os microorganismos do solo.

As associações micorrízicas (entre raízes e fungos) estão supostamente presentes em todas as espécies do gênero *Eucalyptus*. A falta de conhecimento sobre as relações micorrízicas em sistemas florestais levam, frequentemente, a dificuldades na interpretação das informações sobre o ecossistema. As micorrizas afetam potencialmente todos os aspectos do funcionamento dos ecossistemas terrestres, desde a alocação do carbono, até a imobilização de nutrientes e o relacionamento com outros organismos no sistema.

Um conceito importante no entendimento do funcionamento das micorrizas é o fato de que a simbiose é formada por dois organismos taxonômica, fisiológica e estruturalmente diferentes e que exploram o ambiente também de formas diferentes. O fungo está composto por uma matriz de hifas muito finas o que permite a exploração dos poros do solo. Como as hifas podem explorar 50m ou mais por ml de solo, a capacidade de uma planta de explorar um volume de solo é incrementada notoriamente quando a planta apresenta associações com os fungos micorrízicos.

Entretanto, as micorrizas não podem ser consideradas como a panacéia para o incremento na produção vegetal, embora a associação permita que as plantas tenham um melhor aproveitamento dos recursos, especialmente em condições de estresse.

Com o aumento na conscientização da importância ecológica das micorrizas e de sua diversidade, a pesquisa deve ser direcionada a experimentos e levantamentos que permitam elucidar aspectos quantitativos da distribuição dos diversos tipos, assim como da sua contribuição no funcionamento dos ecossistemas.

Uma aplicação atual da biologia molecular que vem avançando rapidamente é a caracterização da variabilidade genética nos fungos micorrízicos. Esse enfoque permite a avaliação da variabilidade genética das seqüências de ADN em populações naturais de fungos, identificação de espécies e isolados usando os polimorfismos do ADN e rastreamento dos fungos introduzidos no ambiente para determinar a sobrevivência, crescimento e disseminação no solo.

Considerando a quase inexistência de informações sobre os simbiontes micorrízicos nas condições de produção de plântulas e plantações de *Eucalyptus* no Uruguai é que este trabalho visa a adaptação das técnicas de biologia molecular para a caracterização dos simbiontes fúngicos associados com essas plantas.

2. Revisão da literatura

2.1. Atividade florestal no Uruguai

A atividade florestal, impulsionada pela política de incentivos do Estado, tem provocado nos últimos anos uma grande dinâmica no Uruguai. A área de plantações industriais alcança aproximadamente 400 000 ha, principalmente de eucaliptos das espécies *E. grandis*, *E. globulus*, *E. dunnii*, *E. viminalis* e outros. O ritmo do florestamento aumenta cada ano, sendo atualmente de aproximadamente 50 000 ha por ano. Se espera que o subsetor, estabelecido sobre somente 2% da superfície do país, e nos solos menos produtivos, passe a gerar 15% do valor bruto da produção do setor agropecuário (Martino et al., 1997).

As plantações de *Eucalyptus* no Uruguai podem se dividir em três grandes categorias dependendo das espécies e da época em que foram realizadas. As plantações originais são predominantemente de *E. camaldulensis* e *E. tereticornis*, estabelecidas como abrigo para o gado ou para proporcionar combustível, material para cercas e, em menor proporção, madeira para serrarias. No sudeste do país se estabeleceram plantações de *E. globulus* ssp. *globulus*, basicamente com os mesmos propósitos (OEA, 1994).

Um segundo período importante de estabelecimento começou em 1975, e em 1989 a área plantada estava em torno de 88 500 ha, das quais 57,5% correspondia a *E. grandis*.

O terceiro período de florestamento tem lugar na década atual, na qual se apresenta um vertiginoso aumento no ritmo de plantações. No final de 1994 tinha se produzido um incremento de aproximadamente 130 000 ha dos quais 85% com espécies de *Eucalyptus*. Uma característica deste período é a maior diversidade de espécies plantadas. Nos 110 000 ha de *Eucalyptus* estabelecidas nesta década, *E. grandis* tem sido dominante, mas também foram plantadas áreas significativas de *E. globulus* ssp. *globulus*, *E. globulus* ssp. *maidenii*, *E. dunnii* e *E. viminalis*.

A Lei Florestal Nº 15 939, promulgada em 28 de dezembro de 1987, e publicada em 9 de fevereiro de 1988, significou um marco de ação muito favorável aos empreendimentos florestais, com incentivos como o reembolso de parte do custo da plantação, exoneração de impostos e disponibilidade de linhas de crédito de baixo custo e prazos extensos concedidos especialmente para esta atividade (Diário Oficial, 1988). Estes benefícios são outorgados às florestas quando se cumprem as condições determinadas pela lei, quais sejam:

- estabelecer-se em solos de prioridade florestal;
- plantarem-se espécies de prioridade florestal; e
- estabelecerem-se plantações com superfícies de mais de 10 ha e uma densidade mínima de plantas no ano de plantação, a qual é determinada segundo as espécies.

Tanto as espécies como os solos de prioridade florestal são estipulados nos decretos regulamentares da lei. O fato de determinar solos de prioridade florestal (pobres ou degradados e de baixa produtividade agrícola) marca o caráter ambiental da lei ao realizar uma planificação territorial do solo em função da capacidade produtiva. Por outra parte, a determinação de espécies de prioridade florestal, as quais são espécies de crescimento rápido com uma adaptação às condições do país, ratificam a preocupação ambiental da lei (Daniluk, 1998).

A questão ambiental tem diversas implicações neste desenvolvimento florestal. Por uma parte, o florestamento com espécies de rápido crescimento, com fins de extração comercial de madeira, é uma forma eficaz de absorver, mediante o processo de fotossíntese, importantes quantidades de carbono desde a atmosfera atenuando, assim, o chamado efeito estufa. Isto permite a conjunção de um benefício ambiental de interesse universal com uma atividade econômica potencialmente lucrativa. Em contraposição, deve-se considerar que além desses benefícios, também é possível a ocorrência de efeitos ambientais secundários, desejáveis ou não, que é necessário conhecer. Apesar de ser plantados para fins diversos em mais de 80 países, e em extensões de vários milhões de ha, os eucaliptos têm despertado polêmicas em torno de seus eventuais

efeitos sobre o meio ambiente. (Poore e Fries, 1989; Lima, 1993; Caffera et al., 1994).

2.2. Impacto ambiental de plantações com espécies exóticas

Para adquirir sustentabilidade no tempo, todo sistema de produção deve reunir três requisitos (Martino et al., 1997). Em primeiro lugar, deve ser suficientemente rentável em termos de quantidade e qualidade. Normalmente, esse é o elemento principal ou exclusivo na consideração dos diversos agentes econômicos quando se avalia uma determinada atividade. No caso do florestamento no Uruguai, este requisito parece cumprir-se, já que assim o indica a magnitude da inversão no setor e os numerosos estudos de rentabilidade de vários modelos de produção florestal.

Em segundo lugar, o consumo de recursos naturais deve harmonizar-se com sua abundância. A dependência dos recursos não renováveis deveria ser a mínima possível, especialmente enquanto não existam substitutos economicamente viáveis. Os recursos renováveis podem ser utilizados de forma intensiva, mas sempre num ritmo igual ou menor que o da velocidade de formação ou reciclagem.

Por último, a atividade produtiva sustentável deve causar o mínimo possível de prejuízo ao ambiente. Praticamente toda atividade humana causa alterações no meio, principalmente através de contaminações físicas, químicas e biológicas do ar, terra e águas, e diminuição da biodiversidade.

A intervenção deliberada do homem sobre a natureza tende a degradar a disponibilidade de recursos. Ao se incrementar a produtividade que resulta do progresso tecnológico, generaliza-se a tendência de simplificar a composição dos ecossistemas, reduzindo drasticamente a diversidade genética das espécies animais, vegetais e microbianas e sobreexplorando-se os recursos não renováveis. Mas os processos de degradação desses recursos não constituem um fatalismo se seu aproveitamento é feito de maneira racional, ou seja,

se é tomada em conta a dimensão ambiental do desenvolvimento. O desenvolvimento sustentável exige, então, a redução ao mínimo dos efeitos adversos sobre a qualidade do ar, água e terra, com o objetivo de perpetuar a oferta ambiental dos ecossistemas (Daniluk, 1998)

A conscientização e o estudo dos processos de contaminação ambiental, assim como a adoção de medidas para sua diminuição são uma necessidade para Uruguai (e outros países) por dois motivos principais. Em primeiro lugar, o país tem compromissos éticos e legais para contribuir, na medida do seu tamanho, à manutenção da sanidade ambiental do mundo. O segundo motivo é de ordem comercial. Os mercados são cada vez mais exigentes sobre a origem dos produtos consumidos. Não só interessa dispor de alimentos saudáveis, livres de resíduos químicos, como também há uma crescente exigência de que esses produtos sejam obtidos sem afetar o ambiente. A comercialização de produtos uruguaios, principalmente nos países desenvolvidos, estará condicionada num futuro próximo, à certificação da sustentabilidade de seus sistemas de produção (Martino et al., 1997).

O Uruguai é um dos 12 países membros do grupo de trabalho conhecido como Processo de Montreal, iniciado em 1993 com o objetivo de estabelecer compromissos em matéria de manejo florestal sustentável (MGAP, 1997). Em conjunto, estes 12 países reúnem praticamente a totalidade das florestas temperadas e boreais do mundo.

No marco deste processo, foi feita, em 1995, a Declaração de Santiago, que reconheceu o manejo sustentável das florestas como um passo importante para a implementação dos princípios florestais estabelecidos na Agenda 21 da Conferência sobre Ambiente e Desenvolvimento das Nações Unidas, realizada no Rio de Janeiro em 1992. Esta declaração também marcou o valor de possuir uma definição internacionalmente aceita de manejo sustentável das florestas temperadas por meio de critérios e indicadores.

A Declaração de Santiago definiu 7 critérios para a conservação e gestão sustentável das florestas com seus indicadores associados.

Esses critérios consideram a conservação da diversidade biológica dos ecossistemas sob uma atividade produtiva sustentável satisfazendo às necessidades da sociedade. Cada um dos critérios estabelecidos deverá ser avaliado por meio de indicadores quantitativos e qualitativos e suas tendências no tempo. Esses indicadores deverão ser desenvolvidos por cada país atendendo a suas condições particulares de tipos de florestas, informação disponível, recursos para obter a informação, etc.

Em relação à conservação da diversidade biológica, é reconhecido que as florestas constituem um ambiente protetor de diversas formas de vida animal e vegetal. Um estudo recente realizado pela Companhia Forestal Oriental (1995), em plantações de eucalipto no litoral oeste do Uruguai, detectou a presença de 134 espécies de aves, algumas delas nunca antes reportadas no país, e 21 espécies de mamíferos, quatro delas ameaçadas de extinção. O florestamento seria, então, uma forma de preservar e enriquecer a biodiversidade, embora seja necessário considerar que as plantações com espécies exóticas são normalmente menos ricas em fauna e flora do que as florestas nativas (Poore e Fries, 1989).

Embora seja esperado que o processo de florestamento no Uruguai não prejudique a vida silvestre, e que em certa forma a proteja, quase não existem trabalhos científicos que enfoquem as alterações da diversidade biológica em plantações monoculturais de espécies exóticas. Faz-e necessário, então, realizar estudos que permitam obter um diagnóstico do impacto do florestamento sobre a biodiversidade em todas as áreas produtivas no país.

Chama a atenção que na extensa literatura dedicada ao impacto ambiental do eucalipto (Caffera et al., 1994; Martino et al., 1997, Lima, 1997; Daniluk, 1998) a ausência de referências às micorrizas, associações simbióticas benéficas entre fungos e raízes que estão presentes na grande maioria dos vegetais. Os fungos micorrízicos representam um dos componentes essenciais da microbiota do solo sob a floresta. As micorrizas são o vínculo entre a planta e o solo e como agentes de transporte de nutrientes têm um grande impacto na conservação do solo e na nutrição vegetal (Bethlenfalvay, 1992).

Diversos experimentos feitos em condições controladas têm demonstrado que as plantas com micorrizas são maiores e têm maiores concentrações de nutrientes que as plantas não micorrizadas. Estes estudos sugerem que as micorrizas incrementam a capacidade das plantas de fixar carbono pelo incremento no fluxo de nutrientes até as folhas fotossinteticamente ativas. Controlando a disponibilidade e absorção de nutrientes pelas plantas, e passando a formar parte do subsistema de decomposição quando morrem, as micorrizas influenciam indiretamente a ciclagem dos nutrientes (Vogt et al. , 1991)

Como habitantes do solo, os fungos micorrízicos encontram-se dentro das raízes, na rizosfera e no solo, interagindo em todos estes lugares com outros membros da biota do solo. O micélio interno interage principalmente com a raiz, mas também podem haver outros organismos endofíticos (patogênicos ou não) que podem invadir as raízes. Os fungos micorrízicos alteram a resposta do hospedeiro frente a esses organismos. O micélio externo interage com muitos outros organismos, incluindo bactérias, outros fungos, protozoários, nematóides, artrópodos e até animais maiores como mamíferos (Fitter e Garbaye, 1994). A fauna do solo contém numerosas espécies, particularmente nematóides, ácaros e colêmbolos que são importantes consumidores potenciais dos fungos micorrízicos (Fitter e Sanders, 1992). Alguns animais maiores (marsupiais, esquilos, etc) alimentam-se dos esporocarpos dos fungos (micofagia), dependendo destes para a sua sobrevivência e, por sua vez, os animais podem ser importantes veículos na dispersão de esporos dos fungos (Claridge, 1992; Cázares e Trappe, 1994).

A literatura é extensa sobre diversos aspectos relacionados com a simbiose, desde aspectos básicos, como o tipo de micorriza, morfologia, fisiologia e ecologia, taxonomia e filogenia, genética, até aspectos aplicados de metodologia de inoculação, formação em estudos de laboratório e de campo (Klironomos e Kendrick, 1993). Considerando-se que a prática e filosofia da agricultura estão mudando de convencional a sustentável, é de se esperar que as metodologias que prometem manter e restaurar os recursos básicos

sejam exploradas. Nesse sentido, é necessário um exame do potencial da biotecnologia micorrízica para balancear os requerimentos para o rendimento do vegetal e a conservação do solo (Bethlenfalvay, 1992).

2.3. As micorrizas em *Eucalyptus*

As micorrizas são classificadas segundo as estruturas formadas na associação. Há dois grandes grupos, as endomicorrizas, onde as hifas produzidas pelo fungo penetram inter e intracelularmente nas células situadas no córtex formando estruturas características (arbúsculos, vesículas, pelotões) que permitem diferenciar vários tipos de endomicorrizas (vesículo-arbusculares, orquidóides, etc.). As células infectadas intracelularmente pelas hifas são conectadas diretamente com o exterior pelo micélio do fungo que se espalha e ramifica no solo. Desses subtipos as micorrizas vesículo-arbusculares são as mais freqüentes.

As micorrizas vesículo-arbusculares constituem o tipo de simbiose mais comum no solo e são formadas por fungos da ordem Glomales (Filo Zygomycota) (Alexopoulos et al., 1996) com uma ampla variedade de plantas (angiospermas, gimnospermas, pteridófitas) (Smith e Read, 1997).

Apesar das micorrizas vesículo-arbusculares apresentarem maior distribuição entre as espécies vegetais, as ectomicorrizas são de grande interesse florestal, porque a sua distribuição se restringe quase somente às árvores (de Barros et al., 1978) e os fungos ectomicorrízicos apresentam a possibilidade de ser utilizados em programas de inoculação controlada visando o melhoramento da produtividade das espécies florestais.

As ectomicorrizas, onde participam principalmente fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota, e alguns fungos dos filos Deuteromycota e Zygomycota (McGee, 1996), caracterizam-se pela formação de um manto compacto de hifas de aspecto aveludado, que

envolve as radículas das plantas hospedeiras e que pode ser detectado, na maioria das vezes, por inspeção visual do sistema radicular. É comum, também, a rede de micélio extramatricial formada pelo fungo estender-se no solo a vários centímetros das raízes infectadas. As hifas normalmente colonizam a região do córtex das plantas hospedeiras intercelularmente, formando o que se denomina de rede de Hartig. A colonização limita-se às células corticais, pois as hifas intercelulares não penetram nos tecidos da endoderme e do cilindro central.

A colonização das radículas pelos fungos ectomicorrízicos induz ramificação, engrossamento e mudança de cor. As raízes colonizadas por esses simbiossantes podem assumir várias formas, tais como, nodular, bifurcadas, etc. A cor das raízes parece ser determinada pela cor das hifas do fungo e o diâmetro é sempre aumentado em relação às raízes não colonizadas. A quase totalidade das plantas que formam ectomicorrizas é de espécies arbóreas perenes, pertencentes às famílias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae, Myrtaceae, Dipterocarpaceae, Ericaceae, Leguminosae e outras famílias (Smith e Read, 1997). A estrutura anatômica do manto e do micélio externo mantém-se constante para um mesmo gênero fúngico, característica que tem sido empregada para facilitar a caracterização das micorrizas (Ingleby et al., 1990; Agerer, 1994; Goodman et al., 1996-1998).

Qualquer que seja a morfologia da micorriza, o fungo é beneficiado pela obtenção de compostos carbonados sintetizados pelo hospedeiro autótrofo. Por sua vez, a planta tem a sua superfície de exploração do solo aumentada pela presença de hifas que se estendem a vários centímetros além da raiz, e que tendo um diâmetro menor permitem o acesso a sítios onde as próprias raízes não chegariam. A planta, então, obtém diversos benefícios na absorção de nutrientes, especialmente os de baixa mobilidade no solo, como o fósforo (Smith e Read, 1997).

O efeito benéfico das micorrizas resulta de um ou vários mecanismos: aumento na absorção e melhor conservação de nutrientes, alteração na relação planta-patógenos, melhor

adaptabilidade da planta a condições adversas de pH, concentração de nutrientes e metais pesados, tolerância a toxinas do solo e a temperaturas adversas ao crescimento da planta (Smith e Read, 1997).

Oitenta e cinco por cento da superfície florestada a cada ano no Uruguai correspondem ao gênero *Eucalyptus*, família *Myrtaceae*. Dentro deste gênero, uma das espécies mais utilizadas é *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, que se caracteriza por árvores grandes, de tronco reto e bom desrame natural. É originário dos estados de Queensland e Nova Gales do Sul no Leste da Austrália. Essa espécie desenvolve-se melhor em solos com boa capacidade de retenção de água, profundos, de texturas argilosas e bem drenados. Atualmente, trata-se de uma das espécies mais empregadas em plantações comerciais por sua conformação e velocidade de crescimento (Brussa, 1994).

Eucalyptus grandis, como todas as espécies desse gênero, é capaz de formar micorrizas (Chilvers e Pryor, 1965) e apresenta tanto ectomicorrizas quanto micorrizas vesículo-arbusculares. Diferentes aspectos da simbiose entre fungos ecto e endomicorrízicos com espécies do gênero *Eucalyptus* têm sido avaliados (Lapeyrie e Chilvers, 1985; Chilvers et al. 1987; Boudarga et al., 1990, Bellei et al., 1992; Oliveira et al., 1997; Meinert, 1998).

No Uruguai, a colonização das raízes de eucalipto com fungos micorrízicos se dá de forma natural já que nenhum dos viveiros no país tem um programa de inoculação micorrízica.

Estudos recentes têm mostrado que as plantas de *E. grandis* já estão colonizadas no momento do transplante (Malvárez et al, 1997). Plantas de seis viveiros, localizados em diferentes regiões do país e com diferentes práticas de manejo (recipiente, substrato, desinfecção, fertilização), foram avaliadas por esses autores. Todas as plantas analisadas apresentaram os dois tipos de micorrizas, sendo a porcentagem de ectomicorrizas (15 - 40%) sempre superior à de endomicorrizas (6 - 20%).

As diferenças entre os viveiros podem ser explicadas pelas diferenças no manejo em cada caso. Os viveiros com maiores níveis

de fertilização (conteúdo de fósforo superior a 300ppm) e maior teor de matéria orgânica no substrato (20 - 30%) apresentaram menor intensidade de colonização ectomicorrízica. Por outro lado, viveiros com maior volume de recipiente e maior densidade do substrato apresentaram maior colonização. As porcentagens de endomicorrizas, no entanto, não foram afetadas por estes fatores. Em termos de crescimento, os viveiros mais mecanizados (por exemplo, com irrigação automática) apresentaram plantas mais homogêneas e com menor variação no nível de colonização, ainda que baixo em relação aos viveiros menos mecanizados.

Um segundo estudo avaliou os níveis de colonização em um viveiro e em plantações de diferentes idades em solos diferentes com plantas provenientes do mesmo viveiro (Kozloviz et al., 1997). As plantas de viveiro só apresentaram colonização 14 semanas após semeadura e, em todos os casos, só ectomicorrizas. Das amostras de plantações de quatro idades diferentes em dois locais, só um dos locais apresentou endo e ectomicorrizas, enquanto que o segundo, de textura mais arenosa, só apresentou ectomicorrizas.

Esses estudos demonstram que os simbioses fúngicos estão presentes no momento do transplante e, também, que há uma colonização a campo embora não tenha havido uma introdução controlada (inoculação). Não se conhece, porém, quais são os fungos colonizando as plantas no viveiro e se eles persistem a campo ou são substituídos por outros simbioses.

Para permitir o uso da composição da comunidade micorrízica como indicador do efeito do plantio no ambiente ou avaliar as características que fazem dos fungos presentes numa plantação colonizadores primários, existe a necessidade de adequar uma tecnologia, rápida e precisa, que seja sensível às variações na comunidade. Faz-se necessário conhecer a diversidade de fungos nativos presentes no solo e viveiros, assim como as características desses e sua capacidade de competição e eficiência na simbiose.

Todas essas informações são essenciais para determinar quais seriam as propriedades necessárias a um fungo micorrízico a ser utilizado num programa de micorrização controlada. Tal fungo deverá

ser capaz de competir eficientemente com esses colonizadores primários, ou ser um deles, e persistir em simbiose por um tempo suficiente para trazer benefícios à planta que justifiquem a inoculação (maior sobrevivência das mudas em viveiro e a campo, menor tempo no viveiro, aumento na produção, etc.).

Restringindo-se às análises das estruturas acima da superfície, os especialistas de populações vegetais têm ignorado o papel dos fungos micorrízicos nessas comunidades. É mais evidente agora que a comunidade vegetal e a dinâmica das populações estão fortemente influenciadas e influenciam a dinâmica dos fungos micorrízicos (Hawksworth, 1991; Timonen et al., 1997).

2.4. Análise de comunidades micorrízicas

A diversidade fúngica é usualmente negligenciada no manejo das florestas não obstante o papel desempenhado na ciclagem de nutrientes e na produtividade do hospedeiro. Os fungos ectomicorrízicos são componentes chave da cadeia alimentar das florestas (Amaranthus e Luoma, 1995). Exsudatos e hifas desses fungos formam a conexão entre os produtores sobre a superfície e as cadeias alimentares do solo transmitindo carbono fixado fotossinteticamente aos consumidores, tais como bactérias, protozoários, artrópodos e animais. O estudo das comunidades micorrízicas, especialmente ectomicorrízica, tanto em florestas nativas como implantados, pode representar um valioso indicador do impacto ambiental da introdução de espécies vegetais exóticas, como o eucalipto, no ecossistema.

O objetivo da análise da comunidade ectomicorrízica é identificar e monitorar os taxa que integram a comunidade e suas interações com outros membros dessa comunidade no tempo e no espaço. Os procedimentos tradicionais para a análise de comunidades incluem a coleta e identificação de corpos frutíferos (Dahlberg e Stentröm, 1991), caracterização morfológica de micorrizas e

isolamento dos fungos (Zak, 1973; Ingleby et al., 1990; Agerer, 1994; Goodman et al., 1996-1998).

Estudos baseados na presença de corpos frutíferos têm sido empregados com frequência na análise das comunidades com diferentes objetivos (Nylund et al., 1995; Gardes e Bruns, 1996; Dahlberg et al., 1997). Essa metodologia pode ser aplicada por micólogos especialistas mas tem problemas devido à periodicidade e sazonalidade das frutificações e não considera os fungos que não frutificam ou que formam frutificações difíceis de visualizar, como é o caso de fungos hipógeos.

Resultados obtidos por Gardes e Bruns (1996), utilizando a distribuição de frutificações para estudar a diversidade de espécies de uma comunidade ectomicorrízica em locais de *Pinus muricata*, demonstraram que a localização dos corpos frutíferos em relação às ectomicorrizas (avaliadas por métodos de biologia molecular) variou entre as espécies. A relação entre a composição sob (micorrizas) e sobre (frutificações) a superfície foi imprecisa, pelo menos ao nível da comunidade. Esses autores concluíram que a presença de corpos frutíferos é indicativo da presença das espécies no solo, mas sua ausência não significa que as espécies estejam ausentes.

Outro problema associado ao uso da produção de corpos frutíferos como indicadores da diversidade de fungos é a idéia amplamente aceita de que a produção relativa de frutificações está diretamente relacionada com a dominância das espécies no solo. Nylund et al. (1995) também demonstraram que os inventários de frutificações não se correlacionam bem com a estrutura da comunidade micorrízica quando se estuda a distribuição de espécies.

O estudo das comunidades de ectomicorrizas tem sido, até o momento, um problema de difícil solução. Um procedimento tradicional é a contagem das raízes curtas colonizadas. Os resultados são apresentados como porcentagem do número total de raízes curtas, mas não toma em consideração a influência da colonização micorrízica no sistema radicular. Uma planta colonizada tem, usualmente, mais raízes curtas que uma não colonizada (Last et al., 1989; Timonen et al., 1997).

A caracterização morfológica (morfortipagem) das ectomicorrizas tem sido outra forma usada também para distinguir as raízes colonizadas (Chilvers, 1968; Zak, 1973; Dahlberg e Stenström, 1991; Agerer, 1994). A morfortipagem estabelece tipos baseados em caracteres macro e microscópicos, assumindo que um morfotipo coincide com uma espécie ou grupo de espécies. As ectomicorrizas encontradas em condições naturais de *Eucalyptus* têm sido caracterizadas e agrupadas em 8 grupos segundo a organização do manto e a estrutura das rizomorfas associadas (Chilvers, 1968).

Esse método tem sido aplicado a comunidades micorrízicas, incluindo estudos sobre plântulas transplantadas de *Pinus* (Dahlberg e Stenström, 1991), sobre o impacto de perturbações na estrutura da comunidade micorrízica em plantações de pinos (Erland, 1992) e estudos de especificidade (Massicote et al., 1994).

A vantagem desse método é que os tipos micorrízicos podem ser rapidamente identificados por um pesquisador experimentado, mas a variação intraespecífica na morfologia entre taxa e dentro do mesmo taxon em diferentes hospedeiros ou ambientes não é bem conhecida (Egger, 1995). Além disso, pode ser complicado de usar e apresenta falta de repetitividade na classificação (Nylund et al., 1995)

A técnica mais laboriosa para a diferenciação de taxa consiste no isolamento dos fungos das raízes colonizadas (Molina e Palmer, 1982). Essa metodologia tem sido usada extensivamente para caracterizar comunidades (Danielson, 1991; Hutchinson, 1991) e permite a diferenciação dos fungos que formam micorrizas morfológicamente similares. Os problemas incluem variação intraespecífica na morfologia da cultura e o fato de que alguns dos simbiontes fúngicos não crescem em cultura pura (Egger, 1995). Os métodos moleculares resolvem a maioria destes problemas dado que são independentes da variação ambiental ou do hospedeiro.

A ecologia molecular é um campo relativamente novo no qual a reação de polimerização em cadeia ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Mullis e Faloona, 1987) tem tido um papel cada vez mais

importante na integração de dados genéticos com observações de campo de várias espécies, para resolver temas como a identificação de sexos, sistemas de acasalamento, migração e fluxo de genes, interações parasito-hospedeiro e interações simbióticas e diversidade de comunidades (White, 1996). Através da PCR, uma técnica de amplificação enzimática de seqüências de ADN a partir de pequenas quantidades de amostra, começa-se a apreciar as limitações que os métodos microbiológicos de cultivos têm infringido ao entendimento da diversidade microbiana em amostras ambientais. Dado que as seqüências de ADN são amplificadas diretamente, a PCR pode ser aplicada a qualquer tecido, incluindo cultura, corpos frutíferos ou raízes micorrizadas.

O desenvolvimento da técnica de PCR permitiu novas possibilidades. A PCR é uma técnica de síntese de ADN *in vitro* pelo qual um fragmento de ADN pode ser especificamente amplificado. Envolve duas seqüências de oligonucleotídeos (iniciadores) que flanqueiam um segmento de ADN a ser amplificado por ciclos repetidos de desnaturação por calor, união dos iniciadores (*annealing*) e extensão (polimerização de nucleotídeos) por uma ADN polimerase termoestável. Estes iniciadores se unem a fitas opostas da seqüência alvo e estão orientados de modo que a síntese procede sobre a região entre os iniciadores. O produto do primeiro ciclo de amplificação passa a ser alvo do seguinte ciclo e é reconhecido pelos iniciadores. Ciclos sucessivos de amplificação dobram a quantidade de ADN sintetizado no ciclo anterior. O resultado é uma acumulação exponencial de um fragmento específico. Os produtos da reação de PCR podem ser detectados diretamente em géis de agarose com brometo de etídio (Tychy e Simon, 1994).

O fator chave do processo é a determinação de iniciadores específicos para a identificação dos limites de sítios alvo. Usando iniciadores adequados, diferentes questões em diferentes níveis taxonômicos podem ser estudadas (Nylund et al., 1995). O taxon selecionado pode ser identificado em materiais mistos como os fungos micorrízicos misturados com solo e tecido vegetal (Gardes e Bruns, 1993; Egger, 1995).

Dado que o objetivo primário da análise da comunidade é distinguir as espécies, os marcadores moleculares usados devem ser universalmente conservados entre os organismos estudados e exibir variabilidade máxima entre espécies e mínima dentro das espécies. O gene que codifica os ARN's (ARNr's) estruturais do ribossomo (ADNr) satisfaz esses critérios (Egger, 1995). O gene ADNr se caracteriza por ser multi-cópia e altamente conservado em procariotos e eucariotos. Uma vantagem do ADNr é que a amplitude de variação é exibida por diferentes regiões, sendo as regiões de codificação de ARN ribossomal as mais conservadas, os espaçadores internos (ITS, *Internal Transcribed Spacers*) moderadamente conservados e os espaçadores intergênicos (IGS, *Intergenic Spacers*) mais variáveis.

Vários iniciadores têm sido estabelecidos para amplificar essa região. Alguns são de regiões altamente conservadas e amplificam em um grande número de organismos, outros têm sido criados para amplificar especificamente só fungos ou certos grupos de fungos (White et al., 1990; Gardes e Bruns, 1993; Egger, 1995). A especificidade dos iniciadores determina o tipo de material que pode ser usado para a amplificação. Iniciadores altamente conservados podem ser usados só para amplificações em culturas puras. Iniciadores fungo específicos podem ser usados para amplificar a partir de corpos frutíferos ou micorrizas sem perigo de contaminação por outros ADNs (Gardes e Bruns, 1993).

Para maximizar o potencial de distinguir espécies, Egger (1995) estabeleceu os iniciadores NL6A_{mun} e NL6B_{mun}. Esses iniciadores são específicos para fungos e não amplificam ADN vegetal. Eles diferem em somente duas posições e podem também ser combinados com iniciadores ITS5 ou ITS1 (White et al., 1990) ou outros (ITS1F) (Gardes e Bruns, 1993).

Digerindo os produtos de PCR com endonucleases de restrição e examinando os produtos por eletroforese, padrões distintivos de bandas mostram polimorfismos no material amplificado (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Alternativamente, a

seqüência de bases de todo o fragmento de ADN pode ser determinada.

Os polimorfismos na região ITS do ADNr têm se mostrado apropriados para a identificação de espécies de fungos micorrízicos (Nylund et al., 1995). O método mais simples de avaliar as variações na seqüência nos segmentos de ADN amplificados é a análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP). O método consiste na digestão do fragmento amplificado com enzimas de restrição seguido por eletroforese. As endonucleases de restrição reconhecem seqüências específicas (usualmente de 4 ou 6 pares de bases) e clivam o ADN nesse sítio. Diferentes enzimas são utilizadas para a restrição com sítios de reconhecimento não sobrepostos de forma que as mutações detectadas sejam independentes (Egger, 1995).

Vários estudos têm usado esse método de amplificação da região ITS ou IGS seguida de análise de RFLP para distinguir isolados fúngicos ectomicorrízicos (Nylund et al., 1995; Kårén et al., 1997). A técnica apresenta diversas aplicações, como estudos sobre o efeito de fatores ambientais na composição da comunidade ectomicorrízica, tais como seca, poluição e fertilização (Kårén et al., 1996), mapeamento de micorrizas em viveiro e a campo, pela identificação das micorrizas mais freqüentes e estimativa da freqüência (Erland et al., 1994, Erland, 1995); estabelecimento de correspondência entre os fungos formando as micorrizas e as frutificações em plantações (Gardes e Bruns, 1996). Também estudos de sinecologia de micorrizas e monitoramento de inoculantes de fungos micorrízicos comestíveis ou não (Henrion et al., 1994 a,b; Matsumoto e Fukumasa-Nakai, 1995; Buscot et al., 1996; Nicholson et al., 1997).

Kårén et al. (1997) examinaram a extensão da variação inter e intraespecífica da região ITS do ADNr em fungos ectomicorrízicos de florestas de coníferas e concluíram que a análise de RFLPs, em combinação com a taxonomia numérica, sem necessidade de correr as amostras no mesmo gel, apresenta-se como praticável, calibrando os erros experimentais envolvidos. Foi confirmado que o grau de variação na região ITS de diferentes fungos ectomicorrízicos é alto,

mas os resultados sugerem que a variação intraespecífica da região ITS é baixa. Entretanto, essa variação deve ser monitorada quando se cobre um grande número de espécies, ou quando as comparações são feitas em áreas extensas ou sítios diferentes, devendo ser incluído, quando possível, material de referência local

Em estudos de campo, a técnica tem sido usada para identificar a presença e abundância de *Tylospora fibrillosa* em *Picea sitchensis* e *Picea abies* (Erland et al., 1994, Erland 1995). Foram amostradas micorrizas de plantações jovens e velhas e os micobiontes foram isolados em cultura pura. O ADN foi extraído e fragmentos do ADNr amplificados. Os fragmentos amplificados (600pb) foram digeridos com enzimas de restrição para detectar polimorfismos. Os resultados das RFLPs separaram claramente *T. fibrillosa* de outros fungos, mas houve poucas diferenças entre os isolados dessa espécie. A amplificação da região ITS e digestão com *Hinf* I provaram ser um método rápido para distinguir *T. fibrillosa* de um grande número de outros basidiomicetos.

Em outros estudos, foi avaliada a diversidade de ectomicorrizas em diferentes plantações florestais. Gardes e Bruns (1996) avaliaram a diversidade de espécies de uma comunidade ectomicorrízica em florestas naturais de *Pinus muricata* para verificar a relação entre a composição de espécies na superfície e sob o solo. Para isso, foram amostrados e analisados simultaneamente corpos frutíferos e micorrizas. Os resultados demonstraram que a localização dos corpos frutíferos em relação às ectomicorrizas variou entre as espécies não podendo ser correlacionadas com precisão os dois tipos de estrutura. Os resultados obtidos confirmam as dificuldades que se apresentam no estudo de comunidades micorrízicas.

A metodologia também representa uma ferramenta importante no caso de identificação e filogenia de fungos comestíveis, micorrízicos ou não, em culturas puras e no campo (Henrion et al., 1994a; Matsumoto e Fukumasa-Nakai, 1995; Buscot et al.: 1996; Nicholson et al. 1997).

As trufas são um exemplo de fungos micorrízicos comestíveis de alto valor comercial. Mesmo que muitos experimentos tenham mostrado que a inoculação de plantas com trufas seja benéfica em termos de produção de corpos frutíferos, os resultados têm sido erráticos nos lugares onde as trufas nativas e comunidades de fungos ectomicorrízicos são grandes e competitivas. É necessário saber como a população natural pode interagir com os isolados introduzidos para selecionar candidatos potenciais para programas de inoculação. Isto requer acompanhamento dos isolados introduzidos para determinar a sobrevivência, crescimento e disseminação dentro da comunidade microbiana (Henrion et al., 1994a).

Nesse sentido, foram analisados os polimorfismos da região ITS do ADNr para caracterizar corpos frutíferos e ectomicorrizas de espécies de trufas (Amicucci et al., 1996; 1998). A identificação das micorrizas foi obtida por digestão dos produtos de PCR usando enzimas de restrição. O resultado mostrou que a estratégia usada em ambas as estruturas é adequada e sensível para caracterizar os fungos simbióticos das raízes colonizadas. A maioria das micorrizas examinadas não pertencia às espécies utilizadas para inoculação, nem a outras espécies de *Tuber* estudadas.

A metodologia também tem se mostrado efetiva para monitorar a sobrevivência de inoculante de *Laccaria bicolor* em viveiros (Henrion et al., 1994b). Antes do uso desses fungos em programas de inoculação, é necessário determinar como o inóculo fúngico coloniza o sistema radicular e compete com as populações nativas. O status ectomicorrízico nos sistemas radiculares após a inoculação no viveiro tem sido tradicionalmente avaliado por identificação morfológica do simbionte fúngico, ligação do micélio dos corpos frutíferos ao hospedeiro ou exame microscópico das estruturas fúngicas na raiz. No entanto, o uso desses procedimentos impossibilita afirmar se o isolado fúngico identificado foi o mesmo usado para inocular as plântulas. Portanto, o crescimento e sobrevivência diferencial das plântulas poderia não ser resultado da ação do fungo introduzido. *Laccaria* se apresenta como um gênero difícil de discriminar entre espécies usando caracteres morfológicos e fisiológicos. Por estas

razões, o trabalho teve como objetivo estabelecer a variação da IGS do ADNr em espécies de *Laccaria* ao nível dos isolados e determinar a persistência e disseminação do isolado introduzido como simbiote ectomicorrízico em *Pseudotsuga menziesii* no viveiro. Os resultados indicam que o IGS amplificado revela marcadores isolado-específicos. E a técnica permite, portanto, o acompanhamento do isolado na simbiose.

A possibilidade de poder diferenciar o ADN fúngico do vegetal tem permitindo o uso da técnica não só em associações benéficas como as micorrizas, mas também no caso de doenças causadas por fungos onde os ADN's do fungo e hospedeiro também encontram-se misturados. A nível molecular, a caracterização de fungos patogênicos representa uma situação similar à das micorrizas e a técnica tem sido usada extensivamente neste sentido (Kusaba e Tsuge, 1994; Lacourt et al., 1994; Ueng e Chen, 1994; Donaldson et al., 1995; Raffin et al., 1995; Ueng et al., 1995; Edel et al., 1996; Matsumoto et al., 1996; Fouly et al., 1997).

Na análise realizada por Martino et al. (1997) sobre o possível impacto do eucalipto não foram identificados grandes problemas ambientais associados ao florestamento com eucaliptos no Uruguai. No entanto, é necessário confirmar essa hipótese e obter informações mediante estudos científicos e de monitoramento, assim como há necessidade de descrever indicadores de sustentabilidade da produção. Também enfatizam a necessidade de obter informação científica sobre os processos básicos da dinâmica de nutrientes nos sistemas florestais para desenvolver técnicas de manejo da fertilidade e preservação dos nutrientes naturais.

Até o momento, o estudo de comunidades micorrízicas em plantações de eucalipto tem sido realizado pelos métodos tradicionais de avaliações da distribuição de esporocarpos de fungos micorrízicos e quantificação e morfotipagem de micorrizas em diferentes plantações (Giachini et al., 1999; Oliveira et al., 1999). As técnicas de biologia molecular têm sido aplicadas a aspectos mais básicos da simbiose, especialmente do simbiote fúngico (Tommerup, 1992; Tagu et al., 1993; Carnero et al., 1997; Junghans et al., 1998; Martin et al.,

1998). Também não existem estudos de aplicação de técnicas de biologia molecular em micorrizas nas condições de viveiro ou de campo.

Nesse contexto, parece indispensável aprofundar-se o estudo da composição e dinâmica da comunidade micorrízica associada com as florestas de *Eucalyptus* nas condições do Uruguai, explorando-se as possibilidades das tecnologias atuais. As técnicas de biologia molecular, especialmente a amplificação da região ITS seguida de análise de polimorfismos (RFLP), apresentam potencial para a determinar variações de populações ectomicorrízicas associadas a plantações de eucalipto como indicadores de impacto ambiental, ou, simplesmente, no estudo da diversidade das comunidades fúngicas nessas plantações.

3. Adaptação da técnica de PCR/RFLP para a caracterização de fungos ectomicorrízicos em cultura e em simbiose com *E. grandis*

3.1. Material e Métodos

Com o objetivo de adaptar a técnica de PCR/RFLP para a caracterização de fungos ectomicorrízicos, trabalhou-se numa primeira instância com culturas puras desses fungos e com micorrizas formadas *in vitro* pelos mesmos fungos em associação com *E. grandis*.

3.1.1. Obtenção do micélio de culturas puras de fungos micorrízicos.

Aproximadamente 100 mg de micélio de culturas, cultivadas durante 2 semanas em meio MNM (Melin Norkrans Modificado)(Marx, 1969), foram utilizados para a extração do ADN.

Os isolados fúngicos utilizados são apresentados no **Quadro 1**. Todos os fungos foram obtidos da coleção de fungos ectomicorrízicos do Laboratório de Micorrizas (MIP, UFSC).

Quadro 1 Isolados de fungos ectomicorrízicos utilizados para a extração de ADN e inoculação de *E. grandis in vitro*

Isolado	Código	Fungo	Origem
C36	Amance	<i>Cenococcum geophilum</i> Fr	Nancy - França
C2	Marx-146	<i>Cenococcum geophilum</i> Fr	Geórgia - USA
145	UFSC-Pt145	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	Florianópolis - Brasil
24	UFSC-Pt24	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	Florianópolis - Brasil
45	H 4937	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	Queensland - Austrália
46	H 4943	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	Queensland - Austrália
89	H 1234	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	WA - Austrália
99	Pt 16	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	Treinta y Tres - Uruguai
100	Et1	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	Treinta y Tres - Uruguai
65	UFSC-Scl65	<i>Scleroderma</i> sp. (Persoon) Fries	Três Barras - Brasil
122	UFSC-122	<i>Scleroderma citrinum</i> Pers	Florianópolis - Brasil
123	UFSC-123	<i>Scleroderma citrinum</i> Pers	Rio Vermelho - Brasil
124	UFSC-124	<i>Scleroderma citrinum</i> Pers	Três Barras - Brasil
Am 161	UFSC-Am 161	<i>Amanita muscaria</i> (L. ex. Fr.) Pers. ex. Hooker	Correia Pinto - Brasil
Ch 98	UFSC-Ch98	<i>Chondrogaster angustiporus</i> Castellano, Trappe, Giachini & Claridge	Três Barras - Brasil
Pax4	Pi	<i>Paxillus involutus</i> (Batsch) Fr	Nancy - França
Hg 93	UFSC-Hg93	<i>Hysterangium gardneri</i> Fischer	São João do Triunfo - Brasil
Ch 163	UFSC-163	<i>Chondrogaster angustiporus</i> Castellano, Trappe, Giachini & Claridge	Correia Pinto - Brasil

3.1.2. Obtenção das plantas de *E. grandis*

Para a extração de ADN vegetal, a ser utilizado como controle negativo nas reações de amplificação, foram utilizados explantes micropropagados de *E. grandis*, produzidos sob condições axênicas pelo Laboratório de Biotecnologia da Facultad de Agronomia, Montevideú, Uruguai.

3.1.3. Obtenção de micorrizas *in vitro*

Para a síntese de micorrizas *in vitro*, foram utilizadas plântulas de *E. grandis* germinadas em meio TWM (*Tap Water Medium*): $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 500 μM , H_3BO_3 - 3 μM , glicose - 2 g/L, água da torneira - 1 L, ágar - 0,8%, pH 5,7) (Thomson et al., 1994) que foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio mineral líquido MNM (sem sacarose), modificado de Fortin et al. (1980) e inoculadas com discos de micélio provenientes das bordas das culturas com duas semanas de crescimento em meio MNM sólido. A plântula e o inóculo foram colocados entre uma folha de papel de filtro e a parede do tubo (Figura 1). O sistema permite uma fácil visualização da formação das micorrizas e a obtenção das mesmas sem a interferência de outros materiais (areia, vermiculita, etc). A inoculação foi realizada ao mesmo tempo da sementeira da planta no tubo ou previamente à sementeira, permitindo ao fungo colonizar o substrato antes da introdução da planta.

As plantas inoculadas (15 plantas por fungo), mais uma testemunha (15 plantas não inoculadas), foram colocadas em câmara de crescimento (25°C, 12h de luz) e observadas semanalmente para constatar a formação de micorrizas.

3.2. Extração de ADN

O primeiro passo da metodologia, tanto para as culturas puras quanto para as micorrizas, foi a extração do ADN. A extração consistiu, em todos os casos, na maceração do material e digestão das estruturas celulares para liberação do ADN, seguida de uma desproteínização, de forma a obter o ADN no estado mais puro possível.

O protocolo seguido para a extração do ADN foi modificado de Lee e Taylor (1991) e Martin (1995). O material fúngico, ou as micorrizas, foi colocado em tubos tipo eppendorf e homogeneizado em 50 μL de TNE (10mM Tris, 100 μM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8), 0,2% 2- β -mercaptoetanol (2-ME). O material foi macerado até homogeneização, sendo adicionados mais 50 μL de TNE, 0,2% de 2-ME e 300 μL de CTAB -1% 2-ME (2% CTAB brometo de cetil-trimetil amônio, 100mM Tris, 20mM EDTA, 1,4 M NaCl, pH 8), para a digestão das estruturas celulares. As amostras em CTAB foram incubadas a 65°C por 1 h. Posteriormente à incubação, foi adicionado 1 volume (ca. 400 μL) de fenol-clorofórmio (4% isoamil álcool) (1/1), misturado para emulsificação e centrifugado por 10 minutos a 13000 $\times g$.

Aproximadamente 2/3 da fase aquosa foram transferidos para um novo tubo recebendo 300 μL de clorofórmio (4% isoamil álcool) e foram centrifugados a 13000 $\times g$ por 5 min. Novamente, foi retirada a fase aquosa para outro tubo à qual foram adicionados 20 μL de NaOAc 3M e 0,5 volume de isopropanol (-20°C) para a precipitação do ADN da solução. Os tubos foram agitados lentamente por inversão e centrifugados por 2 min a 13000 $\times g$. Após a centrifugação, foi descartada a solução e o *pellet* resultante foi lavado com 200 μL de álcool 80% a -20°C. Após rápida centrifugação, o álcool foi descartado. Deixou-se o *pellet* secar durante a noite e ressuspendeu-se em 100 μL de TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) para o material fúngico e 50 μL para o caso das micorrizas.

O ADN obtido foi submetido a eletroforese em gel de agarose (1%) com 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de brometo de etídio. O tampão de corrida

utilizado foi TBE 0,5x (0,045M Tris Borato, 0,001M EDTA, pH8) (Sambrook et al., 1989). Para marcador de peso molecular foi utilizado λ *Hind*III (SIGMA), 1 μ g por poço (2 μ g/ μ L).

Se carregaram 10 μ L de amostra com 2 μ L de tampão de aplicação (Tampão 6x: 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol FF, 15% Ficoll) (Sambrook et al., 1989). A corrida foi realizada a 5V/cm durante aproximadamente 1 h. O gel foi fotografado com sistema de câmera polaroid sobre o transiluminador UV ($\lambda = 312$ nm). O ADN extraído foi conservado a -20 °C até o momento da utilização.

3.3. Amplificação da região ITS dos fungos micorrízicos

A etapa seguinte consistiu na amplificação seletiva de um fragmento do genoma fúngico pela técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) (Mullis e Faloona 1987). Para amplificar o ADN do fungo quando associado às raízes da planta, foram escolhidos iniciadores que amplificam a região ITS. Como mencionado anteriormente (cf. item 2.4.), a região ITS é uma região conservada nos diferentes organismos, mas que apresenta suficiente variabilidade para permitir a caracterização a nível de espécie dentro de um grupo, como seria o caso dos fungos ectomicorrízicos.

Para a amplificação dessa região, foram utilizados os iniciadores NSA3, (5'-AAA CTC TGT CGT GCT GGG GAT A-3') e NLC2 (5'-GAG CTG CAT TCC CAA ACA ACT C-3') e ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A -3'), proposto por Gardes e Bruns (1993), em combinação com NLB3 (5'-GGA TTC TCA CCC TCT ATG A-3') (K. Martin, resultados não publicados), sintetizados por Operon Technologies Inc. Estes iniciadores são específicos para ADN fúngico do gene ARNr (ADNr), amplificando tanto o ADN de asco como de basidiomicetos.

As concentrações finais dos componentes da reação para os iniciadores NSA3/NLC2 foram: 1x de tampão, 0,2 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 μ M de cada um dos iniciadores, 5 mg/mL de

BSA, 0,5 U de *Taq* polimerase. Foram utilizadas polimerases de duas procedências, a *Taq* polimerase da PROMEGA e a *Taq* polimerase produzida pelo Centro de Biotecnologia da UFRGS (Porto Alegre). A procedência da polimerase não implicou em modificações no protocolo.

Para o ajuste das condições da reação, foram realizadas reações com 25 μL de volume total. Nesse volume foram colocados 5 μL de amostra, 15 μL de mistura de reação (todos os reagentes menos a polimerase) e 5 μL da polimerase em tampão 1x.

Com a finalidade de aumentar a especificidade da reação, foi utilizada a metodologia de *Hot Start PCR* que consiste em separar os reagentes da polimerase por uma capa de parafina (Martin, 1995). Para isso, os reagentes (*mistura de reação e amostra*) foram colocados no tubo junto com um disco de parafina sólida (aproximadamente 20 μL) e submetidos a 94 °C durante 4 min para dissolver a parafina seguido de esfriamento.

Ao esfriar, a parafina forma uma capa sobre a solução que vai separar os demais reagentes da solução da polimerase em tampão 1x posicionada na parte superior. No começo dos ciclos de amplificação, a parafina volta a se fundir e permite o contato dos componentes da reação. Além de aumentar a especificidade da reação, o uso de parafina dispensa o óleo mineral utilizado para evitar perdas por evaporação.

A amplificação foi realizada em termociclador Stuart Scientific (Modelo Gene-Tech, MINI-GENE). A temperatura de pareamento (*annealing*), temperatura na qual os iniciadores se unem à fita de ADN, foi de 69°C por 5 ciclos e de 68°C por outros 35, completando um total de 40 ciclos. O programa seguido foi o seguinte:

95°C/20 s, para a separação das fitas de ADN;

69 ou 68°C/45 s, temperatura de pareamento;

72°C/30 s para a ação da polimerase unindo os nucleotídeos segundo a seqüência apresentada na fita que está sendo duplicada (extensão). No final, a reação foi submetida a uma fase de extensão a 72°C durante 4 min.

O par de iniciadores ITS1F/NLB3 amplifica dentro da seqüência de amplificação de NSA3/ NLC2 (*nested reaction*). As condições da reação foram similares às utilizadas com o par NSA3/ NLC2, diferindo apenas na temperatura de pareamento que foi de 62°C por 5 ciclos e de 60°C por outros 35 para completar um total de 40 ciclos. O ADN usado neste caso consistiu de uma diluição 1/10 do produto da reação com os iniciadores NSA3/ NLC2.

Para verificar a amplificação dos produtos da reação, 10µL de amostra foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%, nas mesmas condições indicadas no item 3.2. O marcador de peso molecular utilizado foi 123 bp ADN Ladder de GIBCO BRL, 1µL por poço de solução 1µg/µL em 9µL TE (total de 1µg por linha) ou pGEM® (PROMEGA, também 1µL por poço de solução 1µg/µL em 9µL TE (total de 1µg por linha).

O ADN produto de amplificação foi conservado a -4°C até o momento de sua utilização.

3.4. Restrição da região ITS amplificada

As endonucleases de restrição cortam o ADN em sítios específicos, resultando em fragmentos de diferentes tamanhos que podem ser separados e visualizados por eletroforese. Se obtém, assim, um padrão diferente de bandas segundo a seqüência de bases do ADN, permitindo, em geral, distinguir entre diferentes espécies.

A digestão é realizada com pelo menos duas enzimas para confirmar a diferença entre duas amostras. A escolha das enzimas está baseada, em geral, na capacidade destas de diferenciar entre as amostras (o que depende do sítio de corte) e das temperaturas em que atuam. Enzimas que digerem na mesma temperatura facilitam a manipulação. As enzimas de restrição mais amplamente utilizadas para a restrição de ADN de fungos ectomicorrízicos são *Mbo* I, *Hinf* I, *Cfo* I, *Alu* I, *Rsa* I (Gardes e Bruns, 1993; Egger, 1995). Baseado

nos resultados obtidos por Kårén, et al, (1997), e devido ao fato de as enzimas *CfoI* e *MboI* produzirem polimorfismos similares na restrição de ADN de fungos micorrízicos, foi recomendado o uso de *MboI*, *HinfI* e *TaqI* para o presente trabalho (O. Kårén, com. pers.)

Antes da restrição, o produto de 200 μL de amplificação do ADN foi precipitado e ressuspendido em água. Aos 200 μL de produto de PCR foi adicionado 1 volume de PEG/NaCl (20 % polietileno glicol, 2,5M NaCl) e incubado a 37°C por 15 minutos. Após 5 min de centrifugação, a solução foi removida e o *pellet* lavado com etanol 80% (-20°C) e centrifugado novamente por mais 3 min. Uma vez eliminado o etanol, deixou-se secar o *pellet* durante cerca de 2 h e ressuspendeu-se em 50 μL água. Dez μL dessa suspensão foram utilizados para a reação de restrição. Também foi realizada restrição com as amostras não purificadas, diretamente sobre o produto da amplificação.

Para a restrição, foram utilizadas 2 unidades das enzimas *MboI*, com sítio de corte: 5'- \downarrow GATC-3' ,3'-CTAG \uparrow - 5'; *HinfI*: 5'-G \downarrow ANT C-3', 3'-C TNA \uparrow G-5' e *TaqI*: 5'-T \downarrow CGA-3', 3'AGC \uparrow T- 5'. Para *Mbo I* e *Hinf I*, a reação foi realizada a 37°C durante 3 h, enquanto que para *Taq I* a temperatura foi de 65°C também por 3 h. Todas as enzimas utilizadas foram GIBCO BRL® e o tampão utilizado foi aquele recomendado pelo provedor, (REACT®2 Buffer (50mM Tris/HCl (pH 8), 10mM MgCl₂, 50mM NaCl)

A restrição foi realizada num volume total de 20 μL (SAMBROOK et al., 1989):

Água:	6 μL
Tampão:	2 μL (concentração final:1x)
Amostra:	10 μL
Enzima (em 1x) :	2 μL

Os produtos da reação de restrição foram evidenciados em gel de agarose 3%, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de brometo de etídio, tampão de corrida TBE 0,5x (0,045M Tris Borato, 0,001M EDTA, pH8). Para isso, o volume total da amostra (20 μL) foi misturado a 2 μL de tampão de carga e a eletroforese foi realizada sob 3V/cm durante cerca de 3-4

h. O marcador de peso molecular utilizado foi 123 bp ADN Ladder (GIBCO BRL) ou pGEM[®] (PROMEGA), 1 μ L por poço diluído em REACT[®]2 Buffer 1x (1 μ g/ μ L, 1 μ g). O gel foi fotografado em sistema de câmara polaroid sobre transiluminador UV ($\lambda = 312\text{nm}$).

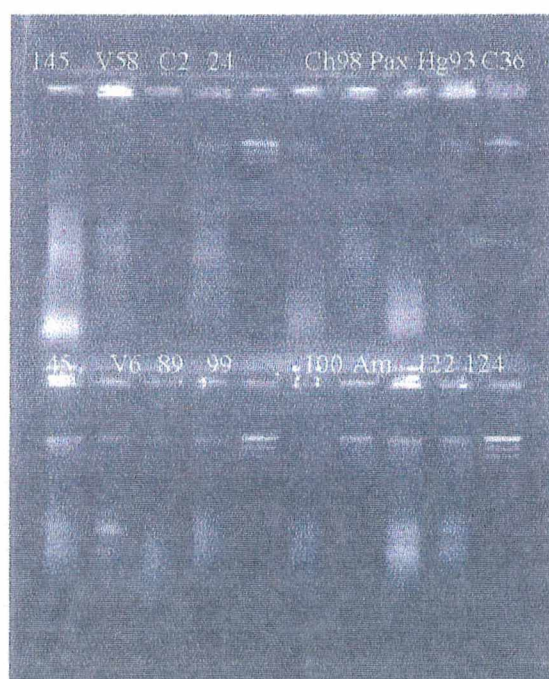
3.2. Resultados e Discussão

3.2.1 Extração de ADN

3.2.1.1. Extração de ADN de micélio de culturas puras de fungos micorrízicos e de *E. grandis*.

Dos fungos testados, foi obtida a extração de ADN do micélio dos isolados: C36, C2, Pt145, Pt24, 45, 89, 99, 100, 122, 124, Am 161 Na **figura 2** são apresentados os resultados da eletroforese em gel de agarose dos ADNs obtidos desses isolados.

A segunda linha, da parte superior (amostra V58) e a segunda linha da parte inferior (amostra V6) correspondem às amostras de ADN de eucaliptos.



Fila superior

- Linha 1: 145, *Pisolithus* sp
- Linha 2: V58, *E. grandis*
- Linha 3: C2, *Cenococcum geophilum*
- Linha 4: 24, *Pisolithus* sp
- Marcador de peso molecular 123bpLadder
- Linha 6: Ch98, *Chondrogaster angosiporus*
- Linha 7: Pax, *Paxillus involutus*
- Linha 8: Hg93, *Hysterangium gardneri*
- Linha 9: C36, *Cenococcum geophilum*
- Marcador de peso molecular 123bpLadder

Fila Inferior

- Linha 1: 45, *Pisolithus* sp
- Linha 2: V6, *E. grandis*
- Linha 3: 89, *Pisolithus* sp
- Linha 4: 99, *Pisolithus* sp
- Marcador de peso molecular 123bpLadder
- Linha 6: 100, *Pisolithus* sp
- Linha 7: Am, *Amanita muscaria*
- Linha 8: 122, *Scleroderma citrinum*
- Linha 9: 124, *Scleroderma citrinum*
- Marcador de peso molecular 123bpLadder

Figura 2. Aspecto do ADN obtido de diferentes isolados fúngicos ectomicorrízicos e de *E. grandis*.

3.2.1.2. Extração de ADN de micorrizas *in vitro*

O sistema para micorrização *in vitro* (**Figura 3**) permitiu o acompanhamento da formação da micorrizas ou de contaminações sem necessidade de alterar o dispositivo experimental

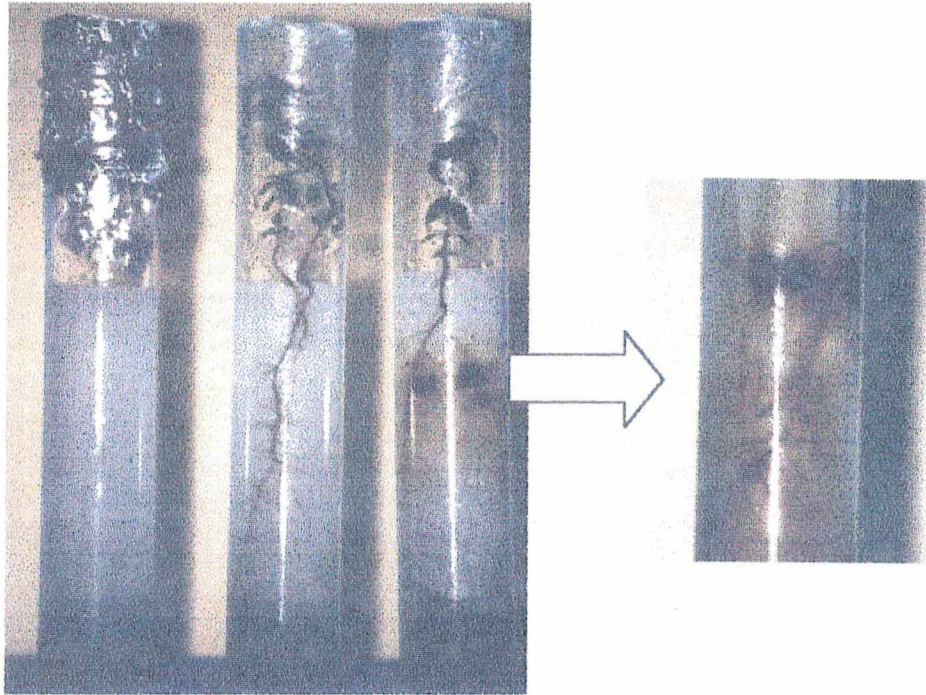


Figura 3. Sistema de síntese micorrízica *in vitro* entre isolados fúngicos ectomicorrízicos e plântulas de *E. grandis*.

Após 60 dias em câmara de crescimento, a colonização micorrízica foi especialmente efetiva no caso dos isolados de *Pisolithus*, isolados 24, 45, 89, 99, 100, 145. Os isolados de *Cenococcum* (C2 e C36) formaram poucas micorrizas assim como o isolado de *Paxillus* (Pax4). Os demais isolados não formaram micorrizas nas condições testadas. Na **figura 4** pode-se observar o aspecto das raízes de *E. grandis* não colonizadas assim como o de micorrizas formadas por diferentes isolados.

A inoculação realizada previamente à semeadura mostrou-se mais efetiva, já que permitiu a colonização do substrato pelo fungo antes da introdução da planta.



Raízes não colonizadas de *Eucalyptus grandis* (Aumento 36X)



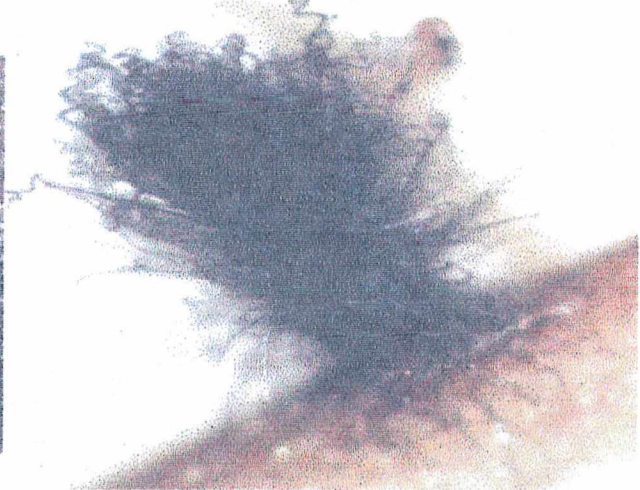
Micorriza de *Pisolithus* sp.
(isolado 24, 70X)



Micorriza de *Pisolithus* sp.
(isolado 100, 64X)



Micorriza de *Cenococcum geophilum*
(C2, 45X)



Micorriza de *Cenococcum geophilum*
(C36, 88X)

Figura 4. Aspecto de raízes e micorrizas de *Eucalyptus grandis* formadas por alguns dos isolados fúngicos testados.

Como a quantidade de ADN extraída neste caso não foi suficiente para ser visualizada sob eletroforese, a presença do ADN só foi confirmada após posterior amplificação.

3.2.1.3. Extração de ADN de micorrizas obtidas de plantas em viveiro e transplantadas para solos.

Como no caso das micorrizas sintetizadas *in vitro*, não foi possível visualizar sob eletroforese em gel de agarose o resultado da extração.

3.2.2. Amplificação da região ITS dos fungos micorrízicos

3.2.2.1. Amplificação do ADNr de micélio de culturas puras de fungos micorrízicos e de micorrizas obtidas *in vitro*.

Os iniciadores amplificaram seletivamente o ADNr fúngico das culturas puras e das micorrizas sintetizadas *in vitro*. Para a amplificação das amostras de ADN de micélio, foi necessário diluir a amostra 1/100 e as de micorrizas em 1/10. O ADN da planta não foi amplificado em qualquer das diluições testadas.

Para a amplificação de micorrizas, foram sempre incluídas duas testemunhas na mesma reação, uma amostra de ADN fúngico obtida de micélio de cultura pura, e uma de ADN vegetal como testemunha negativa.

Na *figura 5* pode-se observar o resultado da corrida eletroforética das amostras após amplificação. A primeira linha corresponde ao ADN da planta, onde não se observa a presença de

banda, indicando a capacidade dos iniciadores de distinguir entre o ADN fúngico e o ADN vegetal. A segunda linha pertence à amostra de *Cenococcum geophilum* (C2), e as seis seguintes a diferentes basidiomicetos (145, Pax4 e 24) e suas respectivas micorrizas (M145, Mpax, M24).

Pode-se observar que o produto de amplificação de *Cenococcum geophilum*, ascomiceto, é uma banda de aproximadamente 1500 pb enquanto que as dos basidiomicetos e de suas micorrizas resultaram em bandas de aproximadamente 1000 pb. Essas diferenças se repetiram sempre em referência a asco e basidiomicetos, sendo de utilidade quando se amplifica uma micorriza sem conhecer o simbionte fúngico já que dá uma aproximação do tipo do fungo que está presente na associação.

O fato de as temperaturas de pareamento terem sido tão elevadas (69 - 68 °C) é devido, principalmente, ao funcionamento do termociclador. As temperaturas recomendadas para a amplificação com esses pares de iniciadores foram de 67 °C para o primeiro par e 57 °C para o segundo (Kendall Martin, com. pers.). Para a mesma reação realizada num termociclador MJ Research (PTC-100) as temperaturas recomendadas foram adequadas.

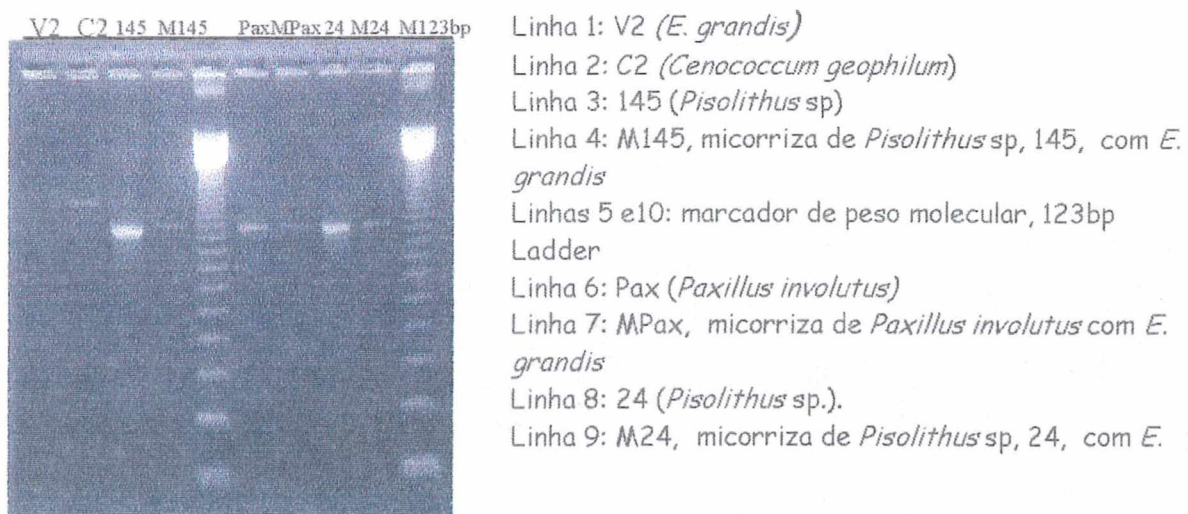


Figura 5. Visualização do ADN da região ITS de diferentes fungos e suas micorrizas após amplificação (PCR) com os iniciadores NSA3/NLC2 e eletroforese em gel de agarose.

3.2.2.2. Amplificação do ADN de micorrizas de *E. grandis* obtidas em viveiros.

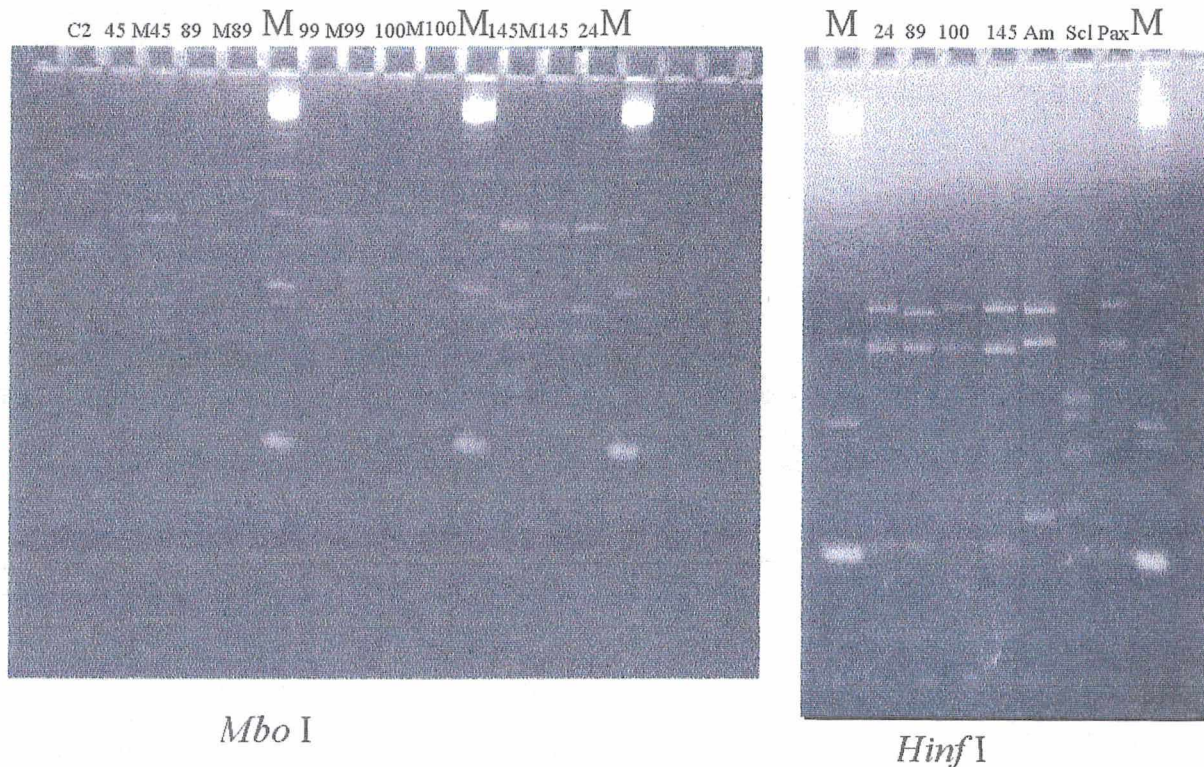
Nesta etapa, não foi possível a amplificação do ADN fúngico das micorrizas de plantas de viveiro. Provavelmente a quantidade de ADN foi muito pequena para as condições nas quais os iniciadores NSA3/NLC2 funcionam. Para contornar esse problema, foram experimentadas diferentes variantes sobre o processo como diluição da amostra, amplificação e re-amplificação, purificação do ADN extraído com o sistema CONCERT™ (produto GIBCO®), sem sucesso. Também foi experimentado um protocolo diferente de extração de ADN (Di Batista et al, 1999, cf. item 4.1.2.) e a purificação do ADN obtido por esse procedimento. Com nenhuma das variantes testadas foi possível lograr a amplificação do ADN fúngico das amostras de micorrizas de viveiro.

Todas as reações de amplificação realizadas incluíram a testemunha negativa (o ADN da planta, neste caso *E. grandis*) e a testemunha positiva (ADN de fungos micorrízicos). Quando o ADN desses fungos, utilizados como controle positivo, foi adicionado junto às amostras para descartar a possibilidade de interferências na reação, houve amplificação, comprovando-se que o problema estava no ADN alvo. Por esse motivo, novos procedimentos tiveram que ser testados. Tais procedimentos serão descritos no item 4, mais adiante.

3.3. Restrição da região ITS amplificada de ADN de fungos e suas micorrizas obtidas *in vitro*.

As enzimas *Mbo* I e *Hinf* I foram efetivas na restrição dos fragmentos amplificados, rendendo entre 2 a 5 fragmentos que

permitem diferenciar entre os fungos das culturas puras e das micorrizas (**Figura 6**). A digestão com *Taq* I resultou num número muito grande de fragmentos o que torna difícil a interpretação. Na **figura 7**, apresenta-se uma esquematização do resultado da restrição com a enzima *Mbo* I. O esquema permite apreciar claramente as diferenças nos polimorfismos.



- Linha 2: : C2 (*Cenococcum geophilum*)
- Linha 3: 45 (*Pisolithus* sp)
- Linha 4: M45, micorriza de *Pisolithus* sp, 45, com *E. grandis*
- Linha 5: 89 (*Pisolithus* sp)
- Linhas 6: M89, micorriza de *Pisolithus* sp, 89, com *E. grandis*
- Linha 7, 12 e 16: marcador de peso molecular, 123bp Ladder
- Linha 8: 99 (*Pisolithus* sp)
- Linha 9: M99, micorriza de *Pisolithus* sp, 99, com *E. grandis*
- Linha 10: 100 (*Pisolithus* sp)
- Linha 11: M100, micorriza de *Pisolithus* sp, 100, com *E.*
- Linha 13: 145 (*Pisolithus* sp)
- Linha 14: M145, micorriza de *Pisolithus* sp, 145, com *E. grandis*
- Linha 15: 24 (*Pisolithus* sp.).

Figura 6. Visualização dos produtos da restrição do ADNr de diferentes amostras de fungos ectomicorrízicos e micorrizas por duas enzimas, *Mbo*I (a) e *Hinf* I(b) após amplificação com os iniciadores NSA3/NLC2 seguido de amplificação com ITS1F/NLB3.

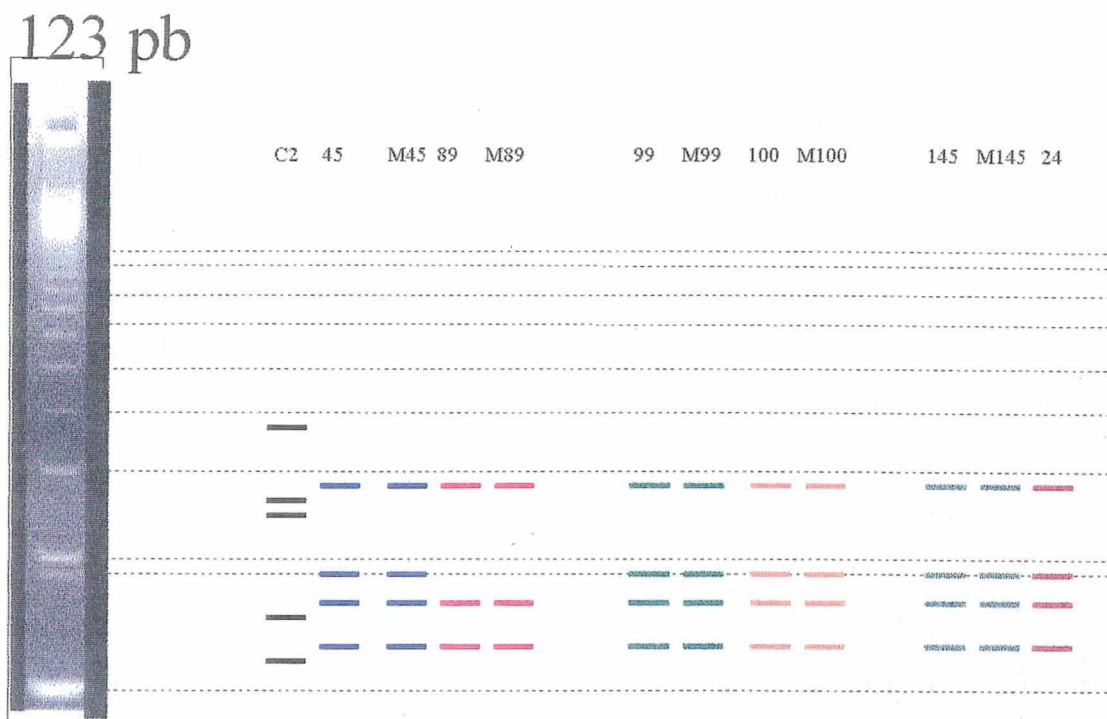


Figura 7. Representação esquemática do gel da figura 6, apresentado os resultados da digestão com a enzima *MboI* dos produtos de amplificação com os iniciadores NLC2/NSA3 seguido de ITS1F/NLB3.

A restrição de amostras sem purificar não apresentou problemas e simplificou muito o procedimento já que se evita o passo de precipitação e ressuspensão onde é possível a perda de ADN da amostra.

A metodologia de amplificação da região ITS seguida de restrição do produto, permitiu caracterizar as diferentes espécies fúngicas nas culturas puras e agrupar fungos, da mesma espécie independentemente da origem do isolado como foi o caso para os diferentes isolados de *Pisolithus* sp. A metodologia também permitiu caracterizar o fungo quando em simbiose com *E. grandis* obtendo-se o mesmo padrão de restrição do ADN do fungo na micorriza que o fungo utilizado para a inoculação em cada caso, demonstrando assim, ausência de influencia do hospedeiro.

No quadro 2 se apresenta um resumo dos resultados obtidos com os diferentes isolados fúngicos utilizados durante os procedimento de extração de ADN e amplificação e restrição.

Quadro 2. Resultados das diferentes etapas da metodologia em relação aos isolados: extração de ADN, amplificação com NSA3/NLC2 e ITS1F1/NLB3 (PCR) e restrição com *Mbo* I e *Hinf* I (RFLP).

Isolado	Fungo	Extração de ADN	PCR	RFLP
C36	<i>Cenococcum geophilum</i> Fr	+	-	-
C2	<i>Cenococcum geophilum</i> Fr	+	+	+
145	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	+	+	+
24	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	+	+	+
45	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	+	+	+
46	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	-	-	-
89	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	+	+	+
99	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	+	+	+
100	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	+	+	+
65	<i>Scleroderma</i> sp. (Persoon) Fries	-	-	-
122	<i>Scleroderma citrinum</i> Pers	+	-	-
123	<i>Scleroderma citrinum</i> Pers	-	-	-
124	<i>Scleroderma citrinum</i> Pers	+	-	-
Am 161	<i>Amanita muscaria</i> (L. ex. Fr.) Pers. ex. Hooker	+	+	+
Ch 98	<i>Chondrogaster angustiporus</i> Castellano, Trappe, Giachini & Claridge	+	+	+
Pax4	<i>Paxillus involutus</i> (Batsch) Fr	+		
Hg 93	<i>Hysterangium gardneri</i> Fischer	+	-	-
Ch 163	<i>Chondrogaster angustiporus</i> Castellano, Trappe, Giachini & Claridge	-	-	-

No quadro 3 são apresentados os isolados fúngicos que colonizaram as raízes de *E. grandis* e os resultados dos diferentes procedimentos da metodologia PCR/RFLP aplicada a esses fungos em simbiose.

Quadro 3. Resultados das diferentes etapas da metodologia aplicada a amostras de micorrizas de *E. grandis* obtidas *in vitro* com diferentes fungos.

Isolado	Fungo	Extração de ADN	PCR	RFLP
C2	<i>Cenococcum geophilum</i> Fr	-	-	-
24	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	+	+	-
45	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	+	+	+
89	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	+	+	+
99	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	+	+	+
100	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	+	+	+
145	<i>Pisolithus</i> sp. Alb & Schwein	+	+	+
Pax4	<i>Paxillus involutus</i> (Batsch) Fr	+	+	-

Dos dados apresentados nos quadros 2 e 3, pode-se concluir que a eficiência de amplificação para os fungos em cultura pura foi de 64% (considerando os 14 isolados dos quais foi extraído ADN). Para os fungos nas micorrizas a eficiência foi de 87%. Esses valores estariam dentro dos valores citados por outros autores em estudos que aplicam metodologias similares em micorrizas de coníferas. Para micorrizas de *Pinus sylvestris*, Jonsson et al. (1999) obtiveram uma amplificação de 67% com os iniciadores universais ITS1/ITS4. Enquanto que Kårén et al. (1996), utilizando os mesmos iniciadores, obtiveram uma amplificação de 90% para micorrizas de *Picea abies*.

Deve-se notar que os dados encontrados literatura referem-se a micorrizas de coníferas que geralmente apresentam maior abundância de micélio e que foram utilizados iniciadores universais (que também podem amplificar o ADN da planta). No presente

trabalho, os iniciadores empregados requereram condições mais exigentes (temperaturas de pareamento maiores, diferentes concentrações dos reagentes), indicando que a eficiência obtida na amplificação pode ser considerada adequada.

4. Caracterização de fungos ectomicorrízicos em micorrizas de *E. grandis* obtidas em viveiros por PCR/RFLP

4.1. Material e Métodos

4.1.1. Morfotipagem e separação de micorrizas de plantas de *E. grandis* obtidas em viveiros.

Esta etapa visou aplicar a metodologia ajustada no item 3, na avaliação da diversidade de fungos ectomicorrízicos em simbiose com *E. grandis* em viveiros comerciais e solos no Uruguai. Para isso, foram escolhidos dois viveiros com base nos resultados obtidos por Malvárez et al. (1997) (cf. 2.3). O nível de colonização ectomicorrízica, observado por esses autores foi utilizado como critério para a seleção dos viveiros. Os viveiros com a maior e a menor porcentagem de colonização foram inicialmente selecionados. Entretanto, como o viveiro com a maior porcentagem de colonização (46,7%) tinha modificado seu sistema de produção, e considerando que tal parâmetro está diretamente relacionado com o nível de colonização micorrízica (Malvárez et al., 1997), selecionou-se o viveiro com a segunda maior porcentagem de colonização (39,9%), que continua empregando o mesmo sistema de produção.

No quadro 4 apresenta-se um resumo dos sistemas de produção dos viveiros e o nível de colonização ectomicorrízica das plantas nos dois diferentes viveiros segundo Malvárez et al. (1997).

Quadro 4. Características dos viveiros selecionados, indicando a localização, sistema de produção de plântulas e a porcentagem de colonização ectomicorrízica no momento do transplante (Malvárez et al., 1997).

Viveiro	Localização	Sistema de produção	% de colonização
Soust	Durazno	Bandejas de spumaplast 50 cm ³ de substrato/ planta. Substrato: comercial não desinfetado	15.1
S XVIII	Montevideú	Sacos plásticos de 234 cm ³ Substrato: 1/3 serragem compostada, 1/3 areia e 1/3 solo	39.9

Quarenta e cinco plantas prontas a ser transplantadas, foram retiradas de cada um dos viveiros. Trinta das plantas foram levadas ao viveiro do Departamento Forestal (Facultad de Agronomía) e transplantadas em dois solos. Um deles era procedente de uma plantação de *Eucalyptus* sp., datando do início do século localizada no Parque Nacional Roosevelt, Canelones, Uruguai (solo I). O outro era um solo degradado sem antecedentes de plantações de *Eucalyptus* spp. e sem plantações nas proximidades (solo de chácara, localizada em Canelones, Uruguai (solo II).

O restante das plantas foi levado ao laboratório onde as raízes foram cuidadosamente lavadas e examinadas sob lupa (15X). De cada sistema radicular foram preparados 18 tubos com um número variável de micorrizas/tubo, dependendo das características morfológicas das mesmas (morfofitipagem).

Micorrizas de aparência similar (forma, cor, presença de micélio, ramificação) e que estivessem sobre a mesma raiz foram colocadas num mesmo tubo. Desses 18 tubos por planta, 12 foram utilizados para extração de ADN (metodologia já descrita, item 3.2.) e os restantes conservados a -20 °C. As micorrizas dos 5 primeiros tubos utilizados para a extração foram fotografadas.

Amostras dos solos foram analisadas pelo Departamento de Fertilidade da Facultad de Agronomía, especialmente das diferentes

frações de fósforo e porcentagem de matéria orgânica. No quadro 5 apresentam-se os resultados da análise química dos solos.

Quadro 5. Características químicas dos dois solos utilizados para o transplante das mudas de *E. grandis*.

	% MO	pH	P (Bray)	P orgânico	P total
Solo I	6,94	4,5	2 ppm	319 ppm	434 ppm
Solo II	3,55	5	0,5 ppm	138 ppm	164 ppm

Apesar de se tratar de um solo arenoso, o solo I apresentava alta porcentagem de matéria orgânica e fósforo orgânico. Isso é devido à grande acumulação de serrapilheira nas camadas superficiais do solo.

As plantas foram mantidas no viveiro do Departamento Forestal da Facultad de Agronomía (Montevideu), durante o período de julho a dezembro-janeiro (6 meses). Durante esse período, as plantas foram mantidas em condições ambientais (ao descoberto), sendo regadas só nos meses de dezembro-janeiro devido às altas temperaturas e à falta de chuvas nesses meses. Posteriormente, foram submetidas ao mesmo procedimento de separação de micorrizas que as demais plantas.

4.1.2. Extração de ADN

Devido a ausência de resultados positivos na amplificação do ADN de fungos das micorrizas de plantas de viveiro e transplantadas (cf. item 3.2.2.2), foram experimentadas diferentes variantes sobre a metodologia de extração e purificação do ADN. Dentro das variantes testadas, foi implementado outro protocolo de extração de ADN de acordo com o procedimento descrito por Di Battista et al., (1999), para a extração de ADN a partir de uma única micorriza de *Tuber melanosporum*.

O procedimento de extração consistiu na maceração das micorrizas, em 100 μL de TNE (0,2% β ME). Após a maceração, foram adicionados 400 μL de tampão de lise (2xCTAB : 2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM NaEDTA, pH 8; 100mM Tris HCl, pH 9) e as amostras foram incubadas a 65°C durante 30 min a 13000 $\times g$. A desproteíntização foi realizada adicionando-se um volume (ca. de 500 μL) de fenol-clorofórmio-isoamil álcool e centrifugando-se durante 15 minutos também a 13000 $\times g$.

Aproximadamente 2/3 da fase aquosa foram transferidos para um novo tubo, recebendo 300 μL de clorofórmio (4% isoamil álcool), e foram centrifugados a 13000 $\times g$ por 5 min. Novamente, foi retirada a fase aquosa para um novo tubo à qual foram adicionados 20 μL de NaOAc 3M e 1 volume de isopropanol (-20°C). Os tubos foram agitados lentamente por inversão e mantidos a -20 °C por 30 minutos para a precipitação do ADN da solução. Posteriormente, foram centrifugados a 13000 $\times g$ por 30 min.

Após a centrifugação, foi descartada a solução e o *pellet* resultante (não visível para o caso das micorrizas) foi lavado com 100 μL de álcool 80% a -20°C. Após rápida centrifugação, o álcool foi descartado. Deixou-se o *pellet* secar durante a noite e ressuspendeu-se em 50 μL de TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8).

Para a purificação dos extratos obtidos pelos dois procedimentos de extração, foi utilizado o sistema CONCERT™ (GIBCO®). Os extratos foram carregados na coluna com membrana de sílica e centrifugados a 12000 $\times g$ por 1 min para a adsorção seletiva do ADN. O líquido filtrado foi descartado e a coluna lavada com 700 μL de tampão (NaCl, EDTA, Tris-HCl, formulação da GIBCO) e centrifugado a 12000 $\times g$ por mais 1 min (12000 $\times g$). Para eluir o ADN da coluna, foram utilizados 75 μL de TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) a 65 °C, seguido de incubação a temperatura ambiente por 1 min e centrifugado durante 2 min.

4.1.3. Amplificação da região ITS com os iniciadores ITS1F/NL6Bmun e ITS1F/NL6Amun

A amplificação do ADN das micorrizas de viveiro com os iniciadores NSA3/NLC2 e ITS1F/NLB3 (cf. 3.2.2.2), não resultou na obtenção de produtos detectáveis, mesmo com o novo protocolo de extração de ADN e a purificação do extrato. Por esse motivo, foram testados outros iniciadores para a amplificação da região ITS de micorrizas de amostras de viveiros e solos.

Os iniciadores utilizados foram **NLB6mun** (5'- CAA CGC TTT CCC TTT CAA CA -3') e **NLAmun** (5'-CAA GTG CTT CCC TTT CAA CA-3') (Egger, 1995) em combinação com o iniciador **ITS1F** (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A -3') (Gardes e Bruns, 1993). Esses iniciadores amplificam seletivamente o ADN da região ITS de fungos basídio (ITS1F/NL6Bmun) e ascomicetos (ITS1F/NL6Amun).

O procedimento seguido para a amplificação foi similar ao utilizado com os iniciadores anteriores (cf. item 3.3.). As concentrações finais dos reagentes da reação foram: 1x de tampão, 0,2 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 μM de cada um dos iniciadores, 5 mg/mL de BSA, 1U Taq polimerase. Também foi utilizado a *Hot Start PCR*. (cf. item 3.3.).

A temperatura de pareamento foi de 64°C por 10 ciclos e de 62°C por outros 25 para completar um total de 35 ciclos para o par ITS1F/NL6Bmun (95°C - 12 segundos, 93°C - 20 segundos, 64 ou 62°C - 45 segundos, 72°C- 30 segundos). No final, a reação foi submetida a uma etapa de extensão a 72°C por 5 min.

Para o par ITS1F/NL6Amun, a temperatura de pareamento foi de 59 °C para os primeiros 10 ciclos e de 57 °C nos 25 ciclos seguintes para completar um total de 35 ciclos (95°C - 12 segundos, 93°C - 20 segundos, 57 ou 59 °C - 45 segundos, 72°C- 30 segundos). No final dessa etapa, o material foi submetido a uma extensão a 72°C por 5 minutos.

As amostras foram primeiramente submetidas a amplificação com o par ITS1F/NL6Amun. Aquelas que não amplificaram com esse

par foram, então, submetidas a amplificação com o par ITS1F/NL6Bmun.

Para verificar o resultado da amplificação, os produtos da reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%, 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídio, com tampão de corrida TBE 0,5x (0,45M Tris Borato, 0,01M EDTA, pH8). O marcador de peso molecular utilizado foi pGEM[®] (PROMEGA), também 1 μL por poço de solução 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em 9 μL TE (total de 1 μg por linha). Carregaram-se 10 μL de amostra com 2 μL de tampão de carga e se correu a 5V/cm aproximadamente 1 h e fotografou-se com sistema de câmera polaroid sobre transiluminador UV ($\lambda = 312 \text{ nm}$).

4.1.4. Restrição da região ITS amplificada

A restrição dos produtos de amplificação das micorrizas de viveiros e solos foi realizada em condições similares às indicadas no item 3.4. Foram usadas as enzimas de restrição *Mbo*I e *Hinf*I sobre 10 μL de produto de amplificação sem purificar.

4.2. Resultados e Discussão

4.2.1. Tipos micorrízicos observados em *E. grandis* antes e após transplântio

As plantas dos dois viveiros não apresentaram diferenças importantes quanto à intensidade de colonização micorrízica. Em ambos os casos havia abundante colonização. Porém, a diversidade dos tipos micorrízicos presentes foi reduzida quando comparada a observações de outros autores em espécies do mesmo gênero (Oliveira et al., 1999)

Nas plantas provenientes do viveiro Soust, foi possível detectar a ocorrência de dois morfotipos. O mais abundante deles representado por micorrizas pretas, não ramificadas com micélio extrarradicular bem desenvolvido (**morfotipo A, Figura 8**). Esse morfotipo é muito semelhante ao tipo I, formado por *Cenococcum geophilum*, descrito por Chilvers (1968).

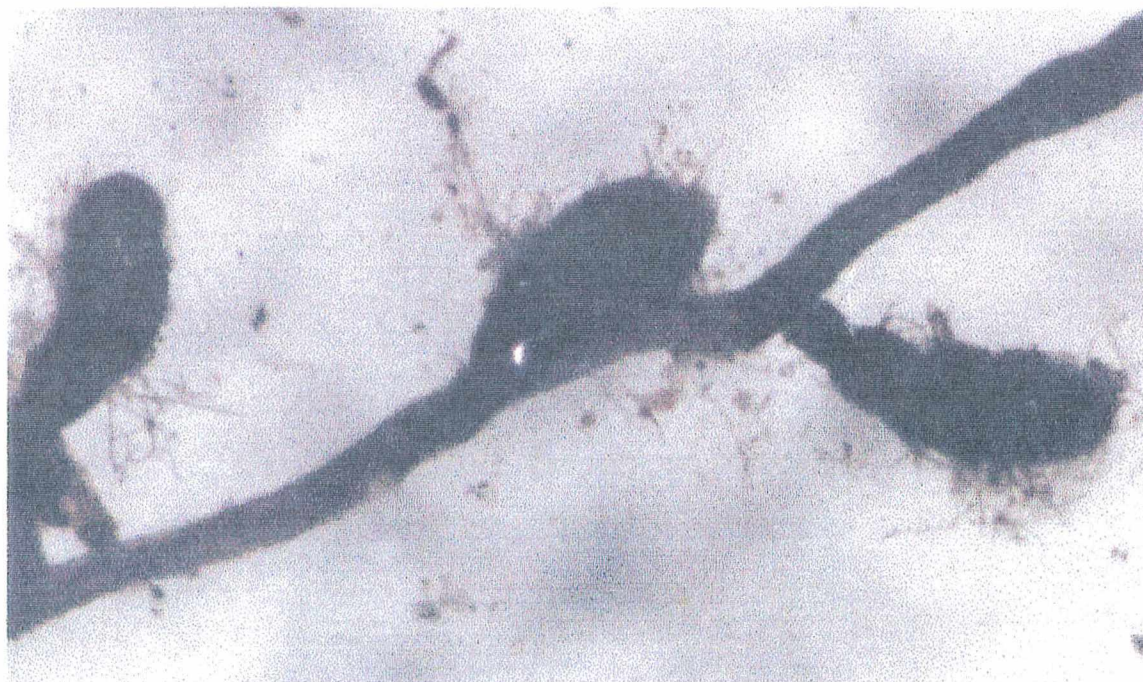


Figura 8. Aspecto das micorrizas do morfotipo A no viveiro Soust (170X).

O segundo morfotipo encontrado nesse viveiro era representado por micorrizas mais claras, não ramificadas, com micélio extrarradical menos abundante (**morfotipo B, figura 9**).



Figura 9. Aspecto das micorrizas do morfotipo B obtidas no viveiro Soust. (160X)

Nas plantas oriundas do viveiro Siglo XVIII só foi observado um morfotipo. Tratava-se de micorrizas escuras, não ramificadas, com pouco micélio extrarradical (**Figura 10**), muito semelhantes ao morfotipo B encontrado nas plantas do viveiro anterior.

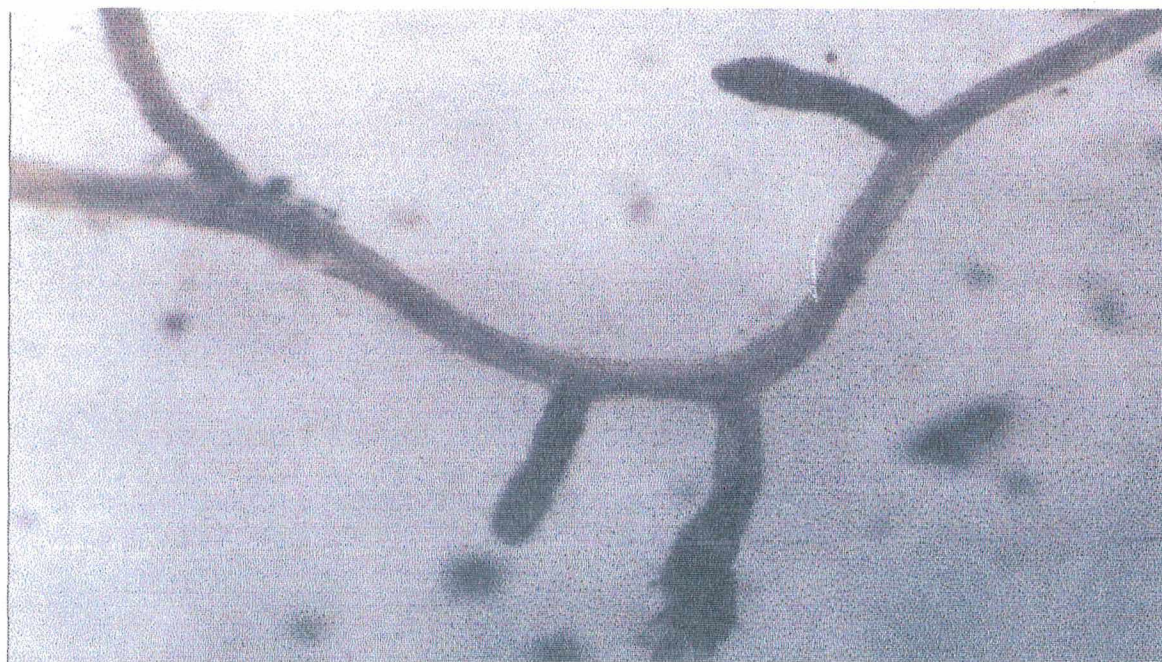


Figura 10. Aspecto das micorrizas encontradas nas amostras do Viveiro II (Siglo XVIII) (160X)

Após transferência das plantas para os dois solos e permanência de seis meses em condições semelhantes de viveiro foram observadas diferenças importantes na intensidade de colonização em função do tipo de solo, independentemente da origem das plantas.

As plantas transferidas para o solo I, com antecedentes de plantações de eucalipto, observou-se uma grande intensidade de colonização ectomicorrízica (49% para as plantas procedentes do viveiro I e 63% para as do Viveiro II). A morfologia das micorrizas ficou, porém, limitada à do morfotipo A, descrito anteriormente nas plantas do viveiro (**figura 11**) antes do transplântio.

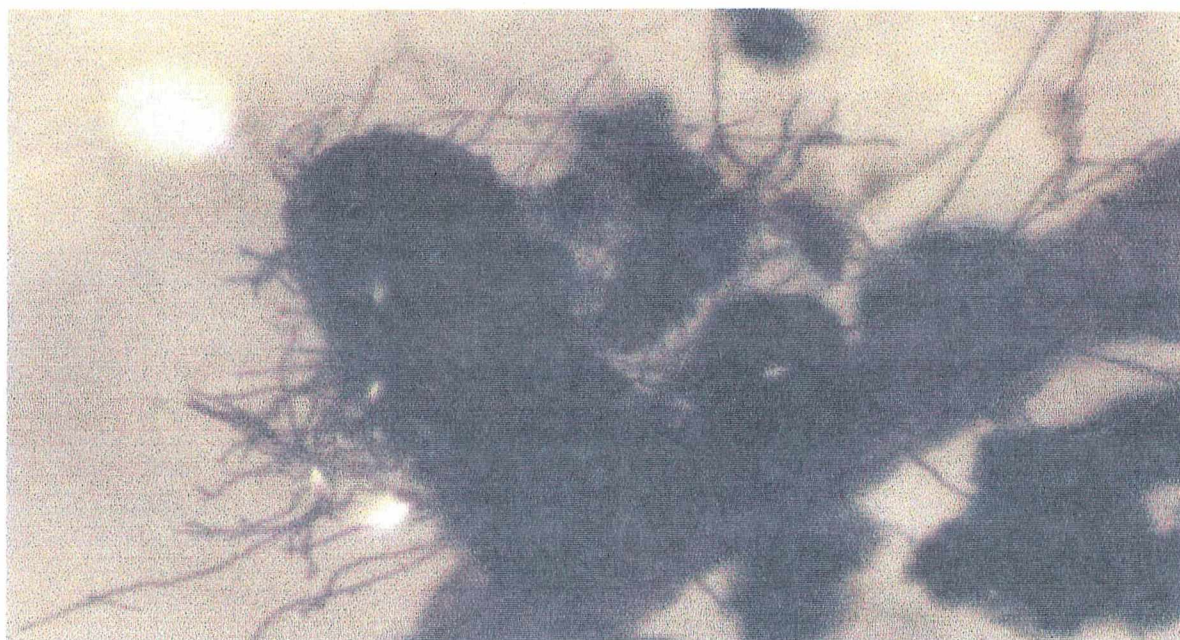


Figura 11. Aspecto das micorrizas observadas nas plantas do Viveiro Soust transferidas ao solo do Parque Roosevelt (solo I) (450X).

Já as plantas transferidas para o solo II, sem antecedentes de plantações de eucalipto, apresentaram uma baixa intensidade de colonização (<10%). Além disso, todas as micorrizas observadas apresentavam-se similares ao morfotipo B descrito anteriormente.

4.2.2. Extração de ADN

Como a quantidade de ADN extraído das micorrizas não foi suficiente para ser visualizada em corrida de eletroforese, a presença do ADN só foi confirmado após a amplificação.

4.2.3. Amplificação da região ITS

O par de iniciadores ITS1F/NL6A_{mun} foi efetivo na amplificação de várias das amostras, não tendo sido observada amplificação de ADN vegetal. O produto da amplificação foi de aproximadamente 1000 pb, que é o tamanho esperado para esses iniciadores (Egger, 1995). As amostras que não amplificaram com o par ITS1F/NL6A_{mun} foram submetidas a amplificação com o par ITS1F/NL6B_{mun}, mas não houve em nenhum caso amplificação, sugerindo que o insucesso amplificação com o primeiro par deve ter sido provocado por problemas na quantidade ou na qualidade do ADN da amostra.

4.2.4. Restrição da região ITS

Na restrição da região ITS amplificada com os iniciadores ITS1F/NL6A_{mun}, as enzimas *Mbo* I e *Hinf* I produziram um número variável de fragmentos (2 a 5). Em alguns casos, algumas das amostras resultaram em digestões incompletas, com um total de pares de bases maior que o do fragmento original. Nos quadros 6, 7 e 8 são apresentados os resultados das restrições com as duas enzimas para as micorrizas obtidas de plantas de viveiros e de

plantas desses mesmos viveiros transplantadas para dois solos diferentes. Na **figura 12** é apresentado um esquema dos padrões de polimorfismos obtidos no caso de micorrizas do Viveiro Soust com as duas enzimas.

Quadro 6. Número de pares de bases dos produtos de restrição da região ITS amplificada com ITS1F/NL6Amun, pelas enzimas *Mbo* I e *Hinf* I para as micorrizas de *E. grandis* obtidas em dois viveiros.

Enzima	Número de pares de bases (pb) por banda	
	Viveiro Soust (I)	Viveiro Siglo XVIII (II)
<i>Mbo</i> I	1) 350 - 313 (63%) ² 2) 640 - 350 - 313 3) 350 - 313 - 183	1) 350 - 313 (78%)
<i>Hinf</i> I	1) 474 - 183 (50%) 2) 474 - 183 - 171 3) 474 - 328 - 123	1) 760 - 460 (56%) 2) 760 - 517 - 460

² Entre parêntese é indicado a porcentagem do padrão mais freqüente.

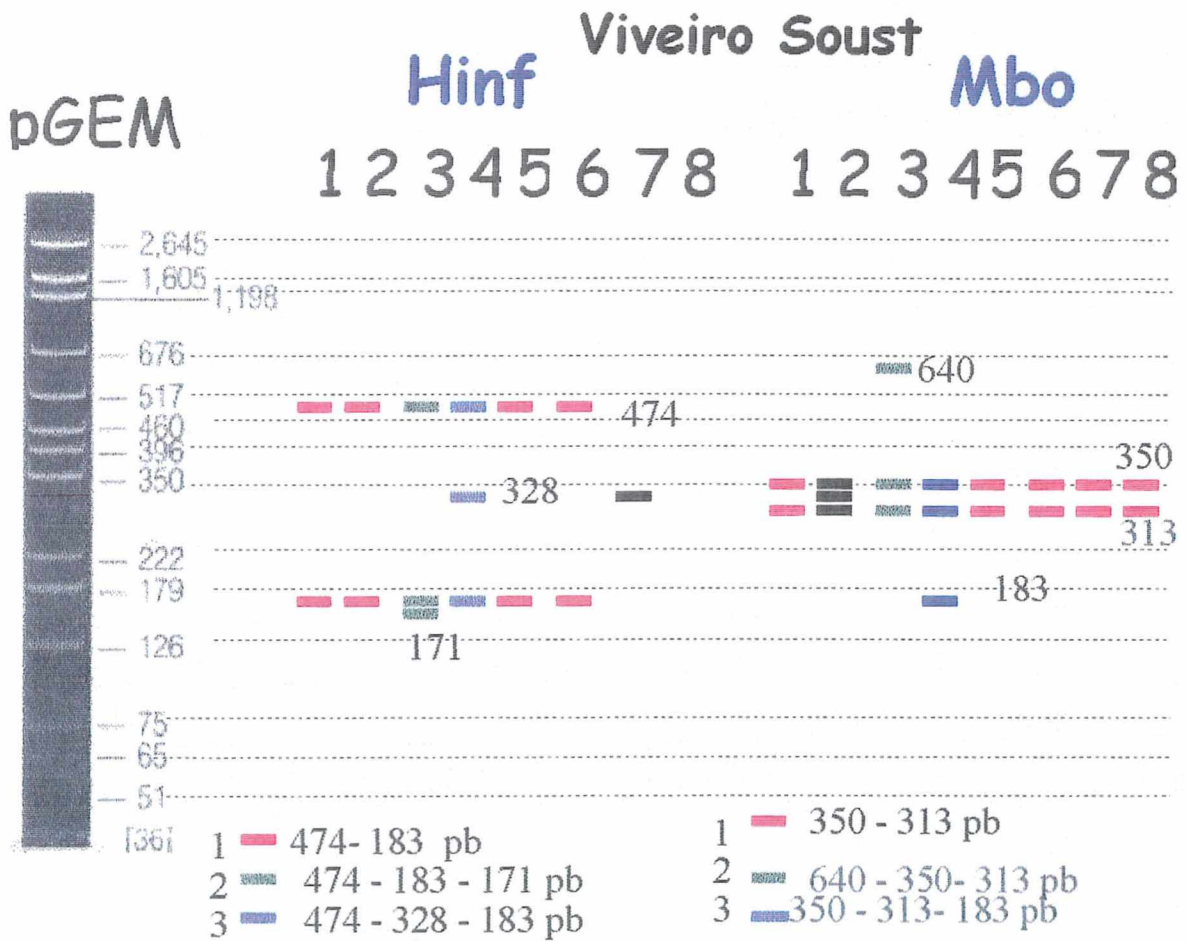


Figura 12. Representação esquemática dos produtos da região ITS amplificada com ITS1F/NL6Amun, pelas enzimas *Hinf*I e *Mbo* I do ADN fúngico para 8 amostras de micorrizas do Viveiro Soust. As bandas em cores indicam os diferentes padrões de digestão encontrados nas amostras.

Quadro 7. Número de pares de bases dos produtos de restrição da região ITS amplificada com ITS1F/NI6Amun, pelas enzimas *Mbo* I e *Hinf* I para as micorrizas de *E. grandis* obtidas de plantas do Viveiro Soust, transplantadas a dois solos: com antecedentes de plantações de *Eucalyptus* spp. (Parque Roosevelt) e sem antecedentes (Canelones).

Enzima	Número de pares de bases (pb) por banda	
	Parque Roosevelt	Canelones
<i>Mbo</i> I	1) 350 - 313 (67%) ²	1) 350 - 313 (57%)
<i>Hinf</i> I	1) 517 - 246 - 22 (33%) 2) 676 - 517 - 246 - 222 3) 921 - 517 - 460 - 222	Não foi realizada digestão com esta enzima.

² Entre paréntese é indicado a porcentagem do padrão mais freqüente.

Quadro 8. Número de pares de bases dos produtos de restrição da região ITS amplificada com ITS1F/NI6Amun, pelas enzimas *Mbo* I e *Hinf* I para as micorrizas de *E. grandis* obtidas de plantas do Viveiro Siglo XVIII, transplantadas a dois solos: com antecedentes de plantações de *Eucalyptus* spp. (Parque Roosevelt) e sem antecedentes (Canelones).

Enzima	Número de pares de bases (pb) por banda	
	Parque Roosevelt	Canelones
<i>Mbo</i> I	1) 350 - 313 ¹ (53%) ² 2) 646 - 350 - 313 - 173 3) 350 - 313 - 173	1) 350 - 275 (60%) 2) 350 - 275 - 262

² Entre paréntese é indicado a porcentagem do padrão mais freqüente.

A digestão com a enzima *Hinf* I rendeu um número maior de polimorfismos que a *Mbo* I, permitindo caracterizar como diferentes, amostras que apresentavam o mesmo padrão com a última enzima.

É evidente a necessidade de repetir as restrições dessas amostras e testar outras enzimas que permitam determinar a diversidade de fungos ectomicorrízicos, de forma que a metodologia possa ser utilizada como ferramenta na avaliação de diversidade da comunidade fúngica ou do efeito de diferentes fatores na composição dessa comunidade.

Nesse sentido é preciso, uma análise para determinar qual seria o número de amostras necessário para avaliar a diversidade da comunidade micorrízica numa plantação de eucalipto em diferentes condições. Poucos são os estudos que têm tentado resolver o problema do número de amostras requerido para a análise de comunidades. Tews e Koske (1996) examinaram esse problema em relação à comunidade endomicorrízica, sugerindo que seriam necessárias 40 amostras para estimar a densidade de esporos de fungos endomicorrízicos, mesmo com o erro padrão de 50%. Seguindo esse raciocínio, seriam necessárias milhares de amostras para atingir um erro padrão de 95%. Para a estimativa da riqueza de espécies, foram requeridas entre 9 e 30 amostras para recuperar todas as espécies de fungos endomicorrízicos no sistema de dunas estudado por esses autores.

Para o caso das comunidades ectomicorrízicas, são necessários estudos similares, para determinar os números de raízes e de sítios de amostragem adequados para determinar a densidade e a diversidade.

Dessa forma, o presente estudo carece de uma abordagem prévia para determinação do número significativo de amostras que possa permitir uma aplicação da metodologia numa avaliação da comunidade fúngica ectomicorrízica.

O outro aspecto a considerar é que os trabalhos encontrados na literatura se referem principalmente, a estudos realizados em comunidades micorrízicas de coníferas com quase nenhuma referência a estudos em eucalipto. (Kårén e Nylund, 1996; Kårén et al., 1996; Kårén et al., 1997; Amicucci et al., 1998; Gehring et al., 1998; di Batista et al., 1999; Jonsson et al., 1999). Nesses estudos, a metodologia de amostragem difere muito de um trabalho para outro.

Assumindo que as micorrizas estivessem uniformemente distribuídas na raiz e em áreas maiores, cálculos simples poderiam ser feitos para obter o número de amostras de acordo com o erro experimental desejado. Mas, as micorrizas se apresentam em locais determinados dentro do sistema radicular e apresentam variação espacial nas plantações. Gehring et al. (1998), estudando a comunidade ectomicorrízica associada a *Pinus edulis* encontraram que cada árvore amostrada era dominada por um mesmo tipo micorrízico, mas esse tipo não era dominante em todas as árvores.

A distribuição ectomicorrízica responde, também, a diferenças entre os tipos de solos, tanto para a ocorrência quanto para a abundância dos diferentes tipos,

A comunidade micorrízica seria melhor descrita amostrando um maior número de árvores mas coletando um número pequeno de amostras em cada (Nylund et al., 1995). A limitação nessa estratégia seria principalmente de ordem econômica, esses mesmos autores estimaram que para a técnica de PCR/RFLP o valor por cada amostra seria de 50 U\$S. A problemática da amostragem, então, é um dos pontos a serem avaliados antes da aplicação da metodologia em estudos de ecológicos.

Um aspecto a ser considerado quando se pretende fazer estudos de comunidade, no caso particular de *Eucalyptus* spp. é a avaliação do componente endomicorrízico. *Eucalyptus* spp. apresentam tanto endo quanto ectomicorrizas. Especialmente nos primeiros estádios de desenvolvimento, os dois tipos fungos convivem no sistema radicular sendo componentes importantes da comunidade rizosférica dessas plantas. Entretanto, contando com iniciadores específicos para os fungos zigomicetos, formadores de endomicorrizas, a metodologia pode também ser aplicada, com variantes menores, para o estudo da diversidade endomicorrízica, com as mesmas vantagens que no caso de fungos ectomicorrízicos. (di Bonito, R., 1995; Lanfranco et al, 1998).

Considerando esses aspectos que ainda necessitam ser definidos, as técnicas de biologia molecular aplicadas ao estudo das ectomicorrizas, testadas no presente trabalho, se apresentam como

uma ferramenta que vem complementar e potencializar os métodos mais tradicionais de estudos de comunidades fúngica.

5. Conclusões

A amplificação com os iniciadores NSA3/NLC2 e ITS1F/NLB3 apresenta as vantagens de ser específica para o ADN fúngico, sendo particularmente útil para aplicação em estudos sobre comunidades fúngicas associadas à raízes (micorrizas). Além disso apresenta a vantagem de poder amplificar o ADN fúngico tanto de ascomicetos quanto de basidiomicetos, grupos mais frequentes nas ectomicorrizas.

Para as micorrizas de *E. grandis* obtidas em viveiro e solos, foi efetiva a amplificação com os iniciadores ITS1F/NL6A_{mun} ou ITS1F/NL6B_{mun} seguida de digestão com enzimas de restrição.

Das três enzimas de restrição testadas, *Hinf* I foi a que permitiu uma maior diferenciação entre os polimorfismos.

Tanto para as micorrizas de viveiro como após transplântio, a metodologia de PCR/RFLP permitiu detectar um número maior de tipos de micorrizas que os detectados por morfotipagem.

6. Considerações finais

As técnicas de biologia molecular apresentam grande potencial para o estudo de comunidades micorrízicas, sendo independentes do ambiente e do hospedeiro, e evitam diversos problemas apresentados pelos métodos mais tradicionais de estudos de comunidades.

O presente trabalho apresenta uma primeira aproximação ao uso de marcadores moleculares na análise de micorrizas de *Eucalyptus* em condições ambientais. A amplificação da região ITS com iniciadores fungo-específicos, uma vez solucionado o problema da extração do ADN a partir de um número reduzido de micorrizas, seguida de digestão com enzimas de restrição, apresenta-se como um procedimento simples e rápido para a análise da comunidade fúngica em plantações de *Eucalyptus* spp. (no Anexo, são apresentados os protocolos das diferentes técnicas empregadas na metodologia para amostras ambientais).

Existem, porém, alguns aspectos a ser considerados, previamente à aplicação da metodologia em estudos de diversidade ou de impacto ambiental como o número de amostras necessários para avaliar a comunidade na sua totalidade.

Os resultados apresentados confirmam as discrepâncias entre a caracterização morfológica (morfotipagem), empregada como uma primeira aproximação para agrupar as amostras, e os resultados ao nível molecular. As diferenças indicam que podem estar sendo considerados como diferentes morfotipos que são formados pelo mesmo fungo, mas que apresentam características diferentes devido à idade da micorriza ou a fatores ambientais. Também podem estar sendo agrupadas micorrizas formadas por diferentes fungos mas que apresentam morfologias muito similares.

O ideal seria, então, a extração do ADN de uma única micorriza. A metodologia de extração de ADN deve ser, portanto, melhorada para conseguir obter o ADN de uma única micorriza de eucalipto pois tais micorrizas apresentam-se, em geral, como micorrizas bastante menores e com menos micélio que as micorrizas de coníferas.

Uma vez obtido o ADN dessa única micorriza, a quantidade e qualidade do mesmo deve ser suficiente para ser submetida às condições da reação de amplificação requeridas para iniciadores fungo-específico. As condições para os iniciadores fungo-específicos utilizadas no presente trabalho são mais rígidas que as necessárias para iniciadores universais sendo necessário, então, melhorar a extração do ADN. Nesse sentido, uma alternativa é a extração de ADN sem os passos de purificação (desproteínização). O resultado seria uma quantidade maior de ADN menos fragmentado, apesar de apresentar mais interferência. Modificando as condições da reação, concentrações dos reagentes e diluição da amostra, as interferências podem ser evitadas na etapa da amplificação.

7. Referências bibliográficas

- AGERER, R. Characterization of Ectomycorrhiza. In: Norris, J. R.; Read, D.J.; Varma, A. K. (eds) *Techniques for Mycorrhizal Research - Methods in Microbiology*. London: Academic Press, 1994. pp 25-73.
- ALEXOPOULOS, C.J. ; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. 4 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. , 1996. 869p.
- AMARANTHUS, M.; LUOMA, L. Diversity of ectomycorrhizal fungi in forest ecosystems: importance and conservations. In: *Abstracts of The International Symposium on Microbial Ecology*. 1995. Santos, August 27.
- AMICUCCI, A.; ROSSI, I.; POTENZA, L.; ZAMBONELLI, A.; AGOSTINI, D.; PALMA, F.; STOCCHI, V. Identification of ectomycorrhizae from *Tuber* species by RFLP analysis of the ITS region. *Biotec. Let.* 18 (7): 821-826. 1996.
- AMICUCCI, A.; ZAMBONELLI, A.; GIOMARO, G.; POTENZA, L. STOCCHI, V. Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *Tuber* by species-specific ITS primers. *Mol. Ecol.* 7: 273-277. 1998.
- BELLEI, M.; GARBAYE, J.; GIL, M. Mycorrhizal succession in young *Eucalyptus viminalis* plantations in Santa Catarina (southern Brazil). *For. Ecol. Man.* 54: 205-213. 1992.
- BETHLENFALVAY, G. Mycorrhizae and crop productivity. Cap. 1. 1-28 In: *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Bethlenfalvay, G.; Linderman, R. (eds.) Wisconsin: 1992. 124p.

- BOUDARGA, K.; LAPEYRIE, F.; DEXHEIMER, J. A technique for dual vesicular-arbuscular endomycorrhiza/ectomycorrhizal infection of *Eucalyptus in vitro*. *New Phytol.* 114: 73-76. 1990.
- BRUSSA, C. *Eucalyptus*: Especies de cultivo más frecuente en Uruguay y regiones de clima templado. Montevideo. Editorial Hemisferio Sur. 1994. 328p.
- BUSCOT, F.; WIPF, D.; DI BATTISTA, C.; MUNCH J-C.; BOTTON, B.; MARTIN, F. DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR. *Mycol. Res.* 100(1) 63-71. 1996.
- CAFFERA, R.; CÉSPEDES, C.; GONZALEZ, A.; GUTIERREZ, O.; PANARIO, D. Hacia una evaluación de efectos ambientales de la forestación en Uruguay con especies introducidas. Cap. 4. Pág 157. In: *Desarrollo Forestal y Medio Ambiente*. Montevideo: CIEDUR (eds.) 1994. 336p.
- CARNERO, E.; TAGU, D.; MARTIN, F. Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers to estimate the proportion of *Pisolithus tinctorius* and *Eucalyptus globulus* RNAs in ectomycorrhiza. *Appl. Environ. Microbiol.* pp 840-843. 1997.
- CÁZARES, E.; TRAPPE, J. Spore dispersal of ectomycorrhizal fungi on a glacier forefront by mammal mycophagy. *Mycol.* 86(4): 507-510. 1994.
- CLARIDGE, A. Is the relationship among mycophagous marsupials, mycorrhizal fungi and plants dependent on fire? *Aust. J. Ecol.* 17: 223-225. 1992.
- CHILVERS, G. A. Some distinctive types of eucalypt mycorrhiza. *Aust. J. Bot.* 16 (1): 49-70. 1968.

CHILVERS, G. A.; LAPEYRIE, F.; HORAN, D. Ectomycorrhizal vs endomycorrhizal fungi within the same root system. *New Phytol.* 107: 441-448. 1987.

CHILVERS, G. A.; PRYOR, L. The structure of eucalypt mycorrhizas. *Aust. J. Bot.* 13: 245-259. 1965.

COMPAÑÍA FORESTAL ORIENTAL S.A. Estudios de Impacto Ambiental. Folleto. 1995. 12 pp.

DAHLBERG, A.; JONSSON, L.; NYLUND J-E. Species diversity and distribution of biomass above and below ground among ectomycorrhiza fungi in an old-growth Norway spruce forest in south Sweden. *Can. J. Bot.* 75: 1323-1335. 1997.

DAHLBERG, A.; STENTRÖM, E. Dynamic changes in nursery and indigenous mycorrhiza of *Pinus sylvestris* L. and *Pinus contorta* ssp *latifolia* Engelm after outplanting. *Plant Soil.* 136: 73-86. 1991.

DANIELSON, R. Temporal changes and effects of ammendments on the occurrence of sheating (ecto-) mycorrhizas of conifers growing in oil sands tailings and coal spoil. *Agric. Ecosyst. Environ.* 35: 261-281. 1991.

DANILUK, G. La certificación ecológica de bosques como estrategia de comercialización: un modelo de certificación ecológica para los bosques de Uruguay. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Superior de Ingenieros de Montes. Madrid. España. 1998. 355p.

DE BARROS, N.; BRANDI, R. SILVA, M. Micorriza em eucalipto. *Rev. Árv.* 2(2): 130-140. 1978.

DI BATTISTA, C.; GANDEBOEUF, D.; DUPRE, C.; BARDET, M.; CHEVALIER, G.; MARTIN, F. Identification of the black truffle, *T. melanosporum*, in ectomycorrhizal roots of nursery seedlings by

pcr-based assays. Proceedings of the Vth International Congress Science and Cultivation of Truffles and other Edible Hypogeous Mushrooms, 4-6 March 1999, Aix-en-Provence: Fédération Française des Trufficulteurs, Paris, France, (eds).

DIARIO OFICIAL. Ley Forestal: Ley N° 15 939. Uruguay. 1988. pp 276-282.

DI BONITO, R.; ELLIOTT, M.L. DES JARDIN, E.A. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. Appl. Environ. Microbiol. 2809-2810. 1995.

DONALDSON, G.; BALL, A.; AXELROOD, P.; GLASS, L. Primer sets developed to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes are useful in differentiating *Fusarium* species associated with conifers. Appl. Environ. Microbiol. pp 1331-1340. 1995.

EDEL, V.; STEINGBERG, C.; GAUTHERON, N.; ALABOUVETTE, C. Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. Mycol. Res. 101(2): 179-187. 1996.

EGGER, K. N. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. Can. J. Bot. 73: 1415-1422. 1995.

ERLAND, S. Effects of liming on pine ectomycorrhiza. In: Mycorrhizas in ecosystems. Wallingford: Read, D.; Lewis, A.; Fitter, A.; Alexander, I. (eds). C.A.B. International. pp 113-118. 1992.

ERLAND, S. Abundance of *Tylospora fibrillosa* ectomycorrhizas in a south Swedish spruce forest measured by RFLP analysis of the PCR-amplified rDNA ITS region. Mycol. Res. 99: 1425-1428. 1995.

ERLAND, S.; HENRION, B.; MARTIN, F.; GLOVER, L.; ALEXANDER, I. Identification of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tylospora*

- fibrilosa* Donk by RFLP analysis of the PCR-amplified ITS and IGS regions of ribosomal DNA. *New Phytol.* 126, 525-532. 1994.
- FITTER, A.; GARBAYE, J. Interaction between mycorrhizal fungi and other soil organisms. In: *Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry*. Robson, A.; Abbott, L. Malajczuk, N. (eds). pp 123-132. 1994.
- FITTER, A.; SANDERS, I. Interactions with the soil fauna. In: *Mycorrhizal Functioning. An integrative plant fungal process* In: Allen, M. (ed.) . New York. pp. 333-353. 1992.
- FOULY, H. WILKINSON, H., CHEN, W. Restriction analysis of internal transcribed spacers and the small subunit gene of ribosomal DNA among four *Gaeumannomyces* species. *Mycol.* 89 (4) 590-597. 1997.
- FORTIN, J. ; PICHÉ, Y, LALONDE, M. Technique for the observation of early morphological changes during ectomycorrhiza formation. *Can. J. Bot.* 58 (3): 361-365. 1980.
- GARDES, M.; BRUNS, T. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2, 113-118. 1993.
- GARDES, M.; BRUNS, T. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Can. J. Bot.* 74: 1572-1583. 1996.
- GEHRING, C.A.; THEIMER, T.C.; WHITHAM, T.G. KEIM, P. Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. *Ecol.* 79 (5): 1562-1572. 1998.

- GIACHINI, A. J.; OLIVEIRA, V.L., TRAPE, J.M.; CASTELLANO, M.A. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in Southern Brazil. Submitted to *Mycology*. 1999.
- GOODMAN, D.; DURALL, D.; TROFYMOW, J.; BERCH, S. A manual of concise descriptions of North American ectomycorrhizae. Sydney: Mycologue Publications. 1996-1998.
- HAWKSWORTH, D. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* 6, 641-655. 1991.
- HENRION, B.; CHEVALIER, G.; MARTIN, F. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.* 98, 37-43. 1994 a
- HENRION, B.; DI BATTISTA, C.; BOUCHARD, D.; VAIRELLES, D.; THOMPOSON, B.; LE TACON, F.; MARTIN, F. Monitoring the persistence of *Laccaria bicolor* as an ectomycorrhizal symbiont of nursery-grown Douglas fir by PCR of the rDNA intergenic spacer. *Mol. Ecol.* 3: 571-580. 1994b
- HUTCHINSON, L. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon* 42: 387-504. 1991.
- INGLEBY, K.; MASON, P.A.; LAST, F.T.; FLEMING, L.V. Identification of ectomycorrhizas. London: ITE Research Publication N° 5. 112 pp. 1990.
- JONSSON, L.; DAHLBERG, A.; NILSSON, M-C.; ZACKRISSON, O; KÅRÉN, O. Ectomycorrhizal fungal communities in late-successional Swedish boreal forests, and their composition following wildfire. *Mol. Ecol.* 8: 205-215. 1999.

- JUNGHANS, D. GOMES, E. GUIMARÃES, W., BARROS, E. ARAÚJO, E. Genetic diversity of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* based on RAPD-PCR analysis. *Mycorrh.* 7:243-248. 1998.
- KÅRÉN, O.; HÖGBERG, N.; DAHLBERG, A, GRIP, K, NYLUND, J-E. Influence of drought on ectomycorrhizal species composition morphotype versus PCR identification. In: *Mycorrhizas in integrated systems. From genes to plant development.* Azcon-Aguilar, C; Barea, J. (eds.) pp. 43-46. 1996.
- KÅRÉN, O.; HÖGBERG, N.; DAHLBERG, A.; JONSSON, L; NYLUND, J-E. Inter- and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis. *New Phytol.* 136: 313-325. 1997.
- KÅRÉN, O.; ; NYLUND, J-E. Effects of N-ree fertilization on ectomycorrhiza community structure in Norway spruce stands in southern Sweden. *Plant and Soil.* 181: 195-305. 1995.
- KLIRONOMOS, J.; KENDRICK, W. Research on mycorrhizas: trends in the past 40 years as expressed in the MYCOLIT database. *New Phytol.* 125: 595-600. 1993.
- KOZLOVIZ, P.; LOPEZ, I.; VOLTOLINI, G. Determinación del porcentaje de ecto y endomicorrización en árboles y plantines de *E. grandis* de diferentes edades para dos localidades distintas. Tesis. Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 1997. 121 p.
- KUSABA, M.; TSUGE, T. Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specializaation in *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 3055-3062. 1994.
- LACOURT, I.; PANABIÈRES, F.; MARAIS, A.; VENARD, P.; RICCI, P. Intraspecific polymorphism of *Phytophthora parasitica* revealed by

- analysis of mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. *Mycol Res.* 98 (5): 562-568. 1994.
- LAPEYRIE, F.; CHILVERS, G. An endomycorrhiza-ectomycorrhiza succession associated with enhanced growth of *Eucalyptus dumosa* seedlings planted in a calcareous soil. *New Phytol.* 100: 93-104. 1985.
- LAST, F.T.; WILSON, J.; MASON, P.A. Numbers of mycorrhizas and the growth of *Picea sitchensis* - What is the relationship? *Agric., Ecosist. Environ.* 28: 293-298. 1989.
- LEE, S.; TAYLOR, J. DNA isolation from fungal mycelia and single spores. In: *PCR Protocol, A Guide To Methods And Applications.* : Innis, M, Gefald, D., Sninsky, J, White, T., (eds.). London Academic Press, pp 282-287. 1991.
- LIMA, W.P. *Impacto Ambiental do Eucalipto.* EDUSP. São Paulo. 1993. 302p.
- LONGATO, S.; BONFANTE, P. Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. *Mycol. Res.* 101: 425-432. 1997.
- MALVÁREZ, G.; IRISITY, F.; IRURETA, F.; FRIONI, L. Micorrização em mudas de *Eucalyptus grandis* produzidas em viveiros comerciais do Uruguay. Rio de Janeiro: XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia. 1997. p 209.
- MARTIN, F.; DELARUELLE, C.; IVORY, M. Genetic variability in intergenic spacers of ribosomal DNA in *Pisolithus* isolates associated with pine, eucalyptus and *Azelia* in lowland Kenyan forests. *New Phytol.* 139: 341-352. 1998.

MARTIN, K. Molecular procedures to identify and track mycorrhizae in environmental samples. Corvallis: Project SOP number 7.08. EPA. 1995.

MARTINO, D., BENNADJI, Z.; FOSSATI, A.; PAGLIANO, D.; VAN HOFF, E. La forestación con eucaliptos en Uruguay: su impacto sobre los recursos naturales y el ambiente. Montevideo: Serie Técnica N 88. INIA. 1997 23 pp.

MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of the pine roots to pathogenic infection. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopath.* 59: 153-163. 1969.

MASSICOTE, H.; MOLINA, R.; LUOMA, D.; SMITH, J. Biology of ectomycorrhizal genus *Rhizopogon*. II. Patterns of host-fungus specificity following spore inoculation of diverse hosts grown in monoculture and dual culture. *New Phytol.* 126: 677-690. 1994.

MATSUMOTO, T.; FUKUMASA-NAKAI, Y. Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms and phenetic relationships in natural populations of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Mycol. Res.* 99 (5): 562-566. 1995.

MATSUMOTO, M.; FURUYA, N.; MATSUYAMA, N. PCR-RFLP analysis of amplified 28S ribosomal DNA for identification of *Rhizoctonia* spp., the causal agents of the sheath diseases of rice plants. *J.Fac.Agr., Kyushu Univ.* 41:39-40. 1996.

McGEE, P.A. The Australian Zygomycetous Mycorrhizal Fungi: the Genus *Densospora* gen.nov. *Aust. Syst. Bot.* 9: 329-336. 1996.

MEINERT, M. Efeito da inoculação dos fungos micorrízico arbuscular, *Glomus clarum* (Nicol. & Schenck), e ectomicorrízico, *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch, sobre a colonização radicular,

- crescimento e nutrição de *Eucalyptus globulus* Labill. Tese. UFSC, Brasil. 1998. 112 p.
- MGAP (Ministerio de Ganaderia, Agricultura y Pesca) Criterios e indicadores para el manejo forestal sostenible. Ambiente global: acciones del Uruguay en el marco del proceso de Montreal. Dirección Forestal. Primer encuentro forestal del Litoral. Paysandú. Abril, 1997.
- MOLINA, R.; PALMER, J. Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: Methods and principles of mycorrhizal research. Schenck, N., (eds.). St. Paul: American Phytopathological Society. Minnesota. pp. 115-129. 1982.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350. 1987.
- NICHOLSON, M.; BUNYARD, B.; ROYSE, D. Phylogeny of the genus *Lentinula* based on ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism analysis. *Mycologia* 89 (3) 400-407. 1997
- NYLUND, J-E.; DAHLBERG, A.; HÖGBERG, N.; KÅRÉN, O.; GRIP, K.; JONSSON, L. Methods for studying species composition of mycorrhizal fungal communities in ecological studies and environmental monitoring. In: *Biotechnology of Ectomycorrhizae*, Stocchi et al. (eds.). New York: Plenum Press. pp. 229-239. 1995.
- OEA. Proyecto regional de alternativas para la inversión forestal. OEA 1994
- OLIVEIRA, V.L.; GIACHINI, A.J., DE SOUZA, L.A. B.; LENKAITIS, M.N. Diversidade de fungos ectomicorrízicos em plantações de *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp. de Santa Catarina. Relatório Científico Técnico, UFSC. Florianópolis. 1999.

- OLIVEIRA, V.L ; SCHMIDT, V., BELLEI, M. Patterns of arbuscular- and ecto- mycorrhizal colonization of *Eucalyptus dunnii* in Southern Brazil. *Ann. Sci. For* 54: 473-481. 1997.
- POORE, M.E.D.; FRIES, C. The ecological effects of eucalyptus. Roma: FAO Forestry Paper 59. 88p. 1989.
- RAFFIN, C.; BRYGOO, Y.; TRIRILLY, Y. Restriction analysis of amplified ribosomal DNA of *Pythium*, spp. isolated from soilless culture systems. *Mycol. Res.* 99(3):277-281. 1995.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SMITH, S. READ, D. *Mycorrhizal Symbiosis* (2nd edition) San Diego: Academic Press. (eds.) 1997. 605p.
- TAGU, D.; PYTHON, M.; CRÉTIN, C.; MARTIN, F. Cloning symbiosis-related cDNAs from eucalypt ectomycorrhiza by PCR-assisted differential screening. *New Phytol.* 125: 339-343. 1993.
- TEWS, L. L.; KOSKE, R.E. Towards a sampling strategy of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 87: 353-358. 1986.
- THOMSON, B.D., GROVE, T.S., MALAJCZUK, N. HARDY, G.E. StJ. The effectiveness of ectomycorrhizal fungi in increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labill. in relation to root colonization and hyphal development in soil. *New Phytol.* 126: 517-524. 1994.
- TICHY, H.; SIMON, R. Genetic typing of microorganisms: current concepts and future prospects.. In: *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms. Biotechnology and the release of GMOs.* O'Gara, F.; Dowling, D.; Boesten, D. (eds.) VCH. Weinheim. . 1994. pp. 103-111.

- TIMONEN, S.; TAMMI, H.; SEM, R. Characterization of the host genotype and fungal diversity in Scots pine ectomycorrhiza from natural humus microcosms using isozyme and PCR-RFLP analyses. *New Phytol.* 135: 313-323. 1997.
- TOMMERUP, I.C. Genetics of eucalypt ectomycorrhizal fungi. Proceedings of International Symposium of Recent Topics in Genetics, Physiology and Technology of the Basidiomycetes. Chiba, Japan. 1992. pp. 74-79.
- UENG, P.; CHEN, W. Genetic differentiation between *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria* using restriction fragment length polymorphisms. *Phytopatho.* 84(8):800-806. 1994.
- UENG, P.; CUNFER, B.; ALANO, A.; YOUMANS, J.; CHEN, W. Correlation between molecular and biological characters in identifying the sheat and barley biotypes of *Stagonospora nodorum*. *Phytopathol.* 85(1): 44-52. 1995.
- VOGT, K.; PUBLICOVER, D.; VOGT, D. A critique of the role of ectomycorrhizas in forest ecology. *Agric., Ecosyst. Environ.* 35:171-190. 1991.
- WHITE, T. The future of PCR technology: diversification of technologies and applications. *TIBTECH.* (14): 478-483. 1996
- WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes from phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* 315-322. 1990.
- ZAK, B. Classification of ectomycorrhizae. C. 2.. In: *Ectomycorrhizae, their ecology and physiology.* Marks, C.; Kozlowski, T. (eds) New York: Acad. Press. 1973. pp.43-78.

8. Anexos

Protocolos da metodologia para caracterização de fungos ectomicorrízicos

I) Extração de ADN

- 1) Adicionar ao tubo com o material fúngico 50 μL TNE (10mM Tris, 100 μM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8), 0,2% 2- β -mercaptoetanol (2-ME).
- 2) Macerar o material até homogeneizá-lo.
- 3) Adicionar outros 50 μL de TNE, 0,2% 2-ME, (utilizar esta quantidade para enxaguar restos de material do pistilo)
- 4) Adicionar 400 μL de tampão de lise 2xCTAB, 1%-ME, (2% brometo de cetil-trimetil amônio, 1,4 M NaCl, 20 mM NaEDTA, pH 8, 100mM Tris HCl, pH 9)
- 5) Incubar a 65°C, 30 min.
- 6) Adicionar 1 volume (ca. 500 μL de fenol-clorofórmio (4% isoamilálcool) (1/1). Misturar para emulsificar e centrifugar 10 min a 13000 $\times g$.
- 7) Transferir 2/3 da fase aquosa para um novo tubo
- 8) Adicionar 400 μL de clorofórmio (4% isoamilálcool). Centrifugar a 13000 $\times g$ por 5 min.

9) Retirar a fase aquosa para um tubo novo e reservar os tubos com o clorofórmio para a re-extração.

Re-extração

No conjunto original de tubos adicionar 400 μ L de TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) misturar até emulsificar e centrifugar 5 min (13000 \times g). Transferir a fase aquosa para o segundo conjunto de tubos (os que já têm o clorofórmio). Centrifugar 5min e transferir a fase aquosa para o último conjunto de tubos.

10) Adicionar 20 μ L de NaOAc 3M e 1 volume de isopropanol (-20°C). Inverter os tubos com suavidade para misturar.

11) Deixar 30 min a -20°C

12) Centrifugar 30 min a 13000 \times g.

13) Lavar o *pellet* em 100 μ L de etanol 70% (-20°C)

14) Centrifugar 5 min a 13000 \times g.

15) Descartar o etanol e deixar secar pelo menos duas horas.

16) Suspender em 50 μ L de TE.

II) Amplificação da região ITS do ADN fúngico

1) Preparar a mistura de reação com o tampão, nucleotídeos, iniciadores, MgCl₂ e água nas concentrações indicadas na tabela.

Reagente	[] Stock	[] Final	Vol. total	n° de tubos	Vol/reação	Mistura	
						μL	
Tampão	10	1	25	14	2,50	38,50	Tampão
dNTP (mM)	10	0,2			0,50	7,70	dNTP
MgCl ₂ (mM)	50	2			1,00	15,40	MgCl ₂
Iniciador NL6Bmun(μM)	10	0,1			0,25	3,85	Iniciador
Iniciador ITS1F (μM)	10	0,1			0,25	3,85	Iniciador
BSA (mg/mL)	100	5			1,25	19,25	BSA
Água (μL)					9,25	142,45	Água
Total:						231,00	
Taq polimerase (U/μL)	5	1			0,20	3,08	Taq
Tampão 1x					4,80	73,92	Tampão 1x

μL de Mist/tubo	15
Taq 1x	5
ADN/tubo:	5

Thermo buffer (x)	10	1	25	10	2,50	27,50	Tampão
dNTP (mM)	10	0,2			0,50	5,50	dNTP
MgCl ₂ (mM)	50	2			1,00	11,00	MgCl ₂
Iniciador NL6Amun(μM)	10	0,1			0,25	2,75	Iniciador
Iniciador ITS1F (μM)	10	0,1			0,25	2,75	Iniciador
BSA (mg/mL)	100	5			1,25	13,75	BSA
Água (μL)					9,25	101,75	Água
Total:						165,00	
Taq (U/μL)	5	1			0,20	2,20	Taq
Tampão 1x					4,80	52,80	Tampão 1x

μL de Mmix/tubo	15
:	
Taq 1x	5
ADN/tubo:	5

- 2) Colocar um disco de parafina (20 μ L) no tubo.
- 3) Adicionar o volume indicado de Mistura de reação.
- 4) Adicionar a amostra.
- 5) Incubar a 95° C durante 4min.
- 6) Após a parafina esfriar novamente, adicionar a solução de *Taq* polimerase em tampão 1x.

Programa para a reação

Para ITS1F/NL6Bmun
 Temperatura (°C)

Tempo

95 12s

93 20s

64 45s

72 30s

Repete por mais 9 ciclos

95 12s

93 20s

62 45s

72 30s

Repete por mais 24 ciclos

72 5min

II) Para ITS1F/NL6Amun
Temperatura (°C) Tempo

94 12s

93 20s

59 45s

73 30s

Repete por mais 9 ciclos

95 12s

93 20s

57 45s

72 30s

Repete por mais 24 ciclos

72 5min

III) Restrição da região ITS amplificada

- 1) Preparar a reação de digestão para um volume total de 20 μ L (de acordo com a seguinte tabela). Utilizar o tampão, temperatura e tempo de reação recomendados pelo fabricante das enzimas. Como amostra, utilizar 10 μ L do produto de amplificação sem purificar.

Enzima:

Volume total (μ L): 20

Reagente	μ L	
Água	6	
Tampão	2	
Amostra de ADN amplificado	10	
Enzima	2	2U: 2 μ L de diluição 1/10 de stock (10U/ μ L = 1 U/ μ L)

Condições:

Temperatura:	
Tempo:	