PRODUÇÃO DE CULTURAS MONOCARIÓTICAS E COMPATIBILIDADE SEXUAL INTRA E INTERPOPULACIONAL PARA O FUNGO ECTOMICORRÍZICO *Pisolithus tinctorius*.[1]

Dulcinéia de Carvalho[2], Sebastião Carlos da Silva Rosado[2], Anderson Marcos de Souza[2] e Alessandro Fabiano de Oliveira[2]

RESUMO - Basidiosporos de *Pisolithus tinctorius*, coletados em dois corpos de frutificações maduros (A e B) e procedentes de dois locais distintos reflorestados com *Eucalyptus* spp, no campus da UFLA, foram colocados para germinar e produzir culturas monocarióticas. Para isso, testaram-se oito condições de tratamentos, formados pelo arranjo fatorial dos seguintes componentes, adicionados ou não ao meio sólido MNM: plântula hospedeira (*Eucalyptus camaldulensis* - 2 plântulas por placa), ácido abiético ($C_{20}H_{30}O_2$) (100 mg.l^{-1}) e carvão ativado (0,3 g por placa). Constatou-se o início de germinação aos 60 dias após o início dos testes, sendo que até aos 120 dias foram obtidas 54 culturas apresentando o estado monocariótico. A eficiência na produção de culturas monocarióticas foi observada somente no tratamento onde os três componentes (planta hospedeira, ácido abiético e carvão ativado) estavam simultaneamente presentes, evidenciando uma ação sinergística entre estes componentes. Essa ação foi responsável pela formação de 75% e 68% das colônias obtidas nas frutificações A (população A) e B (população B), respectivamente. No estudo de compatibilidade sexual, nove colônias monocarióticas, sendo duas da população A e sete da população B, foram pareadas para cruzamento em meio sólido MNM, utilizando o delineamento em meio dialelo. Quatro semanas após os pareamentos, duas pequenas amostras de micélio da interface de contato das colônias pareadas foram transferidas para o meio sólido MNM. Quinze dias após a transferência, as colônias cultivadas a partir destas amostras foram microscopicamente analisadas quanto à presença de grampos de conexão celular, os quais foram utilizados como indicação da formação da fase dicariótica. Os resultados destas análises mostraram que as duas populações estudadas possuem grupos de compatibilidade sexual tetrapolar, e que ambas são geneticamente

[1] Estudo financiado pelo CNPQ

[2] Departamento de Ciências Florestais - Universidade Federal Federal de Lavras. CP 37, 37200-000, Lavras - MG

compatíveis, fato que permitiu a obtenção de culturas fúngicas híbridas para serem incorporadas em programas de melhoramento genético do fungo ectomicorrízico *P. tinctorius*.

Palavras-Chave: Compatibilidade sexual, ectomicorriza, germinação de esporos, *Pisolithus tinctorius*.

PRODUCTION OF MONOCARYOTIC CULTURES AND INTER- AND INTRAPOPULATION SEXUAL COMPATIBILITY FOR THE ECTOMYCORRHIZAL FUNGUS *Pisolithus tinctorius*

ABSTRACT - Basidiospores of *Pisolithus tinctorius* from two mature fruit-bodies (A and B) growing on two different sites reforested with *Eucalyptus* sp. were germinated to produce monocaryotic cultures. To this end, eight treatment conditions were tested, composed by a factorial combination of the following compounds, added or not in MMN agar medium: host seedling (*Eucalyptus camaldulensis* - 2 seedlings/dish plate), abietic acid (100 $mg.l^{-1}$) and activated charcoal (0,3 g/dish plate). The spore germination began after 60 days and 54 monocaryotic colonies were obtained before 120 days. The highest germination efficiency was observed only in the treatment where the three compounds were simultaneously added in the MMN agar medium, showing a synergistic action between them. This action promoted the growth of 75% and 68% of monocaryotic colonies from fruit-body A (population A) and B (population B), respectively. In the sexual compatibility study, nine monocaryotic colonies (two from population A and seven from population B) were paired on MMN agar medium using a half diallel mating design. After four weeks, two small samples of mycelium from interface of paired colonies were transferred to fresh MMN agar medium. After 15 days, the colonies growing from these samples were examined microscopically for the presence of clamp connections which were used to indicate dycarion formation. These results showed that the sexual compatibility of the two studied *P. tinctorius* populations are tetrapolar and that they are genetically compatible to produce hybrid cultures for introduction in fungal breeding programs.

Key words: Ectomycorrhiza, *Pisolithus tinctorius*, sexual compatibility, spore germination.

1 INTRODUÇÃO

Pisolithus tinctorius (Pers.) Coker e Couch é um fungo ectomicorrízico, cosmopolita, que vive em simbiose com várias espécies de árvores, principalmente com as dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus* (Marx, 1977). Esta simbiose é essencial para as árvores hospedeiras, principalmente quando cultivadas em sítios inóspitos, pois o parceiro fúngico melhora a absorção e o transporte de água e nutrientes do solo para as raízes (Skinner e Bowen, 1974a; 1974b), aumenta a tolerância à acidez, toxidez de metais pesados, temperaturas elevadas do solo (Marx, 1991) e a resistência às doenças do sistema radicular (Kope *et al.* 1990).

Nesta espécie, Lamhamedi *et al.* (1990), Lamhamedi e Fortin (1991) e Rosado *et al.*(1994) constataram significativas variações genéticas entre isolados monocarióticos e dicarioticos para o nível de colonização radicular e crescimento micelial, cujas características fúngicas, se melhoradas, aumentam a superfície de exploração do solo, melhorando ainda mais os benefícios simbióticos anteriormente mencionados.

Tais propriedades, associadas à possibilidade do *P. tinctorius* ser cultivado "in vitro", permitem que inóculos deste fungo possam ser produzidos em larga escala e aplicados em mudas de modo eficaz (Garbaye, 1983). Entretanto, o sucesso desta aplicação ainda depende da disponibilidade de inóculos fúngicos, constituídos por estirpes que realmente melhorem o desenvolvimento das mudas e que tenham a capacidade de se manter na forma de ectomicorriza e de colonizar novas raízes. Para a seleção de estirpes eficientes, torna-se inicialmente necessária a condução de estudos genéticos e fisiológicos com fungos ectomicorrízicos, os quais podem ser melhor conduzidos utilizando culturas dicarióticas, geradas por cruzamentos entre culturas monocarióticas, originadas pela germinação de um único esporo (Kope e Fortin, 1990). A identificação dos sistemas de cruzamentos entre culturas monocarióticas permitirá a realização destes cruzamentos e, conseqüentemente, a reconstituição "in vitro" de progênies fúngicas dicarióticas para serem empregadas em estudos de seleção e melhoramento genético.

Assim, os objetivos do presente estudo foram: i) avaliar a produção de culturas monocarióticas a partir de esporos de *P. tinctorius* em meio MNM com diferentes componentes, ii) identificar a compatibilidade sexual inter e intrapopulacional de culturas monocarióticas obtidas em duas populações fúngicas distintas e iii) obter culturas dicarióticas híbridas para serem incorporadas em futuros programas de melhoramento genético de *P. tinctorius*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção de culturas monocarióticas

Basidiosporos de *P. tinctorius* foram extraídos de dois corpos de frutificação (A e B) intactos e maduros, procedentes de dois locais distintos da região de Lavras - MG e reflorestados com *Eucalyptus* spp. Após a limpeza externa dos corpos de frutificação com álcool etílico absoluto, foram feitos, em capela de fluxo laminar horizontal, o corte transversal ao eixo da frutificação e a retirada dos esporos com o auxílio de uma espátula estéril. Os esporos extraídos foram colocados em uma placa de Petri seca e estéril e uma pequena quantidade da massa de esporos (0,03g) foi retirada com uma espátula e homogeneamente espalhada sobre outra placa de Petri com 100 mm de diâmetro, contendo o meio malte (20 $g.l^{-1}$)/ agar (10 $g.l^{-1}$) com pH ajustado em 5,5. Tal operação foi repetida 10 vezes e todas as placas montadas foram incubadas a 25° C, no escuro, por sete dias. Esta incubação inicial foi denominada de incubação de "limpeza", as placas foram observadas diariamente e as áreas contaminadas removidas, ou as placas com excessiva contaminação descartadas.

Transcorridos os dias de incubação de "limpeza", selecionaram-se as placas isentas de contaminação aparente e retirou-se uma amostra em forma de quadrado do meio malte/agar, de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm, contendo os esporos. Esta amostra foi cuidadosamente deslizada sobre toda a superfície do meio sólido MNM (Marx, 1969), com ou sem adição de ácido abiético (100 $mg.l^{-1}$) filtrado em filtro millipore (1,5 μm). Esta operação foi conduzida de forma que os esporos, provenientes da amostra, tivessem a distribuição mais homogênea possível (Figuras 1B e 1C) sobre o meio MNM + ácido abiético, contido em placas de Petri (100 mm Ø). Em cada placa de Petri, que recebeu os esporos provenientes de apenas um quadrado, foram ou não adicionadas duas plântulas hospedeiras (*Eucalyptus camaldulensis*), que é uma espécie micotrófica e 0,3 g de carvão ativado previamente autoclavado e polvilhado em uma metade da placa, conforme mostra a Figura 1A, para comporem os tratamentos descritos no quadro 2. Para cada tratamento foram produzidas 10 placas as quais foram imediatamente colocadas em câmara de crescimento com 12 horas luz (300 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)/12 horas escuro e com temperatura e umidade controladas à 25° C e 85%, respectivamente.

As plântulas hospedeiras foram obtidas pela germinação de sementes em condições assépticas, após a desinfecção com hipoclorito de sódio comercial (50%) por uma hora e três enxagües sucessivos com água destilada e autoclavada. A germinação ocorreu em placas de Petri

(150 mm Ø), contendo o meio sólido MNM, as quais foram previamente incubadas no escuro por dois dias e posteriormente colocadas em câmaras de crescimento com condições ambientais controladas conforme descrito anteriormente. O transplante das plântulas para as placas-tratamento (Quadro 2) foi feito quando estas apresentavam o primeiro par de folhas e raiz principal definidos.

As observações microscópicas, para verificar a germinação dos esporos, foram iniciadas aos 30 dias e, a partir destes, manteve-se a freqüência de observações a cada intervalo de sete dias. Após a constatação das primeiras germinações (Figura 1B), a posição do jovem micélio foi assinalada no dorso da placa de Petri e as observações posteriores foram feitas de dois em dois dias para se detectar o tamanho propício (Figura 1C) das colônias para serem removidas e transferidas para o meio sólido MNM.

As colônias, assim isoladas, foram incubadas à 25° C e aquelas que continuaram o processo de crescimento foram observadas microscopicamente, a cada dois dias, para verificar a ausência (Figura 2B) ou presença (Figura 2C) de grampos de conexão celular, o que distiguiu o estado monocariótico do dicariótico, respectivamente (Casselton e Economou, 1985).

2.2. Identificação dos grupos de compatibilidade sexual e da esterilidade intra e interpopulacional

Após a produção e identificação das colônias monocarióticas, selecionaram-se nove colônias, sendo duas provenientes da frutificação A (população A) e sete provenientes da frutificação B (população B), para serem pareadas em meio sólido MNM (Figura 2A), usando o delineamento de cruzamento em meio dialelo, adaptado do delineamento usual para cruzamento entre plantas (Zobel e Talbert, 1984). Quatro semanas após os pareamentos, dois quadrados de aproximadamente 3 x 3 mm, contendo uma amostra de micélio da interface das colônias pareadas (Figura 2A), foram retirados e transferidos para crescerem em meio sólido MNM. Aos 7 e 14 dias após esta transferência, as colônias obtidas destas amostras foram microscopicamente examinadas para constatar a presença de grampos de conexão celular (Figura 2C) e os grupos de compatibilidade sexual foram identificados conforme o quadro 1. Seis semanas após os pareamentos, procederam-se a novas amostragens e exames microscópicos para reavaliar a identificação dos grupos de compatibilidade sexual.

QUADRO 1 - Grupos de compatibilidade sexual em um sistema tetrapolar

Grupos	A_1B_1	A_1B_2	A_2B_1	A_2B_2
A_1B_1	-	-	-	+
A_1B_2	-	-	+	-
A_2B_1	-	+	-	-
A_2B_2	+	-	-	-

+ Presença de grampos de conexão indicando cruzamentos compatíveis
- Ausência de grampos de conexão indicando cruzamentos incompatíveis

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção de culturas monocarióticas

Transcorridos os sete dias iniciais de incubação de "limpeza", verificou-se uma taxa de contaminação de placas inferior a 10%. Esta taxa pode ser considerada como normal, visto que não foi utilizado qualquer tipo de antibiótico ou fungicida no meio malte/agar (meio de "limpeza") para não afetar a germinação dos esporos.

Após 60 dias de incubação das placas, contendo os tratamentos indutores da germinação (Quadro 1), em câmara de crescimento, observou-se o início da germinação e a formação das jovens hifas que foram facilmente localizadas dentro das placas de Petri (Figura 1B). Este tempo para o início da germinação encontra-se dentro da faixa requerida pelos Gasteromicetos, que geralmente necessitam de um tempo de incubação superior a cinco semanas (Bulmer, 1964).

Quinze dias após as primeiras germinações, várias pequenas colônias (Figura 1C) foram facilmente removidas com o auxílio de um bisturi de ponta fina e uma lupa esteroscópica (aumento de 50 x) que permitiu observar se o micélio de duas colônias, distintas e próximas, estava em contato ou não. Todas as colônias que se tocaram foram retiradas e eliminadas, pois há grande possibilidade da ocorrência da migração de núcleos e a formação da fase dicariótica.

O Quadro 2 mostra a quantidade total de colônias monocarióticas obtidas nos diferentes tratamentos. As estimativas dos valores médios do número de colônias monocarióticas obtidas por tratamento e, conseqüentemente, as análises estatísticas de comparação de médias não foram

efetuados. O desbalanceamento dos dados foi provocado por uma alta taxa de germinação e produção de colônias monocarióticas em uma única ou em poucas placas de Petri (repetições) e completa ausência de germinação em outras placas de um mesmo tratamento. Este fato sugere que a formação inicial de uma colônia no meio de cultura estimula a germinação de outros esporos, fato já observado em *Laccaria bicolor* (B. R. Kropp, informação pessoal).

QUADRO 2 - Número de colônias monocarióticas obtidas por tratamento e frutificação (população)

Tratamentos	Frutificação (População)	Ácido Abiético (**)	Carvão ativado (***)	Plântula Hospedeira	Nº total de colônias obtidas
1	A	+	+	+	3
2	A	+	+	-	0
3	A	+	-	+	0*
4	A	+	-	-	0
5	A	-	+	+	1
6	A	-	+	-	0
7	A	-	-	+	0
8	A	-	-	-	0
9	B	+	+	+	32
10	B	+	+	-	1
11	B	+	-	+	11
12	B	+	-	-	0
13	B	-	+	+	3
14	B	-	+	-	3
15	B	-	-	+	0*
16	B	-	-	-	0

(+) Componente presente, (-) Componente ausente e (*) Tratamentos que tiveram todas as placas contaminadas. (**) O ácido abiético foi filtrado em filtro millipore (1,5 µm) e adicionado ou não ao meio MNM após autoclavagem. (***) O carvão ativado foi autoclavado e uma quantidade de aproximadamente 0,3g foi polvilhada em uma metade da placa, conforme mostra a Figura 1A.

Uma taxa de contaminação da ordem de 40% foi observada nos diferentes tratamentos, principalmente por *Penicillium*. Esta taxa pode ser considerada normal pelas razões que anteriormente foram mencionadas e pelo fato de que o tempo de incubação inicial de "limpeza" não é completamente eficaz. Uma maior duração do tempo de incubação de "limpeza" talvez não seja possível, pois isso poderia reduzir a viabilidade dos esporos, visto que, para a espécie em estudo não existe relatos sobre o tempo de viabilidade de seus esporos.

A pequena quantidade de colônias obtidas (Quadro 2) em relação ao número de repetições parece ser uma característica inerente à espécie *P. tinctorius*. Relatos sobre a germinação de esporos desta espécie têm evidenciado baixos níves de germinação. Lambs e Richards (1974), Bulmer (1964) e Kope e Fortin (1990) relataram taxas de 0,38%, 0,1% e 0,01%, respectivamente, sendo que os dois primeiros autores utilizaram culturas de leveduras como ativador de germinação e o último, tal como neste estudo, utilizou o ácido abiético na mesma concentração, porém adicionado ao meio de Fries (1983).

O Quadro 2, também mostra que a população A apresentou uma menor produção de colônias monocarióticas (total de 4) que a população B (total de 50). Esta variação pode ser decorrente de uma possível variação no grau de maturação dos corpos de frutificação ou pode estar relacionada a uma provável variação natural na espécie, tal como foi evidenciado no fungo ectomicorrizico *Laccaria laccata* (Fries, 1984).

Com relação à adição do ácido abiético, carvão ativado e planta hospedeira ao meio sólido MNM, os resultados apresentados no quadro 2 mostram que a presença desses componentes estimulam a germinação de esporos, visto que nos tratamentos 8 e 16 (ausência completa) não ocorreu germinação. Também, pode-se observar que a ação isolada de cada componente adicionado não foi efetiva para o caso do ácido abiético (tratamento 4 e 12) e da planta hospedeira (tratamentos 7 e 15), ou foi pouco efetiva para o caso do carvão ativado que mostrou a ocorrência de apenas três colônias no tratamento 14. A maior estimulação na germinação dos esporos foi observada no tratamento 9, onde se puderam obter 32 colônias (62% do número total de colônias da população B). Estes fatos mostram que a contribuição decorrente da adição do ácido abiético e carvão ativado somente é evidenciada na presença da planta hospedeira, indicando uma ação sinergística destes componentes. Tal ação também induziu a germinação dos esporos provenientes da população A, onde o tratamento 1 evidenciou que a interação entre estes componentes foi a responsável pela obtenção de 75% do total de colônias produzidas na referida população.

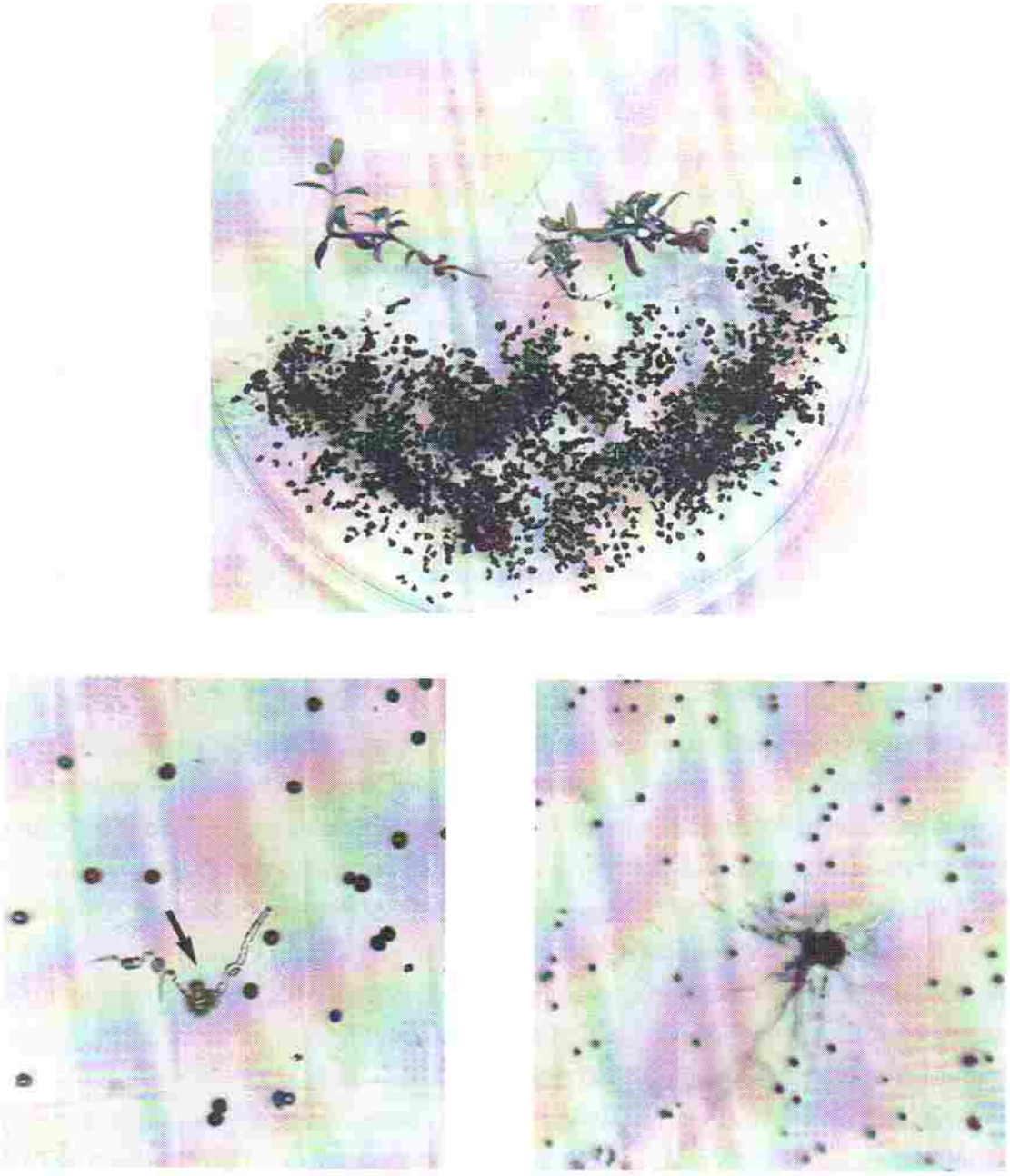

FIGURA 1 - Produção de culturas monocarióticas de *Pisolithus tinctorius* "in vitro". 1A. Tratamento 1: Meio sólido MNM adicionado com ácido abiético, carvão ativado e planta hospedeira (*Eucalyptus camaldulensis*). 1B. Conjunto de esporos não germinados e germinados, apresentando jovem micélio aumentado em 200X (seta). 1C. Culturas em fase de repicagem para o meio sólido MNM (aumento de 100X).

O maior estímulo à germinação de esporos observado nos tratamentos que tiveram a planta hospedeira como componente indutor, também pode estar associado aos exsudados liberados pelas raízes, que são considerados como um meio nutritivo completo que contém açúcares, sais minerais, vitaminas B e aminoácidos (Wong e Fortin, 1990). A identificação do ácido abiético, liberado por *Pinus sylvestris*, como um agente estimulador da germinação de esporos de várias espécies de fungos ectomicorrízicos foi feita por Fries *et al.* (1987). Posteriormente, Kope e Fortin (1990), mostraram a eficiência da adição deste ácido, no meio sólido de Fries (1983), na germinação de esporos de *P. tinctorius*. A melhoria decorrente da adição do carvão ativado é devido ao fato deste produto ter a capacidade de remover compostos inibidores presentes no meio de cultura, beneficiando tanto a planta hospedeira quanto o fungo (Fries, 1978).

3.2. Identificação dos grupos de compatibilidade sexual e da esterilidade intra e interpopulacional

As Figuras 2B e 2C mostram o estado vegetativo monocariótico e o dicariótico respectivamente, os quais podem ser microscopicamente distinguidos pela presença de grampos de conexão celular existentes na maioria dos septos dicarióticos. O primeiro estado refere-se ao micélio primário que se desenvolve a partir da germinação de um único esporo. Em *P. tinctorius*, as culturas neste estado desenvolvem pouca ou nenhuma ectomicorriza (Lamhamedi *et al.* 1990, Rosado, 1993). O segundo estado refere-se ao micélio secundário, que é o mais comum na natureza, capaz de frutificar e formar ectomicorrizas em quantidade variável, conforme o tipo de cruzamentos entre os progenitores monocarióticos compatíveis (Rosado *et al.* 1994). Os eventos morfogenéticos decorrentes da compatibilidade ou esterilidade genética entre progenitores encontram-se relatados em Casselton e Economou (1985).

O Quadro 3 mostra os resultados obtidos pelos cruzamentos entre nove colônias monocarióticas, sendo duas provenientes da germinação de esporos da população A (MAi, i=1,2) e sete provenientes da germinação de esporos da população B (MBi, i=2,3,4,5,7,9,10). Os resultados dos cruzamentos dentro do grupo MBi (quadrado delimitado por linhas mais espessas) mostram a compatibilidade e esterilidade sexual intrapopulacional no referido grupo e os resultados do cruzamento entre os grupos MAi e MBi evidenciam a compatibilidade e esterilidade sexual interpopulacional.

Pode-se observar que as duas culturas monocarióticas da população A são compatíveis com todas as sete culturas da população B, indicando que os genes reguladores da compatibilidade sexual se apresentam com alelos diferentes (Quadro 3). Os respectivos alelos dos genes A e B na população A não estão especificados no quadro 3, pois estes podem estar em qualquer uma das seguintes formas: A_3B_3, A_3B_4, A_4B_3 ou A_4B_4. Para determinar estas formas com precisão seria necessário um conjunto maior de culturas tal como ocorreu para a população B. A compatibilidade existente entre as duas populações estudadas indica que elas pertencem à mesma espécie biológica, e que é possível a obtenção de híbridos interespecíficos para serem avaliados em programas de melhoramento genético de fungos ectomicorrízicos. Em *Pisolithus*, a ocorrência de espécies biológicas distintas pode ser constatada pela esterilidade entre populações distintas, tal como foi demostrado por Kope e Fortin (1990) quando cruzaram culturas monocarióticas procedentes da Austrália, África do Sul e USA e observaram que a fase dicariótica não foi estabelecida.

O Quadro 3, também mostra que o sistema de compatibilidade na população B é do tipo tetrapolar, concordando com os resultados apresentados por Kope e Fortin (1990) e Rosado *et al.* (1994). Tal fato, associado aos resultados de estudos que, também, evidenciaram a compatibilidade sexual tetrapolar em outros fungos ectomicorrízicos, tais como *Hebeloma cylindrosporum*, *Suillus bovinus*, *S. granulatus*, *S. luteus*, *Laccaria bicolor*, *L. laccata* e *L. proxima* (Fries e Mueller, 1984; Gay e Debaud, 1987; Kropp e Fortin, 1988; Kope e Fortin, 1990; Fries e Neumann, 1990; Fries e Sun, 1992; De la Bastide, *et al.*, 1995a), fortalece a hipótese de que os fungos ectomicorrízicos possuem o sistema de compatibilidade sexual tetrapolar.

QUADRO 3 - Compatibilidade e esterilidade sexual intra e interpopulacional em culturas monocarióticas de *Pisolithus tinctorius*.

Cultura	MA1	MA2	MB2	MB3	MB4	MB5	MB7	MB9	MB10	Genes de Compatib.
MA1	Ø	-	+	+	+	+	+	+	+	
MA2		Ø	+	+	+	+	+	+	+	
MB2			Ø	+	-*	-**	-**	-**	+	A_2B_2
MB3				Ø	+(?)	-*	-*	-*	-***	A_1B_1
MB4					Ø	+	+	+	+(?)	A_2B_1
MB5						Ø	-***	-***	-*	A_1B_2
MB7							Ø	-***	-*	A_1B_2
MB9								Ø	-*	A_1B_2
MB10									Ø	A_1B_1
Genes de compatib.			A_2B_2	A_1B_1	A_2B_1	A_1B_2	A_1B_2	A_1B_2	A_1B_1	

(+) Cruzamento compatível - Micélio dicariótico - com alelos dos genes A e B não comuns; (+?) Cruzamento compatível; (?) - Micélio dicariótico necessita ser cofirmado por microscopia de fluorescência; (-*) Cruzamento estéril - com alelos do gene A comuns; (-**) Cruzamento estéril - com alelos do gene B comuns; (-***) Cruzamento estéril - com alelos dos genes A e B comuns e (Ø) Autocruzamentos - não realizados.

A formação da fase dicariótica quando se cruzou as culturas MB4 x MB3 e MB4 x MB10 necessita ser reavaliada, utilizando a microscopia de fluorescência para detectar a presença de dois núcleos no interior das hifas. Em *P. tinctorius* não existem relatos de que o estado dicariótico possa ser estabelecido quando um dos alelos, para qualquer um dos genes de compatibilidade, seja idêntico. Em basidiomicetos superiores é comum observar a formação dos grampos de conexão celular e a divisão nuclear quando os alelos do gene B são comuns, porém a migração do núcleo é interrompida pois esses grampos não se fundem (Casselton e Economou, 1985). Se a formação da fase dicariótica não for constatada pela microscopia de fluorescência, ficará demonstrado que em *P. tinctorius* há formação de falsos grampos de conexão, e caso esta seja constatada, haverá a indicação de que a cultura MB4 não é pura, ou seja, ela é constituída por micélios monocarióticos distintos e incompatíveis, cujos genes de compatibilidade sexual são A_2B_2 e A_2B_1, e não somente A_2B_1 como foi indicado no Quadro 3.

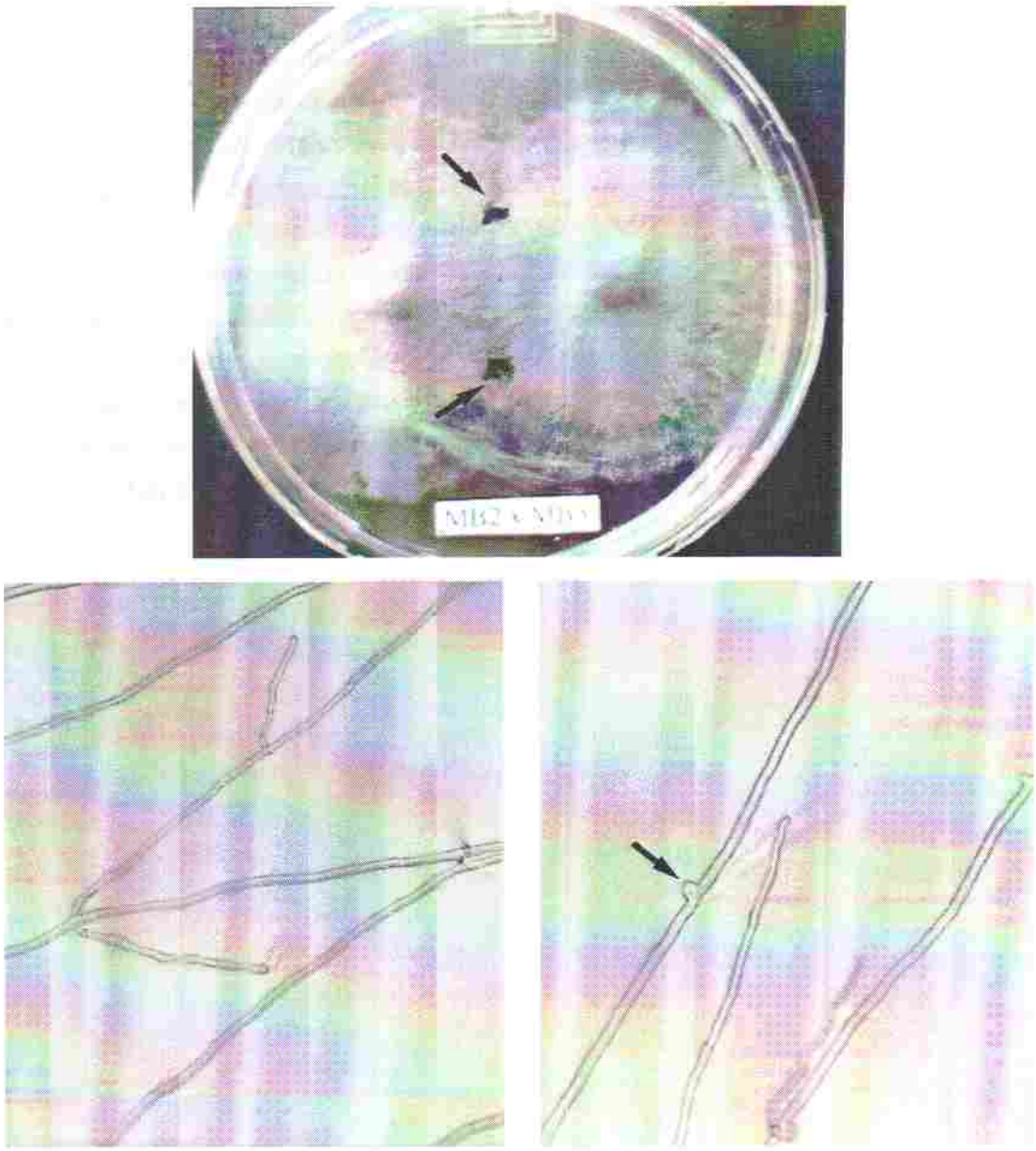

FIGURA 2 - Cruzamentos controlados entre culturas monocarióticas de *Pisolithus tinctorius* "in vitro". 2A. Pareamento entre duas culturas monocarióticas compatíveis, evidenciando a interface e os pontos de amostragem (setas). 2B. Micélio de cultura em estado monocariótico crescendo em meio sólido MNM (aumento de 200X). 2C. Crescimento micelial de cultura em estado dicariótico em meio sólido MMN e evidência de grampos de conexão aumentados em 200X (seta).

4 CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que culturas monocarióticas de *P. tinctorius* podem ser obtidas pela germinação "in vitro" de esporos, estimulada pela adição dos componentes ativadores: tais como planta hospedeira (*E. camaldulensis*), ácido abiético (100 $mg.l^{-1}$) e carvão ativado (0,3 g/placa de Petri). Melhores resultados podem ser obtidos pela adição simultânea desses componentes, pois existe uma ação sinergística entre eles.

As duas populações fúngicas estudadas possuem grupos de compatibilidade sexual tetrapolar, constituídos por dois genes e cada um com dois alelos. Tal fato permite a reconstituição de progênies dicarióticas provenientes de cruzamentos "in vitro" de culturas do grupos compatíveis A_1B_1 x A_2B_2 e A_1B_2 x A_2B_1.

Existe compatibilidade sexual entre as duas populações estudadas, revelando que elas pertencem à mesma espécie biológica, e que é possível a obtenção de híbridos interespecíficos para serem testados em programas de melhoramento genético do fungo ectomicorrízico *P. tinctorius*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BULMER, G. S. Spore germination of forty-two species of puffballs. **Mycology**, New York, v.56, p.630-632, 1964.

CASSELTON, L; ECONOMOU, A. Dikaryon formation. In: MOORE, D.; CASSELTON, L.; WOOD, D. A; FRANKLAND, J. C. (eds.). **Development biology of higher fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 1985. p.213-229.

DE LA BASTIDE, P; KROPP, B. R; PICHÉ, Y. Spatial distribution and temporal persistence of discrete genotypes of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) Orton. **New Phytologist**, Cambridge, v.127, n.3, p.547-556, July, 1994.

DE LA BASTIDE, P; KROPP, B. R; PICHÉ, Y. Mecanisms for the development of genetically variable mycorrhizal mycelia in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.10, p.3609-3616, 1995a.

DE LA BASTIDE, P; KROPP, B. R; PICHÉ, Y. Population structure and mycelial phenotypic variability of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* (Maire) Orton. **Mycorrhiza**, Berlim, v.5, p.371-379, 1995b.

FRIES, N. Basidiospore germination in some mycorrhiza-forming Hymenomycetes. **Transactions of the British Mycology Society**, London, v.70, n.3, p.319-324, Junho, 1978.

FRIES, N. Spore germination, homing reaction and interstility groups in *Laccaria laccata* (Agaricales). **Mycologia,** New York, v.75, n.2, p.221-227, Mar./Apr., 1983.

FRIES, N. Spore germination in higher basidiomycetes. **Proceeding of the Indian Academic Sciences, Plant Sciences**, Limerick, v.93, p.205-222, 1984.

FRIES, N; MUELLER, G. M. Incompatibility systems, cultural features and species circumscriptions in the ectomycorrhizal genus *Laccaria* (Agaricales). **Mycologia**, New York, n.4, v.76, p.633-642, July/Aug., 1984.

FRIES, M; NEUMANN, W. Sexual incompatibility in *Suillus luteus* and *S. granulatus*. **Mycological Research**, Cambridge, v.94, p.64-70, 1990.

FRIES, N; SERCK-HANSSEN, K; HŠLL DIMBERG, L; THEANDER, O. Abietic acid, an activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (Boletaceae). **Experimental Mycology**, Orlando, v.11, p.360-363, 1987.

FRIES, M; SUN, P. The mating system of *Suillus bovinus*. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, p. 237-238, 1992.

GARBAYE, J. Premiers resultats de recherches sur la competitivité des champignons ectomicorhiziens. **Plant and Soil** , The Hague, v.71, p.303-308, 1983.

GAY, G; DEBAUD, J. C. Genetic study on indole-3-acetic acid production by ectomycorrhizal *Hebeloma* species: Inter- and intraspecific variability in homo- and dikaryotic mycelia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v.26, p.141-146, 1987.

KOPE, H. H; FORTIN, J. A. Germination and comparative morphology of basidiospores of *Pisolithus arhizus*. **Mycologia**, London, v.82, p.350-357, 1990.

KOPE, H. H; TSANTRIZOS, Y.S; FORTIN, J. A; OGILVIE, K. K. *p*-Hydroxybenzoylformic acid and (R)-(–)-*p*-hydroxymandelic acid, two antifungal compounds isolated from liquid culture of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus arhizus*. **Canadian Journal of Microbiology**, Otawa, v.37, n.4, p.258-264, Apr., 1991.

KROPP, B. R; FORTIN, J. A. The incompatibility system and relative ectomycorrhizal performance of monokaryons and reconstituted dikaryons of *Laccaria bicolor*. **Canadian Journal of Botany**, Otawa, v.66, n.2, p.289-294, Feb., 1988.

LAMBS, R. J; RICHARDS, B. N. Survival potencial of sexual and asexual spores of ectomycorrhizal fungi. **Transaction of British Mycological Conference**, London, v.62, n.1, p.181-191, Feb., 1974.

LAMHAMEDI, M. S; FORTIN, J. A. Genetic variation of ectomycorrhizal fungi: extramatrical phase of *Pisolithus* sp. **Canadian Journal of Botany**, Otawa, v.69, n.9, p.1927-1934, setembro, 1991.

LAMHAMEDI, M. S; FORTIN, J. A; KOPE, H. H; KROPP, B. R. Genetic variation in ectomycorrhiza formation by *Pisolithus arhizus* on *Pinus pinaster* and *Pinus banksiana*. **New Phytologist**, Cambridge, v.115, n.3, p.689-697, July, 1990.

MARX, D. H. **Forest Application of the Ectomycorrhizal Fungus Pisolithus tinctorius**. Stockholm: The Marcus Wallenberg Prize, 1991.

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

MARX, D. H. Tree host range and world distribution of ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Canadian Journal of Microbiology**, Otawa, v.23, n.3, p.217-223, Mar., 1977.

ROSADO, S. C. S. Variations génétiques chez la symbiose ectomicorhizienne *Pinus elliottii* - *Pisolithus tinctorius*. Québec, Canada : Université Laval , 1993. 86p. (Tese de Doutorado em Ciências Florestais).

ROSADO, S. C. S; KROPP, B. R; PICHÉ. Genetics of ectomycorrhizal symbiosis. II. Fungal variability and heritability of ectomycorrhizal traits. **New Phytologist**, Cambridge, v.126, n.1, p.111-117, Jan., 1994.

SKINNER, M. F; BOWEN, J. A. The penetration of soil by mycelial strands of ectomycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry** , Elmsford, v.6, p.437-457, 1974a.

SKINNER, M. F; BOWEN, J. A. The uptake and translocation of phosphate by mycelial strands of pine mycorrhizas. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.6 , p.53-56, 1974b.

WONG, K. K. Y; FORTIN, A. F. A Petri dish technique for the asseptic synthesis of ectomycorrhizae. **Canadian Journal of Botany**, Otawa, v. 67, n.6, p.1713-1716, June, 1989.

ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied Forest Tree Improvement**. New York: John Wiley & Sons, 1984. 502p.