

ASSOCIAÇÃO ECTOMICORRÍZICA DE
Pisolithus tinctorius (PERS.) COKER E COUCH
COM ESPÉCIES DE *Eucalyptus* L'HÉRITIER.

NILSE KASUE SHIMURA YOKOMIZO

Orientador: TASSO LEO KRÜGNER

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz" da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Fitopatologia.

Estado de São Paulo Brasil
dezembro - 1981

Aos meus pais

MEU RECONHECIMENTO

A G R A D E C I M E N T O S

A autora expressa seus agradecimentos:

- ao Professor Dr. TASSO LEO KRÜGNER, pela efetiva orientação;
- ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsas de estudo;
- ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo;
- ao Instituto Florestal da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, pelas facilidades e acesso às Estações Experimentais de Itapetininga, Itirapina e Mogi Mirim;
- ao Instituto de Pesquisas Florestais, na pessoa do Eng^o Florestal JOSÉ MARIA DE ARRUDA MENDES FILHO, pela colaboração;
- à Rigesa Celulose, Papel e Embalagens Ltda, pelo acesso à floresta de Três Barras - SC;
- à Eng.^a Agrônoma MARINÉIA DE LARA HADDAD, pelo auxílio na elaboração das análises estatísticas;
- aos companheiros da Seção de Fitotecnia Parasitológica do Instituto Florestal pela valiosa colaboração;

aos Engenheiros Agrônomos ELISA SIDENÊA FOSCO MUCCI, NILTON LUIZ DE SOUZA, OCTÁVIO DO AMARAL GURGEL FILHO e ROSA MARIA VALDEBENITO, pelo apoio, estímulo e amizade.

I N D I C E

	Pág.
RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Micorrizas em espécies de <i>Eucalyptus</i>	4
2.1.1. Associações com fungos simbiotes em geral.	4
2.1.2. <i>Pisolithus tinctorius</i> como fungo simbiote.	8
2.2. Obtenção de micorrizas em <i>Eucalyptus</i> sp através de inoculação artificial com os fungos simbiotes....	10
2.2.1. Inóculo vegetativo.....	10
2.2.2. Esporos.....	12
2.2.3. Solo naturalmente infestado.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Ocorrência natural de <i>Pisolithus tinctorius</i> e ecto- micorrizas em espécies de <i>Eucalyptus</i>	14
3.1.1. Basidiocarpos.....	14
3.1.2. Micorrizas.....	16
3.1.3. Isolamento em meio de cultura.....	16
3.2. Infestação artificial do solo com <i>Pisolithus tinc-</i> <i>torius</i> isolado de eucalipto e seu efeito em mudas de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> e <i>Eucalyptus ci-</i> <i>triadora</i>	17
3.2.1. Ensaio com basidiosporos.....	18
3.2.2. Ensaio com inóculo vegetativo.....	20
3.3. Comparação entre os efeitos de isolados de <i>Pisoli-</i> <i>thus tinctorius</i> , obtidos de pinus e eucalipto, em	

	Pág.
mudas de <i>Pinus taeda</i> e <i>Eucalyptus saligna</i>	21
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Ocorrência natural de <i>Pisolithus tinctorius</i> e ecto- micorrizas em espécies de <i>Eucalyptus</i>	24
4.1.1. Basidiocarpos.....	24
4.1.2. Micorrizas.....	27
4.1.3. Isolamento em meio de cultura.....	31
4.2. Infestação artificial do solo com <i>Pisolithus tinctorius</i> isolado de eucalipto e seu efeito em mudas de <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> e <i>Eucalyptus citriodora</i>	34
4.3. Comparação entre os efeitos de isolados de <i>Pisolithus tinctorius</i> , obtidos de pinus e eucalipto, em mudas de <i>Pinus taeda</i> e <i>Eucalyptus saligna</i>	37
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÕES.....	47
LITERATURA CITADA.....	49

RESUMO

ASSOCIAÇÃO ECTOMICORRIZICA DE *Pisolithus tinctorius* (PERS.)
COKER E COUCH COM ESPÉCIES DE *Eucalyptus* L'HÉRITIER

Nilse Kasue Shimura Yokomizo

Orientador : Tasso Leo KÜgner

Caracterizou-se a frequência, forma e os componentes estruturais de basidiocarpos de ocorrência natural de *Pisolithus tinctorius*, provenientes de povoamentos de *Eucalyptus citriodora*, *E. grandis*, *E. saligna* e *E. viminalis*, das localidades de Itapetininga - SP, Itirapina - SP, Mogi Mirim - SP e Três Barras - SC.

As micorrizas observadas nessas espécies apresentaram uma organização estrutural uniforme, coloração amarela, morfologia do tipo piramidal aberto ou ramiforme, sendo tipicamente ectotrófica, com manta de espessura variável (11,5 - 92,0 μ m) mas homogênea do tipo sinênquima. A rede de Hartig apresentava penetração intercelular das hifas do fungo até próxima às células da endoderme.

O método de isolamento de *P. tinctorius* a partir de peridíolos, utilizando meio modificado de Melin e Norkrans (MMN), mostrou-se eficiente, com obtenção de 75% de culturas do total dos peridíolos implantados. O mesmo não ocorreu para o método de isolamento do fungo micorrizico a partir da manta das micorrizas, que apresentou apenas 0,6% de culturas. A com-

paração de culturas obtidas em ambos os isolamentos permitiram a identificação do fungo micorrízico como *P. tinctorius*.

Os isolados de *P. tinctorius* de talhões de *Eucalyptus*, comparados com o mesmo fungo de procedência de *Pinus taeda* norte americano, apresentaram diferenças em vigor e coloração. Em condições de casa de vegetação, através da infestação do solo com inóculo vegetativo de ambos os isolados, avaliou-se as respectivas capacidades de formação de micorrizas em mudas de *Eucalyptus saligna* e *Pinus taeda*. As micorrizas de *P. tinctorius* foram detectadas unicamente em *P. taeda*, que cresciam em solo infestado com *P. tinctorius* isolado de pinus, demonstrando a especificidade deste isolado para com o hospedeiro de origem.

Basidiosporos e inóculo vegetativo, obtidos a partir de basidiocarpos de *P. tinctorius* de eucalipto foram utilizados na infestação do substrato de mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Eucalyptus citriodora*, não sendo detectados efeitos desta infestação nas características de associação do fungo na forma de micorrizas, altura da copa e peso seco total das mudas.

SUMMARY

ECTOMYCORRHIZAL ASSOCIATION OF *Pisolithus tinctorius*
(PERS.) COKER & COUCH WITH *Eucalyptus* L'HÉRITIER SPECIES

Nilse Kasue Shimura Yokomizo

Adviser : Tasso Leo Krüger

Basidiocarps of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch formed naturally in association with *Eucalyptus citriodora*, *E. grandis*, *E. saligna* and *E. viminalis* were examined and described with respect to their frequency, form and structural components.

The mycorrhizae observed on these species of *Eucalyptus* showed only one type of structural organization, yellow colour, and open pyramidal or ramiform type of morphology, being typically ectotrophic. The hyphal mantle was variable in thickness (11,5 - 92,0 μm) and of the synenchyma type. The Hartig net presented intercellular hyphal growth to near the endoderm.

The isolation technique of *P. tinctorius* from peridioles, using the modified Melin Norkrans medium (MMN), was efficient, 75% of the peridioles placed in agar yielding *P. tinctorius* cultures. Recoverage of this fungus from mycorrhizae was very low (0,6%). Comparasion between basidiocarps and mycorrhizae isolates demonstrated that the mycorrhizae were formed by *P. tinctorius*.

P. tinctorius isolate from eucalypt differed from the isolate from pine in vigour and colour. Under greenhouse conditions, through artificial infestation of the soil, the eucalypt isolate did not form mycorrhizae with *Eucalyptus saligna*, as well as with *Pinus taeda*. The pine isolate form mycorrhizae only with *P. taeda*, demonstrating the specificity of *P. tinctorius* with respect to its capacity of forming mycorrhizae with different host genera.

Basidiospores and vegetative pure culture inoculum obtained from basidiocarps of eucalypt *P. tinctorius* were also used to infested the soil substrate for growth of *Pinus elliottii* var. *elliottii* and *Eucalyptus citriodora* seedlings. There was no formation of mycorrhizae on the seedlings of both genera. Differences in growth of the seedlings were also not observed between inoculated and no inoculated treatments.

1. INTRODUÇÃO

A maioria das frutificações de fungos, comumente encontradas na superfície de solos de matas e florestas, mantêm com as árvores, alguma forma de associação. Segundo HACSKAYLO (1972) estas frutificações, em sua maioria, resultam de associações na forma de micorrizas e se originam de um extensivo sistema de hifas que se ramificam no solo e são ligados às raízes das árvores.

Esta conexão com as raízes são determinadas por uma característica específica da árvore e do fungo, que permite a penetração das hifas do fungo nas raízes das árvores. Esta condição de especificidade entre a árvore e o fungo é que explica a afinidade de certos fungos com determinadas espécies de árvores.

Nas condições brasileiras, a presença constante de basidiocarpos com características de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch em talhões de diversas espécies de *Eucalyptus*, aliada à reconhecida capacidade de *P. tinctorius*

em associar-se na forma de micorrizas com diversos gêneros florestais, conforme a revisão de MARX (1977), sugere a existência de uma associação micorrizica entre ambos.

Além das frutificações do fungo, o sistema radicular do eucalipto, nestes talhões, apresentam formações com aspecto visual de micorrizas, que reforçam os indícios da existência desta forma de associação.

Baseado nestas considerações, o presente trabalho tem como objetivos:

- a) o conhecimento das estruturas que compõem o basidiocarpo do fungo e sua identificação;
- b) o conhecimento da morfologia e anatomia das micorrizas do eucalipto;
- c) a identificação do fungo simbiote na associação micorrizica em eucalipto;
- d) o estudo comparativo das características de *Pisolithus tinctorius* isolados de pinus e de eucalipto;
- e) a verificação através de inoculação cruzada, da especificidade dos isolados obtidos de pinus e eucalipto na formação de micorrizas e
- f) a avaliação dos efeitos da infestação do solo com *P. tinctorius*, isolado de eucalipto, na formação de mi-

corrizas e crescimento de mudas de pinus e eucalipto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Micorrizas em espécies de *Eucalyptus*

2.1.1. Associações com fungos simbiotes em geral

Muitos fungos se associam ao sistema radicular do eucalipto na forma de micorrizas. Samuel, citado por PRYOR (1956b), detectou micorrizas ectotróficas em *E. rubida*, sem contudo identificar o fungo simbiote.

A dependência por micorrizas em algumas espécies de eucalipto foi demonstrada por PRYOR (1956a,b), que inoculou esporos de *Scleroderma flavidum* em solo esterilizado. No solo inoculado, *E. dives*, *E. pauciflora* e *E. macrorrhyncha*, todas pertencentes ao grupo *Renantherae* apresentaram crescimento vigoroso e desenvolvimento de micorrizas em suas raízes. As mudas do solo não inoculado mostraram-se cloróticas, pouco vigorosas e com total ausência de micorrizas. Nas mesmas condições, *E. bicostata*, pertencente ao grupo *Macrantherae*, não respondeu a inoculação, apresentando crescimento vigoroso e total ausên-

cia de micorrizas. Ficou provado desta maneira, que a dependência por micorrizas e sua formação não são generalizadas, dentro do gênero *Eucalyptus*.

Na Índia, a incidência de micorrizas em eucalipto foi estudada por BAKSHI (1966) que encontrou frutificações de *Scleroderma verrugosum*, conectados a raízes de *E. deglupta*, *E. camaldulensis*, *E. torelliana*, *E. rudis*, *E. grandis*, *E. punctata*, *E. kirtoniana*, *E. tereticornis*, *E. odorata*, *E. paniculata*, *E. robusta*, *E. gomphocephala*. *E. citriodora* e numa forma híbrida de *Eucalyptus*. As raízes apresentavam micorrizas ectotrôficas, porêm sua presença não estava associada a um crescimento vigoroso das plantas. *E. odorata* e *E. gomphocephala* apresentavam falhas, cuja mortalidade, não pode portanto, ser atribuída a ausência de micorrizas.

Em outro levantamento, no sul da Índia, realizado por SINGH e KUMAR (1966), durante a estação seca, quando o desenvolvimento das micorrizas é mais escasso, foram detectadas micorrizas em *E. grandis*, *E. citriodora* e numa forma híbrida de *Eucalyptus*, provavelmente *E. tereticornis*. A nota interessante foi a incidência maior de micorrizas em solos pobres que não sofreram tratamentos complementares com fertilizantes.

ANDERSON (1965) detectou na Itália central 8 tipos distintos de micorrizas em *E. grandis* e 4 tipos em *E. globulus* e *E. camaldulensis*. Observou também uma reduzida especi-

ficidade dos hospedeiros quanto aos fungos simbiotes. Estes não foram identificados, mas o autor associou algumas das micorrizas de *E. grandis* a *Cenococcum graniforme*, *Boletus edulis*, *Tricholoma tigrinum*, *Amanita phalloides* e *Lepiota procera*.

Devido as variações detectadas nas estruturas de micorrizas nas espécies de eucalipto igualmente observadas por BAKSHI (1966), THAPAR *et alii* (1967), na Índia, classificou-as em dois tipos distintos, conforme a coloração e distribuição das hifas da superfície externa da micorriza. O autor distinguiu ainda 4 fungos simbiotes, *Scleroderma verrugosum*, *S. cepa* e mais dois fungos não identificados.

Outra classificação foi dada por ANDERSON (1968), que observando mudas de eucalipto de 17 espécies, dividiu as micorrizas em 4 formas distintas. As espécies nas quais observou a presença de micorriza foram: *E. blakelyi*, *E. bicostata*, *E. bridgesiana*, *E. camaldulensis*, *E. camphora*, *E. cinerea*, *E. globulus*, *E. goniocalyx*, *E. leucoxyton*, *E. macarthuri*, *E. ovata*, *E. polyanthemus*, *E. populifolia*, *E. rubida*, *E. sideroxyton*, *E. x-trabutii* e *E. viminalis*.

No entanto a classificação mais aceita tem sido a de CHILVERS (1968) que caracterizou as micorrizas de eucalipto em 8 tipos distintos, de acordo com a estrutura da mancha, característica das hifas e organização das rizomorfias as-

sociadas.

Não obstante às inúmeras tentativas de classificação dos diversos tipos micorrízicos, experimentos conduzidos por CHILVERS (1973), mostraram não haver nenhuma correlação aparente entre os grupos taxonômicos de *Eucalyptus* e o tipo de formação micorrízica. O autor concluiu também que as condições do solo desempenham importante função na determinação do tipo de flora micorrízica que se desenvolve.

Outro fator que determina o tipo de micorriza foi observado por ASHTON (1976) em algumas micorrizas de *E. regnans*, cuja forma se alterava com a idade do fungo. *Hysterangium inflatum* durante o inverno desenvolvia uma micorriza branca, racemosa, que se transformava em marrom escuro quando havia formação de corpos de frutificação e parte do micélio morria.

Além de *Hysterangium inflatum*, ASHTON (1976) observou associações micorrízicas de *E. regnans* com *Amanita grisea*, *Cenococcum graniforme*, *Clavaria formosa*, *Clitocybe australiana*, *Cortinarius austrovenetus*, *C. flagilipes*, *C. ochraceus*, *C. purpurascens*, *C. radicans*, *C. subcinnamomeus*, *Flammula eucalyptorum*, *Gymnoglossum violaceum*, *Hebeloma mesophaeum*, *Hygrophorus coccineus*, *Hypholoma fasciculare*, *Inocybe granulipes*, *I. olivaceo-fulvus*, *Mesophellia arenaria*, *Psal-liota xanthoderma*, *Tricholoma coarctata*, *Russula purpureo-flava* e *Hydnum repandum*, sendo as duas últimas do tipo ecten

dotrôfico e as demais ectotrôficas. Crescimento micelial limitado apenas a superfície da raiz foi também observado pelo autor.

CHILVERS (1973) observou a presença de micorrizas em *Eucalyptus bridgesiana*, *E. dalrympleana*, *E. delegatensis*, *E. dives*, *E. fastigata*, *E. leucoxydon*, *E. macrorrhyncha*, *E. maculata*, *E. mannifera*, *E. polyanthemos*, *E. pauciflora*, *E. radiata*, *E. sieberi*, *E. st-johnii*, identificando alguns dos fungos micorrízicos encontrados como *Pisolithus tinctorius*, *Cenococcum graniforme* e duas espécies não identificadas, porém distintas de *Boletus*.

2.1.2. *Pisolithus tinctorius* como fungo simbiote

O primeiro registro de ocorrência de micorrizas em *Eucalyptus* sp, coincide com a constatação pioneira de *Pisolithus tinctorius* no gênero. Conforme citado por MULLETTE (1976), P.A. van der Bijl, em 1917, observou a associação de *Polysaccum crassipes* (sin. *Pisolithus tinctorius*) em plantações de eucalipto na África do Sul.

De acordo com COKER e COUCH (1928), *Pisolithus arenarius*, *Polysaccum crassipes* e *Polysaccum pisocarpium* são classificações sinônimas de *Pisolithus tinctorius*. MARX (1977) constatou ainda, a existência de 60 denominações genéricas diferentes para este fungo.

SMITH e POPE (1934) observaram também na África

do Sul, a ocorrência de micorrizas endotróficas em eucalipto associado a *Polysaccum crassipes*. TRAPPE (1962) em listagem de fungos associados a micorrizas ectotróficas, assinala *Pisolithus tinctorius* como simbionte em micorrizas de *Eucalyptus* spp.

Neumann, citado por GIBSON (1975), em 1959 refere-se a um possível efeito benéfico da inoculação de *P. tinctorius* em *E. camaldulensis* introduzidos em Israel. Na mesma obra, GIBSON (1975) cita um trabalho anônimo realizado em 1964, na África do Sul, onde o autor não observou nenhum incremento em *E. grandis* inoculado com *P. tinctorius*.

CHILVERS (1973), inoculando culturas puras do micélio de *P. tinctorius* em eucalipto, obteve micorrizas associadas ao sistema radicular de *E. maculata*, *E. fastigata*, *E. sieberi*, *E. radiata*, *E. bridgesiana*, *E. st-johnii*, *E. dalrympleana*, *E. polyanthemus* e *E. leucooxylon*, sugerindo a inexistência de especificidade do fungo com relação ao hospedeiro dentro do gênero *Eucalyptus*, mas aventando a possibilidade de existência de mais de um "strain" específico com relação ao gênero do hospedeiro.

Também através de inoculações experimentais, MULLETTE (1976) obteve a associação na forma de micorrizas entre *P. tinctorius* e *E. gummiifera*.

Além destas constatações, a revisão de MARX (1977), assinala ainda a presença de *P. tinctorius* em *E. grandis*, *E. robusta*, *E. microcorys* e em mais 10 espécies, em vá-

rios países, inclusive no Brasil.

BARROS *et alii* (1978) citam *Pisolithus* spp e *Scleroderma* spp, como os gêneros que formam micorrizas em espécies de eucalipto e mais comumente encontrados no centro-leste e leste brasileiro.

Ainda no Brasil, IMAÑA e PRADO JUNIOR (1979), inoculando *P. tinctorius* na forma de esporos, micélio e água de lavagem fúngica em solo de mudas de *E. grandis*, não caracterizaram a micorriza, mas sugeriram a possibilidade de formação de micorriza endotrôfica.

KRÜGNER e TOMAZELLO FILHO (1979) referem-se à possibilidade de existência de duas estirpes de *P. tinctorius*, uma específica para *Pinus* e outra específica para *Eucalyptus*, indicando ainda sua ocorrência natural, nas condições brasileiras, apenas em plantações de eucalipto. Esta ocorrência restrita ao eucalipto, é reafirmada por TOMAZELLO FILHO (1980).

2.2. Obtenção de micorrizas em eucalipto através de inoculação artificial com os fungos simbiotes

2.2.1. Inóculo vegetativo

SMITH e POPE (1934) utilizando meio de cultura contendo decocção de raízes de eucalipto, isolaram *Polysaccum crassipes* (sin. *Pisolithus tinctorius*). Utilizando as cultu -

ras puras do micélio do fungo, em experimentos de inoculação, os autores não encontraram resultados promissores, justificando a ausência de micorrizas devido ao crescimento pouco vigoroso do fungo em meio de cultura.

Na tentativa de isolar fungos micorrízicos a partir de frutificações de fungos encontrados em povoamentos de eucaliptos, CHILVERS (1973) obteve poucos resultados. Apenas duas espécies não identificadas de *Boletus* e *Pisolithus tinctorius* formaram micorrizas após infestações artificiais com inoculo vegetativo. *P. tinctorius* foi especialmente versátil na formação de micorrizas com *Eucalyptus maculata*, *E. fastigata*, *E. sieberi*, *E. radiata*, *E. bridgesiana*, *E. st-johnii*, *E. dalyrypleana*, *E. polyanthemos* e *E. leucoxydon*. Uma das espécies de *Boletus* formava micorriza com *E. st-johnii* e *E. sieberi* e outra apenas com *E. st-johnii*. Com respeito a intensidade e persistência de micorrizas, também *P. tinctorius* mostrou-se mais abundante que *Boletus*, cujos recipientes se contaminavam após a formação das micorrizas.

O mesmo autor, em experimentos de inoculação cruzada, utilizando 4 fungos, *Pisolithus tinctorius* de eucalipto, *Suillus granulatus* de pinus, *Rhizopogon luteolus* de pinus e *Paxillus involutus* de populus, testou a especificidade dos mesmos em *Eucalyptus st-johnii* e *Pinus radiata*. *E. st-johnii* associou-se apenas com *P. tinctorius* e *P. radiata* com *S. granulatus* e *R. luteolus*, concluindo que existe especificidade, ao nível de gênero de hospedeiros, para alguns fungos se associarem na forma

de micorrizas.

ASHTON (1976) cultivando 20 basidiomicetos coletados de florestas de *E. regnans*, obteve seis culturas, das quais *Cortinarius ochraceus*, *C. radicans* e *Hypholoma fasciculare* produziam esporocarpos; *Psalliota xanthoderma* formava rudimentos de estipe e *Mesophellia arenaria* e *Clitocybe australiana* permaneciam na forma vegetativa. Todos esses fungos foram cultivados e inoculados em mudas de *E. regnans*, produzindo alguma forma de micorriza. Mudas inoculadas e não inoculadas apresentavam aspecto sadio, indicando que, pelo menos até este estágio, a condição micorrizica não era essencial para o desenvolvimento de *E. regnans*.

2.2.2. Esporos

A síntese de micorrizas através de inoculação artificial com esporos foi obtida por PRYOR (1956a,b) em *E. dives*, *E. pauciflora* e *E. macrorrhyncha*, com esporos de *Scleroderma flavidum*, demonstrando ainda que a presença do fungo era essencial para o desenvolvimento dessas espécies, pois em solo esterilizado não inoculado, as mudas apresentavam-se cloróticas e pouco vigorosas.

Esporos de corpos de frutificação de *Scleroderma verrucosum* foram utilizados por THAPAR *et alii* (1967) na inoculação de substrato de crescimento, previamente esterilizado de *E. grandis*. Cinco meses após a inoculação as mudas apresentavam micorrizas típicas e corpos de frutificação do fungo,

demonstrando que *S. verrucosum* é simbiote na micorriza de *E. grandis*.

MULLETTE (1976) desenvolveu com sucesso um método de síntese de micorrizas de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus gummiifera* através de inoculação de esporos do fungo em um aparato especialmente idealizado para estudos de controle nutricional do eucalipto.

2.2.3. Solo naturalmente infestado

Na tentativa de avaliar a especificidade da flora micorrizica quanto ao hospedeiro, REDDY e KHAN (1972) inocularam solos naturais coletados de talhões de *Pinus roxburghii*, *Eucalyptus* sp e *Shorea robusta* em mudas assepticamente desenvolvidas de *Pinus patula*, *P. banksiana*, *P. kesiya*, *P. roxburghii*, *Eucalyptus* sp e *Shorea robusta*. O solo coletado de talhões de eucalipto induziu a formação de micorrizas em *Eucalyptus* sp, *Pinus roxburghii*, *P. kesiya* e uma incidência muito baixa em *Pinus patula* e *P. banksiana*. Mudanças de *Eucalyptus* sp apresentaram micorrizas em solos de *Pinus roxburghii* e *Eucalyptus* sp.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Ocorrência natural de *Pisolithus tinctorius* e ectomicorizas em espécies de *Eucalyptus*.

3.1.1. Basidiocarpos

Basidiocarpos com características de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch, segundo Coker e Couch (1928), apresentando o perídio intacto, conforme recomendado por HILE e HENNEN (1969), foram coletados das regiões constantes na Tabela 1.

Foram mensuradas *in loco* as seguintes estruturas dos basidiocarpos: altura acima da superfície, altura total, diâmetro da frutificação e altura da estipe, se presentes.

Procurou-se descrever a forma do basidiocarpo e a coloração de suas estruturas, conforme MAERZ e REA PAUL (1950).

Basidiosporos que compõem a parte superior da gleba, foram coletados e mantidos em dessecador por um período

Tabela 1. Características das regiões de coleta de micorrizas e de basidiocarpos de *Pisolithus tinctorius*, e espécies de *Eucalyptus* associadas.

Região	Localização	Clima (Köppen)	Altitude (m)	Classificação do solo	Espécie associada	Idade do talhão (anos)
Itapetininga - SP	23°42' Lat. S, 47°57' Long. W. Gr.	Cfa	645	Podzólico Vermelho Amarelo - var. Laras	<i>E. grandis</i> Hill ex Maiden <i>E. saligna</i> Sm.	4
Itirapina - SP	22°15' Lat. S, 47°49' Long. W. Gr.	Cwa	760	Regossol	<i>E. citriodora</i> Hook	5
Mogi Mirim - SP	22°26' Lat. S, 46°57' Long. W. Gr.	Cwa	631	Latossol Vermelho Amarelo - fase arenosa	<i>E. grandis</i> Hill ex Maiden <i>E. citriodora</i> Hook	5 4
Três Barras - SC	26°10' Lat. S, 50°24' Long. W. Gr.	Cfb	900	Latossol Vermelho - fase Canoinhas	<i>E. viminalis</i> Labill	2

de dois meses, para secagem e homogeneização do teor de umidade nos esporos. Estes foram examinados em microscópio, a um aumento de até 1000x, em lâminas montadas com KOH a 5%, conforme a metodologia de GRAND (1976).

3.1.2. Micorrizas

As micorrizas foram coletadas através de sondagens no solo de plantios de *Eucalyptus* até uma profundidade de 0,5 m, junto ao sistema radicular das árvores. As espécies de eucalipto e regiões de coleta foram as mesmas referidas na Tabela 1.

As características macroscópicas das micorrizas foram observadas, em sua forma conforme CHILVERS (1968) e a coloração conforme MAERZ e REA PAUL (1950).

Micorrizas recém coletadas, foram lavadas em água corrente e em seguida em água destilada. Livres de impurezas, foram feitos cortes transversais e longitudinais em micrótomo de congelação, na espessura de 15 μ m. Os cortes foram montados em lâminas com lactofenol e suas principais características observadas sob microscópio, com auxílio de uma ocular micrométrica de 7,5x.

3.1.3. Isolamento em meio de cultura

O isolamento do fungo a partir de basidiocarpos foi obtido, retirando-se assepticamente os peridiólos do inte

rior da gleba, implantando-os em tubos com agar inclinado contendo meio modificado de Melin Norkrans (MMN), e incubados no escuro, a temperatura ambiente, que oscilou entre 22 a 28°C.

A composição do MMN foi extraída de MARX (1969), sendo constituída de 0,05 g de CaCl_2 ; 0,025 g de NaCl ; 0,5 g de KH_2PO_4 ; 0,25 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,15 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2 ml de FeCl_3 a 1%, 100 μg de tiamina clorídrica; 3 g de malte; 10 g de glicose; 15 g de agar e água destilada até completar 1000 ml.

O isolamento do fungo a partir de micorrizas foi obtido utilizando-se a técnica empregada por MARX e BRYAN (1970) no isolamento de fungos de micorrizas de coníferas. Micorrizas recém coletadas foram selecionadas e colocadas em frascos de plásticos perfurado para evitar sua dispersão durante o processamento. Foram primeiramente lavadas em água com detergente (2 a 3 gotas por 100 ml) e esterilizadas superficialmente em solução de HgCl_2 a 100 ppm por 1 a 2 minutos. Para eliminar os resíduos da solução esterilizante que pode inibir o desenvolvimento do fungo, as micorrizas foram agitadas sucessivamente em seis "erlenmeyers" contendo 1000 ml de água destilada esterilizada, por 10 minutos em cada "erlenmeyer". Em seguida as micorrizas foram retiradas do frasco plástico e individualmente implantadas em tubos com agar inclinado contendo MMN, sendo incubados no escuro, a temperatura ambiente que oscilou entre 22 a 28°C.

3.2. Infestação artificial do solo com *Pisolithus tinctorius* isolado de eucalipto e seu efeito em mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Eucalyptus citriodora*.

3.2.1. Ensaio com basidiosporos

Basidiocarpos de *P. tinctorius*, apresentando o perídio intacto, foram coletados de talhões de *E. citriodora* em Itirapina, SP. Destes basidiocarpos, removeu-se a massa de basidiosporos da parte superior da gleba que serviram como inóculo.

Utilizou-se de concentração correspondente a 26×10^7 esporos por litro de solo (0,6 g/l solo), sendo este número obtido através da contagem de uma suspensão de esporos em água e Tween 80 em hemocitômetro. Esta concentração foi utilizada por MARX *et alii* (1976) para infestação de solo com mudas de espécies de *Pinus*.

O solo utilizado como substrato foi um Regossol proveniente de povoamento de *E. citriodora*, da mesma região de coleta dos basidiosporos.

O solo foi peneirado e para alguns tratamentos, esterilizado em autoclave, por 3 horas, em 3 dias consecutivos, a 120°C e 1 atm de pressão. A estes solos, natural e esterilizado, foram adicionados os basidiosporos na concentração estabelecida, homogeneizados e distribuídos em vasos de alumínio, onde foram diretamente semeados com *Eucalyptus citriodora* Hook e *Pinus elliottii* Engelm var. *elliottii*, com sementes procedentes de Pederneiras, SP e Mogi Guaçu, SP, respectivamente, sendo previamente tratadas com hipoclorito de cálcio a 5% por 5 minutos. A testemunha era constituída de so

lo não infestado artificialmente.

Acículas picadas e esterilizadas em autoclave por 15 minutos, a 120^oC e 1 atm de pressão serviram como cobertura nos vasos semeados.

Em cada ensaio os tratamentos foram distribuídos em 8 blocos ao acaso, totalizando 32 vasos para o ensaio com *P. elliottii* e 32 vasos com *E. citriodora*.

Os ensaios foram instalados na casa de vegetação da Divisão de Dasonomia do Instituto Florestal, em São Paulo, SP, em maio de 1980.

Dois meses após o estabelecimento dos ensaios realizou-se um desbaste, mantendo-se 10 mudas em cada vaso.

Após seis meses de desenvolvimento, os ensaios foram avaliados, através de amostragem ao acaso de 5 plantas por vaso, considerando as seguintes características: a) formação de micorrizas, avaliada em porcentagem, através de exame visual de raízes laterais que se associavam a *P. tinctorius* e outros fungos, seguindo a metodologia de MARX *et alii* (1976) para as mudas de *P. elliottii* var. *elliottii*; b) altura da copa, medida em centímetros desde o colo até o ápice da planta; c) peso seco total em gramas, após secagem da muda em estufa, até peso constante.

As micorrizas observadas foram posteriormente cultivadas em MMN, utilizando-se as técnicas descritas em 3.1.3. para a tentativa de recuperação de *P. tinctorius* ou outros

fungos simbiotes.

3.2.2. Ensaio com inóculo vegetativo

O inóculo utilizado nestes ensaios foi resultante do cultivo do isolado 14/79, obtido de basidiocarpo de *P. tinctorius*, coletado em talhão de *E. citriodora*, em Itirapina, SP.

Para a produção do inóculo, adaptou-se a metodologia prescrita por MARX e BRYAN (1975), utilizando-se frascos com capacidade de 1000 ml, contendo 675 ml de vermiculita, 25 ml de turfa em pó e 350 ml de solução nutritiva de MMN. As tampas de metal dos frascos foram perfuradas na parte central sendo o orifício preenchido com algodão para permitir trocas gasosas.

Nos frascos, esterilizados em autoclave a 120°C, a 1 atm de pressão por 30 minutos, introduziu-se em quatro pontos equidistantes, pedaços de MMN agar com o *P. tinctorius* em desenvolvimento. Os frascos foram incubados a temperatura ambiente (20 a 27°C), por um período de 3 a 4 meses até domínio total da vermiculita pelo micélio do fungo.

De 7 a 12 horas antes da infestação do solo, o conteúdo dos frascos foi lavado em água corrente, para a retirada do excesso de nutrientes do substrato que pode servir de fonte nutritiva para microorganismos competidores.

Na infestação do solo, empregou-se o inóculo na proporção 1 : 6 (v/v), de fungo para substrato.

Os tratamentos com infestação de micélio, os hospedeiros, as condições de estabelecimento e a avaliação, seguiram a mesma metodologia adotada nos ensaios com basidiosporos (3.2.1.).

3.3. Comparação entre os efeitos de isolados de *Pisolithus tinctorius* obtidos de pinus e eucalipto, em mudas de *Pinus taeda* e *Eucalyptus saligna*.

Os isolados utilizados neste estudo comparativo foram: a) *P. tinctorius*, isolado 16/77, obtido a partir de basidiocarpo do fungo, procedente de talhão de *E. saligna*, da região de Mogi Mirim, SP e b) *P. tinctorius*, isolado 185, cedido pelo Dr. D. H. Marx, do Instituto para Pesquisas e Desenvolvimento de Micorrizas, Georgia, EUA, obtido de micorriza de *Pinus taeda*. Os inóculos foram obtidos utilizando-se a mesma técnica adotada no item 3.2.2.

O solo utilizado foi Latossol Roxo, coletado em Piracicaba, o qual foi peneirado, adicionando-se areia na proporção de 2 partes de solo para 1 de areia (v/v).

Esta mistura foi fumigada com brometo de metila na concentração de 400 ml/m³ da mistura solo e areia. O fumigante foi mantido por 48 horas em cobertura de polietileno e decorridas mais 48 horas após a retirada da cobertura, o solo foi

infestado com os isolados em estudo.

A infestação foi realizada, misturando-se 1 parte do inóculo para 10 partes do substrato (v/v). A testemunha constou da incorporação de inóculo do isolado de pinus, autoclavado por 15 minutos a 1 atm de pressão, na mesma proporção.

A este substrato adicionou-se adubo na proporção de 30 kg N/ha, 100 kg de P/ha e 11 kg K/ha.

Como recipientes foram utilizados caixotes de madeira, com dimensão de 45 x 30 x 9 cm, que comportavam cerca de 12 litros de substrato.

No solo infestado e acondicionado nos caixotes, foi realizada semeadura direta com sementes de *P. taeda* L., procedentes de Mogi Guaçu, SP e sementes de *E. saligna* Sm., procedentes de Caieiras, SP.

Palha de arroz fumigada com brometo de metila serviu como cobertura das sementes nos caixotes semeados.

Para cada tratamento foram empregadas 5 repetições, cada repetição correspondendo a um caixote, totalizando 30 parcelas em delineamento inteiramente casualizado.

O ensaio foi instalado na casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em Piracicaba, SP, em julho de 1977.

Uma adubação adicional de cobertura, na propor-

ção de 30 kg de N/ha, foi feita com sulfato de amônio, 30 dias após a instalação, para superar uma eventual deficiência de nitrogênio. Aos 100 dias, realizou-se desbaste para eliminar o número excessivo de mudas.

A avaliação foi realizada 130 dias após a semeadura, considerando as características dos basidiocarpos obtidos e a formação de micorrizas.

Os basidiocarpos foram examinados e as tentativas de isolamento conduzidas conforme a metodologia aplicada nos itens 3.1.1 e 3.1.3.

A formação de micorrizas foi avaliada em amostras constituídas de 10 plantas por parcela, colhidas ao acaso, visando os 10 centímetros superiores do sistema radicular, considerando a porcentagem de raízes laterais que se encontravam com micorrizas, similarmente ao ensaio do item 3.2.1.

4. RESULTADOS

4.1. Occorrência natural de *Pisolithus tinctorius* e ectomicorrizas em espécies de *Eucalyptus*.

4.1.1. Basidiocarpos

Os basidiocarpos observados encontravam-se a distâncias que variavam desde as adjacências do tronco do eucalipto até cerca de 12 metros. Os basidiocarpos mais distantes das árvores se encontravam ao longo das ruas que cortam ou circundam os talhões.

Povoamentos mais fechados apresentavam maior quantidade de basidiocarpos nas bordaduras e ruas, enquanto que em povoamentos mais novos, a presença era menos restrita, com ocorrência de frutificações ao longo de todo o talhão.

As medidas das estruturas macroscópicas dos basidiocarpos examinados encontram-se na Tabela 2.

A forma do basidiocarpo era variável (Figura 1a,b).

Tabela 2. Dimensões das estruturas macroscópicas de basidiocarpos de *Fisolithus tinctorius* coletados de talhões de espécies de *Eucalyptus*.

Espécie	Local	Número de basidiocarpos	Altura acima superfície (cm)		Comprimento da estipe (cm)		Altura total (cm)		Diâmetro da gleba (cm)	
			média	amplitude	média	amplitude	média	amplitude	média	amplitude
<i>E. citriodora</i>	Itirapina	38	7,7	3,0 - 20,0	2,8	0,0 - 13,0	13,5	5,0 - 26,0	18,7	3,5 - 11,5
<i>E. citriodora</i>	Mogi Mirim	33	5,5	3,0 - 11,0	1,5	0,0 - 5,5	9,2	4,5 - 17,0	4,8	3,4 - 8,0
<i>E. grandis</i>	Mogi Mirim	18	4,6	2,0 - 6,0	0,5	0,0 - 2,0	7,0	3,0 - 13,0	4,4	2,0 - 6,5
<i>E. grandis</i>	Itapetininga	31	4,9	1,0 - 8,3	1,2	0,0 - 2,5	8,7	4,2 - 14,0	5,6	2,5 - 9,5
<i>E. saligna</i>	Itapetininga	68	4,8	2,0 - 8,0	1,2	0,0 - 2,0	7,7	3,0 - 14,0	4,9	1,7 - 9,0
<i>E. viminalis</i>	Três Barras	5	6,4	4,5 - 10,0	4,0	1,0 - 8,0	8,1	6,0 - 12,5	5,1	4,0 - 7,5

De um modo geral era irregularmente globosa ou piriforme, podendo apresentar ou não estipe com altura variável, encimado por uma gleba composta de peridíolos com ângulos irregulares, mas de conformação definida e envolta por uma mucilagem escura que desaparecia gradativamente na parte superior, onde se encontrava uma massa pulverulenta, que constituíam os basidiosporos. A coloração da gleba quando madura, correspondia à cor da prancha 13, F/6 da carta de cores de MAERZ e REA PAUL (1950). No estágio jovem, o basidiocarpo era totalmente envolvido pelo perídio, onde o amarelo era a cor predominante, podendo apresentar ou não, manchas, que em sua maioria eram rajadas irregularmente de preto. No estágio maduro, o perídio se rompia, permitindo a disseminação dos esporos (Figura 1c).

A fixação dos basidiocarpos no solo era feita pelos rizóides que eram secos e frágeis quando maduros. Quando jovem, a fixação era mais sólida e a presença de rizomorfias e tramas miceliais conectadas aos rizóides eram facilmente visíveis. Estes filamentos, montados em lâminas e observados ao microscópio mostravam a presença de inúmeros grampos de conexão.

Os basidiosporos eram tipicamente arredondados, com a superfície totalmente ornamentada (Figura 1d). Ao microscópio, mesmo em aumento de 1000x, não foi possível distinguir o tipo de ornamentação, se espinhos ou verrugas. O diâmetro médio dos esporos foi de 9,64 μm e a amplitude de variação de 5,50 a 13,70 μm sendo estes valores resultantes de medições

de 100 basidiosporos de 260 basidiocarpos. Não foram notadas diferenças entre esporos de basidiocarpos de diferentes localidades e espécies de eucalipto.



Figura 1 - *Pisolithus tinctorius* de talhão de *Eucalyptus citriodora*, em Itirapina-SP: a) basidiocarpo piriforme; b) basidiocarpo globoso com manchas rajadas; c) basidiocarpo maduro com gleba exposta e d) basidiosporos.

As características observadas correspondem às descrições e ilustrações de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch de COKER e COUCH (1928) e GRAND (1976).

4.1.2. Micorrizas

No ato da sondagem observou-se a presença de rizomorfos macro e microscopicamente semelhantes em aspecto e cor àqueles conectados aos rizóides dos basidiocarpos (Figura 2a). Foram facilmente distinguíveis no interior do solo, mas a sua distribuição pelo solo foi difícil de ser levantada, pois tentativas de seguir esses filamentos não foram bem sucedidas, devido a sua extrema delicadeza. Pelos rizóides portanto, não foi possível conectar os basidiocarpos ao sistema radicular dos eucaliptos.



Figura 2 - a) Micorrizas e rizomorfos em *Eucalyptus viminalis*; b) micorriza ramiforme em *E. viminalis*; c) micorriza piramidal aberta em *E. citriodora* e d) corte longitudinal de ectomicorriza em *E. grandis*.

A presença das micorrizas no interior do solo foram facilmente detectáveis devido a coloração bastante acentuada, típica de estruturas de basidiocarpos de *Pisolithus tinctorius*, que as destacavam do solo e do sistema radicular dos eucaliptos (Figura 2). Sondagens realizadas imediatamente abaixo dos basidiocarpos de *P. tinctorius* mostravam maior quantidade de micorrizas que sondagens casuais ao longo dos talhões.

Nas observações efetuadas na localidade de Três Barras, observou-se a presença abundante de micorrizas no sistema radicular de *Eucalyptus viminalis*, notadamente concentrada na projeção da copa, em quantidades não observadas em outros talhões examinados neste trabalho.

Notou-se que as micorrizas se apresentavam em maior intensidade nos primeiros 4 anos de campo das árvores, quando esta intensidade diminuía, coincidindo com a fase em que a parte aérea do povoamento se fecha. Embora em quantidade bem reduzida, as associações micorrízicas não desapareciam totalmente nos povoamentos velhos. Em Três Barras, as micorrizas em *E. viminalis* com 2 anos de idade eram abundantes, contrastando com outro talhão da mesma espécie com 9 anos na mesma localidade que apresentavam poucas micorrizas. Em ambas as situações, os basidiocarpos de *P. tinctorius* se faziam presentes, embora em quantidades bem mais reduzidas no talhão antigo.

As micorrizas não estavam necessariamente condicionadas à presença de frutificações, pois em algumas observa -

ções, sondagens indicavam a presença de micorrizas, mas com total ausência de frutificações de fungos na superfície.

A morfologia externa das micorrizas se caracterizavam por apresentar um sistema ramiforme ou piramidal aberto (Figura 2b,c), contendo ramificações primárias até quinárias, e pela sua aparência em estereomicroscópio enquadrava-se no tipo 2 da classificação de CHILVERS (1968). No entanto, o micélio do fungo não era característico deste tipo, pois a superfície da micorriza em estudo era revestida por uma trama de hifas de paredes lisas e aspecto uniforme.

As medições realizadas nas micorrizas mostraram que seu diâmetro médio era de 233,63 μm , variando numa amplitude de de 123,90 a 501,50 μm .

As micorrizas seccionadas apresentaram estrutura semelhante à apresentada por CHILVERS e PRYOR (1965), configurando uma ectomicorriza típica, ou seja, a associação era formada pela manta que é a camada micelial que envolve externamente a raiz, e a rede de Hartig, onde havia penetração do micélio do fungo entre as células da epiderme, conforme mostra a Figura 2d. A penetração do fungo se limitava até próxima às células da endoderme.

Os componentes do fungo na associação mostraram uma coloração amarela, típica de *P. tinctorius*, que se destacavam dos elementos da raiz que eram hialinos.

A manta era homogênea apresentando espessura va-

riável de 11,50 a 92,00 μm e a formação deste tecido micelial era uniforme, do tipo sinênquima, onde não foi possível distinguir os espaços interhifálicos. Grampos de conexão e hifas eram visíveis neste tecido micelial, apresentando espessuras que variavam de 3,64 a 8,19 μm nos grampos de conexão e 2,28 a 5,79 μm para as hifas. A superfície da manta não apresentava ornamentações, mas notou-se a presença de segmentos de hifas e rizomorfias de mesmo aspecto e cor das hifas da manta, que se irradiavam no solo.

A rede de Hartig era composta de até três camadas de células epidermais, cujos espaços intercelulares eram preenchidos pelo micélio do fungo, de maneira bem compacta, onde não foi possível distinguir os espaços interhifálicos, tampouco o número de filamentos miceliais que preenchiam esses espaços. A espessura da rede de Hartig variava de 11,50 a 69,00 μm .

A estrutura, morfologia e anatomia das micorrizas não apresentavam variação nas diferentes espécies de eucalipto e localidades de procedência, não sendo detectado nenhum tipo de formação micorrizica distinto deste.

4.1.3. Isolamento em meio de cultura

O isolamento de *Pisolithus tinctorius*, a partir de basidiocarpos, em meio de cultura, começava a se caracterizar aos cinco dias, quando um tênue crescimento micelial, a

partir do peridíolo implantado, começava a se desenvolver, sendo que o meio, junto ao peridíolo, passava a apresentar uma coloração parda, que se irradiava e acentuava a medida que o micélio crescia. Cerca de 75% do total dos tubos implantados resultaram em culturas, sendo a maioria das contaminações constituídas de bactérias. O crescimento micelial de *P. tinctorius* era superficial e aéreo e a taxa de crescimento da ordem de 9cm (diâmetro da placa) por 30 dias de incubação, no escuro, a temperatura ambiente.

A espessura do micélio das 93 culturas obtidas foi em média de 4,44 μ m, variando na amplitude de 1,82 a 6,37 μ m. Estes valores foram resultantes de 100 leituras de hifas de cada cultura obtida, não sendo observadas diferenças entre culturas de basidiocarpos de diferentes localidades e espécies de eucalipto.

A cor do micélio em meio de cultura não era uniforme para todos os isolados obtidos, mas em sua totalidade se aproximavam das cores das pranchas 11 E/3 e 11 E/4 da carta de cores de MAERZ e REA PAUL (1950).

Alguns isolados do fungo apresentavam setores radiais e/ou circulares de contorno irregular e coloração mais escura que a normal.

A recuperação do fungo micorrízico em meio de cultura a partir de micorrizas foi da ordem de 0,6% do total dos

tubos implantados. Em sua maioria não se conseguiu obter uma sã cultura do fungo. Quando havia crescimento, este podia ser notado após 10 dias quando um tènue crescimento micelial de cor amarela, superficial e aéreo, a partir do pedaço da micorriza implantada, apresentava coloração e aspectos iguais das culturas obtidas a partir de perídios de *P. tinctorius*, no mesmo meio. Além dessa semelhança, a taxa de crescimento também ocorria na mesma velocidade e o micélio observado microscopicamente apresentava grande quantidade de grampos de conexão e as mesmas características do micélio de *P. tinctorius* (Figura 3). A espessura do micélio obtido ocorria na amplitude de 1,82 a 6,37 μm , com média de 4,70 μm , sendo estes valores resultantes de medições de 17 culturas obtidas a partir de micorrizas de *Eucalyptus citriodora*, *E. grandis* e *E. saligna*, procedentes de Itirapina, Mogi Mirim e Itapetininga respectivamente.



Figura 3. Micélio e grampos de conexão de *Pisolithus tinctorius* isolado de micorriza de *Eucalyptus citriodora*.

Após o recobrimento completo da superfície do substrato, tanto os isolados de micorrizas como de basidiocarpos, passavam a apresentar filamentos miceliais mais espessos, de coloração marrom, que ao microscópio mostraram ser feixes de filamentos miceliais, constituindo as rizomorfias. Esta característica foi especialmente visível nas paredes dos tubos de cultura, onde o crescimento aéreo era mais restrito, facilitando a sua observação.

4.2. Infestação artificial do solo com *Pisolithus tinctorius* de eucalipto, e seu efeito em mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Eucalyptus citriodora*.

No decorrer dos ensaios não se observou a presença de basidiocarpos do fungo inoculado em nenhum dos tratamentos testados.

Ao final de seis meses, os ensaios com basidiosporos e inóculo vegetativo de *Pisolithus tinctorius* apresentaram resultados similares, como pode ser observado nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Em *Pinus elliottii* var. *elliottii*, apenas a característica de formação de micorrizas foi afetada pelos tratamentos. No solo natural, independente da infestação com *P. tinctorius*, o sistema radicular de *P. elliottii* apresentava maior quantidade de micorrizas que nos solos esterilizados, inoculados ou não com o fungo. Mesmo nos tratamentos inoculados com *P. tinctorius* -

Tabela 3. Formação de micorrizas, crescimento em altura e peso seco de mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Eucalyptus citriodora*, em solo infestado com basidiosporos de *Pisolithus tinctorius*. Cada valor é média de 40 plantas, 5 de 8 blocos. Nas colunas, médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Espécies	Tratamentos	Raízes com micorrizas* (%)		Altura da copa (cm)	Peso Seco Total (g)
		<i>P. tinctorius</i>	outros fungos		
<i>Pinus elliottii</i>	solo esterilizado	0,00	0,66 b	14,65 a	0,195 a
	+ <i>P. tinctorius</i>				
	solo natural	0,00	5,32 a	14,34 a	0,178 a
	+ <i>P. tinctorius</i>				
<i>Eucalyptus citriodora</i>	solo esterilizado	0,00	0,59 b	15,95 a	0,219 a
	solo natural	0,00	3,34 a	13,59 a	0,162 a
	solo esterilizado	0,00	0,00	12,02 a	0,116 a
	+ <i>P. tinctorius</i>				
<i>Eucalyptus citriodora</i>	solo natural	0,00	0,00	9,78 a	0,092 a
	+ <i>P. tinctorius</i>				
	solo esterilizado	0,00	0,00	10,18 a	0,098 a
	solo natural	0,00	0,00	10,31 a	0,112 a

* Dados originais. Para efeito de análise estatística foram transformados em $\arcsen \sqrt{x + 0,5}$

Tabela 4. Formação de micorrizas, crescimento em altura e peso seco de mudas de *Pinus elliotii* var. *elliotii* e *Eucalyptus citriodora* em solo infestado com inóculo vegetativo de *Pisolithus tinctorius* e esterilização do solo. Cada valor é média de 40 plantas, 5 de 8 blocos. Nas colunas, médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Espécies	Tratamentos	Raízes com micorrizas* (%)		Altura da copa (cm)	Peso Seco Total (g)
		<i>P. tinctorius</i>	outros fungos		
<i>Pinus elliotii</i>	solo esterilizado + <i>P. tinctorius</i>	0,00	0,74 b	15,38 a	0,192 a
	solo natural + <i>P. tinctorius</i>	0,00	12,42 a	14,60 a	0,165 a
	solo esterilizado	0,00	2,53 b	14,93 a	0,182 a
	solo natural	0,00	14,04 a	15,33 a	0,201 a
<i>Eucalyptus citriodora</i>	solo esterilizado + <i>P. tinctorius</i>	0,00	0,00	13,84 a	0,146 a
	solo natural + <i>P. tinctorius</i>	0,00	0,00	12,38 a	0,127 a
	solo esterilizado	0,00	0,00	12,95 a	0,204 a
	solo natural	0,00	0,00	11,58 a	0,162 a

* Dados originais. Para efeito de análise estatística foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x + 0,5}$

rius, as micorrizas não eram típicas do fungo, apresentando-se em agrupamentos coralóides, de coloração branca. Não se conseguiu recuperar o fungo simbiote em meio de cultura, não sendo identificado. Observou-se apenas o efeito da esterilização do solo, sendo a infestação do solo com *P. tinctorius*, tanto na forma de basidiosporos como de micélio, inócua à formação de micorrizas em *P. elliottii*. As demais características, de altura de copa e peso seco total, não foram afetados por nenhum dos tratamentos.

Em *Eucalyptus citriodora* as micorrizas foram totalmente ausentes, não se conseguindo observar nenhum crescimento micelial no substrato, mesmo naqueles infestados com *P. tinctorius*. Não foram portanto detectados efeitos da infestação do solo com basidiosporos e micélio de *P. tinctorius*, tampouco da esterilização do solo, na formação de micorrizas, altura de copa e peso seco total das mudas de *E. citriodora*, nas condições estudadas.

4.3. Comparação entre os efeitos de isolados de *Pisolithus tinctorius*, obtidos de pinus e eucalipto, em mudas de *Pinus taeda* e *Eucalyptus saligna*

A característica de frutificação de *Pisolithus tinctorius* foi manifestada apenas no tratamento com mudas de *Pinus taeda*, em solo infestado com o isolado 185, obtido de micorriza de pinus. Nos demais tratamentos não se observou a presença de frutificações do fungo.

Os quatro basidiocarpos obtidos apresentavam con formação semelhante àqueles de eucalipto (4.1.1), exceção apenas ao aspecto cor, pois eram mais escuros, tendendo mais para a tonalidade marrom, que à tonalidade amarela das frutificações encontradas em eucalipto.

Os basidiosporos, examinados ao microscópio, apresentavam aspecto semelhante aos de basidiocarpos de eucalipto, apresentando diâmetro médio de 9,05 μm , variando na amplitude de 15,50 a 13,70 μm .

As tentativas de isolamento do fungo a partir destes basidiocarpos resultaram em culturas, que apresentavam aspecto semelhante aos isolados de eucalipto, porém mais vigorosas e com coloração mais escura, correspondendo a prancha 13, F/6 de MAERZ e REA PAUL (1950). A taxa de crescimento foi também maior, na ordem de 9 cm (diâmetro da placa) por 20 dias de incubação, no escuro, a temperatura ambiente. O micélio obtido tinha uma espessura média de 3,99 μm , variando na amplitude de 1,82 a 6,37 μm .

Os resultados da formação de ectomicorrizas (Tabela 5) mostram, que nas condições estudadas, existe uma especificidade diferencial entre ambos os isolados com relação ao hospedeiro, pois apenas no solo infestado com o isolado 185, as mudas de *Pinus taeda* apresentaram micorrizas típicas de *P. tinctorius*. Em *Eucalyptus saligna*, as micorrizas foram totalmente ausentes, na presença de qualquer dos isolados.

Tabela 5. Formação de ectomicorrizas em mudas de *Pinus taeda* e *Eucalyptus saligna*, em solo artificialmente infestado com inóculo de pinus e eucalipto. Os valores são médias de 5 repetições, cada repetição constituída de média de 10 plantas por parcela.

Tratamentos	Micorriza* (%)			
	<i>Pinus taeda</i>		<i>Eucalyptus saligna</i>	
	<i>Pisolithus tinctorius</i>	outros	<i>Pisolithus tinctorius</i>	outros
<i>P. tinctorius</i> de eucalipto	0,00b	7,30 a	0,00	0,00
<i>P. tinctorius</i> de pinus	61,40 a	0,00 b	0,00	0,00
Testemunha	0,00 b	0,98 b	0,00	0,00

* Dados originais, não transformados. Para efeito de análise estatística foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x + 0,5}$.

5. DISCUSSÃO

Os exames e medições das estruturas do fungo associado a diferentes espécies de eucalipto e procedência mostraram que as características de forma e cor das estruturas dos basidiocarpos se enquadram nas descrições de COKER e COUCH (1928) e GRAND (1976) de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch.

A frequência e características dos basidiocarpos não puderam ser particularizados para cada espécie de eucalipto ou região estudada. Entretanto, sua presença parece ser dependente da idade do talhão, da quantidade de insolação e da interdependência entre ambos, considerando que em talhões mais antigos, o desenvolvimento da copa faz com que se aumente a densidade das folhas e ramos, reduzindo a incidência da insolação no solo e na superfície foliar das árvores. É notório o fato de se encontrar maior quantidade de basidiocarpos em talhões novos ou na bordadura de povoamentos mais antigos de eucalipto. O efeito da luz na formação de frutifica-

ções de fungos que se associam ao sistema radicular das árvores é abordado por HACSKAYLO (1976) que explica a atuação da luz como estimuladora da fotossíntese, com conseqüente aumento na produção de carboidratos pela planta. Estes carboidratos, translocados internamente, permitem a formação e o estabelecimento de micorrizas. Translocados externamente, via micélio do fungo, permitiriam a reprodução do fungo, através da formação dos corpos de frutificação.

Com respeito a forma dos basidiosporos, as observações realizadas não permitiram definir o tipo de ornamentação, se verrugas ou espinhos. Segundo COKER e COUCH (1928), os esporos de *P. tinctorius* são espinescentes, mas recobertos por um material gelatinoso que os fazem parecer verrucosos quando imersos em água. As observações de GRAND (1976) ao microscópio eletrônico, confirmam a característica espinescente dos esporos de *P. tinctorius*.

A obtenção do micélio em meio de cultura a partir dos basidiocarpos, foi bem sucedida, contrastando com os resultados de BULMER (1964), que observou a germinação dos esporos do fungo em meio de cultura, somente quando adicionava a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* var. *sanguinea*. HILE e HEN - NEN (1969), após 7 dias da implantação dos basidiosporos, constataram o crescimento de uma levedura, e somente após 7 semanas obtiveram crescimento micelial de *P. tinctorius*, que tinha bom crescimento após repicagem em meio contendo extrato de levedura e malte. Ambos os autores sugerem a existência de

um efeito estimulatório ou de dependência nutricional pela presença de levedura no desenvolvimento micelial de *P. tinctorius*. Entretanto, nas condições do presente trabalho, onde utilizou-se peridíolos, ao invés de basidiosporos, nenhum crescimento diferente de *P. tinctorius* foi observado.

Portanto, as técnicas empregadas e a composição do meio de MMN mostraram ser adequados à obtenção de cultura de *P. tinctorius* a partir de peridíolos do basidiocarpo.

Entretanto, o mesmo meio, utilizado nas tentativas de recuperação do fungo das micorrizas, não apresentaram bons resultados. Deve-se considerar que, além do meio de cultura, outros fatores como o ambiente e a metodologia empregada podem ter afetado o fungo, antes mesmo da implantação de micorriza no meio. ZAK e MARX (1964), pioneiros nesta técnica, obtiveram um máximo de 25,6% de culturas a partir de micorrizas de *Pinus elliottii*. Esta baixa porcentagem de recuperação de fungos micorrízicos foi também constatada por CHILVERS (1968), afirmando que até aquela data, as técnicas de isolamento direto do fungo a partir da manta da micorriza, produziam uma taxa relativamente baixa de isolados.

As características anatômicas das micorrizas de eucalipto observadas são semelhantes às aquelas descritas por CHILVERS e PRYOR (1965), que caracterizaram uma raiz de eucalipto infectada por fungo micorrízico, sem contudo identificar o fungo simbiote e a espécie hospedeira. Entretanto, a micor-

riza aqui descrita não se enquadra em nenhum dos 8 tipos descritos por CHILVERS (1968), embora esta classificação não seja abrangente a todas as formações conhecidas de micorriza de eucalipto.

A morfologia e anatomia das micorrizas observadas, mostraram um grau de uniformidade que permite afirmar, que existe apenas um fungo nestas associações.

A presença das micorrizas no solo, de maneira semelhante às frutificações de *P. tinctorius*, parecem sofrer influência da idade do hospedeiro, levando a crer que os fatores que exercem efeitos na formação de basidiocarpos de *P. tinctorius* são os mesmos que regem o estabelecimento das micorrizas em eucalipto.

A comparação entre as características culturais dos isolados obtidos de basidiocarpos de *P. tinctorius* e de micorrizas de eucalipto, mostraram que ambos apresentam a mesma identidade em cor, textura, micélio, presença de rizomorfos, vigor e taxa de crescimento. Segundo ZAK (1973), a detecção desta semelhança é suficiente para a identificação do fungo, de onde pode se afirmar que, nas condições do presente estudo, *P. tinctorius* é o fungo simbiote na micorriza de eucalipto.

Entretanto, ao comparar as características de *P. tinctorius* de pinus e eucalipto, notam-se diferenças acentuadas, desde a coloração das estruturas do basidiocarpo, até nas características culturais, onde o crescimento do isolado

de pinus é mais vigoroso, reforçando a hipótese formulada por CHILVERS (1973) e KRÜGNER e TOMAZELLO FILHO (1979) sobre a existência de estirpes específicas para pinus e para eucalipto.

A infestação artificial com ambos os isolados em substrato de mudas de *Pinus taeda* e *Eucalyptus saligna* confirmam a existência dessa variação intraespecífica de *P. tinctorius*, pois observou-se a especificidade do isolado de pinus para com *P. taeda*. Somente neste hospedeiro, o isolado de pinus se associou na forma de micorrizas e apresentou frutificações, fato este, não constatado nos demais tratamentos. Resultado semelhante foi obtido por CHILVERS (1973) que não obteve a formação de micorrizas em *Pinus radiata*, por isolados de *P. tinctorius* obtidos de *Eucalyptus st-johnii*.

A ausência de respostas das mudas de pinus e eucalipto à inoculação com *P. tinctorius* obtido de eucalipto, demonstra a incapacidade do fungo de se desenvolver e associar ao eucalipto na fase de mudas ou limitação da metodologia empregada. IMANA e PRADO JÚNIOR (1979) também não detectaram efeitos da infestação do solo com esporos do mesmo fungo em mudas de *E. grandis*.

Os inúmeros fatores artificiais envolvidos como o vigor do fungo cultivado, a viabilidade dos esporos utilizados, a dose de inóculo empregada, a idade e espécie das mudas, o ambiente de crescimento, podem ter afetado o estabelecimento do fungo no substrato, e com isso terem comprometido a

formação das micorrizas. Estes fatores foram discutidos por autores como SMITH e POPE (1934) que alegaram que a falha em sua tentativa de síntese de micorrizas por *P. tinctorius* em eucalipto era devido ao baixo vigor do fungo cultivado. A eficiência do tratamento do solo antes da infestação e um adequado potencial de inóculo são fatores citados por MARX *et alii* (1976) como necessários ao estabelecimento efetivo de *P. tinctorius* no solo. MULLETTE (1976) explica que as falhas que normalmente ocorrem na indução de micorrizas em eucalipto, provavelmente resultam da condução dos testes em condições ambientes inadequadas ao estabelecimento da associação. Todos estes fatores, não avaliados para este trabalho, são portanto fundamentais para o desencadeamento do processo fisiológico que induz e mantém a formação das micorrizas. Segundo SLANKIS (1973), existe ainda um equilíbrio entre os produtos do fungo como os exudatos, vitaminas e hormônios de crescimento, e os fatores da planta como o metabolismo dos carboidratos, auxinas e nível nutricional que induzem um ambiente favorável no qual é possível o estabelecimento da micorriza. Considerando ainda que, observações de mudas das espécies testadas, em fase de viveiro, nunca apresentam formações micorrízicas semelhantes àquelas aqui descritas, é possível que todos esses fatores, tanto do fungo como do hospedeiro, atuem em função da idade do hospedeiro.

Sínteses artificiais de micorrizas por *P. tinctorius*, em eucalipto, bem sucedidas, ocorreram experimentalmente com CHILVERS (1973) e MULLETTE (1976), mas em ambas as situ

ações, os testes foram conduzidos *in vitro* e entre as espécies que produziram micorrizas não estão incluídas *E. saligna* e *E. citriodora* testados neste trabalho.

Pelos dados obtidos observa-se que a associação micorrizica entre *P. tinctorius* e as espécies de eucalipto estudadas não se constitui em condição necessária ao desenvolvimento dessas espécies, pelo menos na fase de viveiro.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente trabalho, concluiu-se que:

a) os basidiocarpos encontrados com freqüência em povoamentos de *Eucalyptus citriodora*, *E. grandis*, *E. saligna* e *E. viminalis*, bem como o fungo micorrízico associado ao sistema radicular dessas espécies, pertencem à mesma espécie, tratando-se de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch;

b) as técnicas de isolamento de *P. tinctorius* a partir de peridólos, utilizando meio modificado de Melin Norkrans (MMN) como substrato, são adequados ao cultivo do micélio do fungo;

c) as micorrizas encontradas nas espécies de eucalipto observadas apresentam uma única característica estrutural e são associações do tipo ectotrófico;

d) os isolados de *P. tinctorius* obtidos de povoamentos de eucalipto, diferem do isolado obtido de povoamento

de pinus em coloração e vigor, bem como na capacidade de associação na forma de micorriza, sendo o isolado de pinus, específico para seu hospedeiro de origem;

e) a infestação do solo com inóculo vegetativo e esporos de *P. tinctorius*, obtidos de povoamentos de eucalipto, não afetaram o crescimento e não induziram a formação de ectomicorrizas típicas de *P. tinctorius*, em mudas de *Eucalyptus citriodora* e *Pinus elliottii* var. *elliottii*, demonstrando a incapacidade do fungo se associar nesses hospedeiros na fase de mudas ou limitação da metodologia utilizada.

LITERATURA CITADA

- ANDERSON, J. 1966. Indagini sulla micorrizia in alcune specie di eucalipto nell'Italia Centrale. Publicazione del Centro di Sperimentazione Agricola e Forestale. Roma, 8:260-276.
- ANDERSON, J. 1968. Le micorrize dell'eucalipto in piantine allevate in vivaio. Publicazione del Centro di Sperimentazione Agricola e Forestale. Roma, 9:81-90.
- ASHTON, D.H. 1976. Studies on the mycorrhizae of *Eucalyptus regnans* F. Muell. Australian Journal of Botany. Melbourne, 24:723-741.
- BAKSHI, B.K. 1966. Mycorrhiza in eucalypts in India. Indian Forester. Dehra Dun, 92:19-20.
- BARROS, N.F.; R.M. BRANDI e M.S. REIS. 1978. Micorriza em eucalipto. Revista Árvore. Viçosa, 2:130-140.
- BULMER, R.G.S. 1964. Spore germination of forty two species of puffballs. Mycologia. Bronx, 56:630-632.

- CHILVERS, G.A. 1968. Some distinctive types of eucalypt mycorrhiza. Australian Journal of Botany. Melbourne, 16: 49-70.
- CHILVERS, G.A. 1973. Host range of some eucalypt mycorrhizal fungi. Australian Journal of Botany. Melbourne, 21: 103-111.
- CHILVERS, G.A. e L.D. PRYOR. 1965. The structure of eucalypt mycorrhizas. Australian Journal of Botany. Melbourne, 13: 245-259.
- COKER, W.C. e J.N. COUCH. 1928. The gasteromycetes of the Eastern United States and Canada. Chapel Hill, The University of North Carolina Press. 201 p.
- GIBSON, I.A.S. 1975. Diseases of forest trees widely planted as exotic in the Tropics and Southern Hemisphere. Part 1. Important members of the Myrtaceae, Leguminosae, Verbenaceae and Meliaceae. Kew Surrey, Commonwealth Forestry Institute. 51 p.
- GRAND, L.F. 1976. Distribution, plant associates and variation in basidiocarps of *Pisolithus tinctorius* in the United States. Mycologia. Bronx, 68: 672-678.
- HACSKAYLO, E. 1972. Mycorrhiza: the ultimate in reciprocal parasitism? Bio Science. Washington, 22: 577-582.
- HACSKAYLO, E. 1976. Activities within mycorrhizal associations at the root soil interfaces. In: IUFRO Congress, 16,

- (s.l.), (s.d.) , 1976. p. 78-89.
- HILE, N. e J.F. HENNEN. 1969. *In vitro* culture of *Pisolithus tinctorius* mycelium. Mycologia. Bronx, 61:195-198.
- IMANA, J. e A.C.PRADO JÚNIOR. 1979. Efeito do fungo *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker no desenvolvimento inicial de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. Silvicultura - Anais do 3º Congresso Florestal Brasileiro. Manaus, 2: 347-349.
- KRÜGNER, T.L. e M.TOMAZELLO FILHO. 1979. Tecnologia de inoculação micorrízica em viveiro de *Pinus* spp. Piracicaba, IPEF, 6 p. (Circular Técnica, 6).
- MAERZ, A. e M. REA PAUL. 1950. A dictionary of color. 2.ed. New York, McGraw-Hill Book Company Inc. 208 p.
- MARX, D.H. 1969. 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. Saint Paul, 59:153 - 163.
- MARX, D.H. 1977. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 23:217-223.
- MARX, D.H. e C.B. BRYAN. 1970. Pure culture synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on different conifer hosts. Canadian Journal of

Botany. Ottawa, 48:639-643.

- MARX, D.H. e W.C. BRYAN. 1975. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soils infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. Forest Science. Washington, 21:245-254.
- MARX, D.H.; W.C. BRYAN e E.C. CORDELL. 1976. Growth and ectomycorrhizal development of pine seedlings in nursery soils infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. Forest Science. Washington, 22:91-100.
- MULLETTE, K.J. 1976. Studies of eucalypt mycorrhizas. 1. A method of mycorrhiza induction in *Eucalyptus gummiifera* (Gaertn e Hochr) by *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch. Australian Journal of Botany. Melbourne, 24:193-200.
- PRYOR, L.D. 1956a. Ectotrophic mycorrhiza in Renantherous species of *Eucalyptus*. Nature. London, 177:587-588.
- PRYOR, L.D. 1956b. Chlorosis and lack of vigour in seedlings of Renantherous species of *Eucalyptus* caused by lack of mycorrhiza. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales. (s.l.), 81:91-95.
- REDDY, M.A.R. e S.N. KHAN. 1972. Soil amendments and types of inocula on development of mycorrhiza. Indian Forester. Dehra Dun, 98:307-310.
- SINGH, S. e A. KUMAR. 1966. Field survey of mycorrhiza in

- eucalipts and pines. Indian Forester. Dehra Dun, 92 : 517-520.
- SLANKIS, V. 1973. Hormonal relationships in mycorrhizal development. In: MARKS, G.C. e T.T. KOZLOWSKI, Coord. Ectomycorrhizae - their ecology and physiology. New York, Academic Press Edit. p. 232-298.
- SMITH, N.J.G. e F.B. POPE. 1934. The association between the Gasteromycete *Polysaccum* and *Eucalyptus* roots. Transactions of the British Mycological Society. Cambridge, 19:95.
- TOMAZELLO FILHO, M. 1980. Influência dos fungos ectomicorrízicos *Thelephora terrestris* Ehr. ex Fr. e *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch no desenvolvimento de espécies tropicais de *Pinus*. Piracicaba, ESALQ/USP, 116 p. (Tese de Doutorado).
- THAPAR, H.S.; B. SINGH e B.K. BAKSHI. 1967. Mycorrhizae in *Eucalyptus*. Indian Forester. Dehra Dun, 93:756-759.
- TRAPPE, J.M. 1962. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. The Botany Review. New Haven, 28:538-606.
- ZAK, B. 1973. Classification of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C. e T.T. KOZLOWSKI, Coord. Ectomycorrhizae - their ecology and physiology. New York, Academic Press Edit. p. 43-78.
- ZAK, B. e D.H. MARX. 1964. Isolation of mycorrhizal fungi from

roots of individual slash pines. Forest Science. Washing-
ton, 10:214-222.