EFEITO DA MATÉRIA ORGÂNICA E DO FÓSFORO NO
DESENVOLVIMENTO DE ECTOMICORRIZAS EM "PLANTLETS" DE
Eucalyptus INOCULADAS *in vitro* COM *Pisolithus tinctorius*

MARCO ANTONIO GALLI

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Tasso Leo Krugner

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Maio - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Galli, Marco Antonio

G168e Efeito da matéria orgânica e do fósforo no desenvolvimento de ectomicorrizas em "plantlets" de Eucalyptus inoculadas "in vitro" com Fisolithus tinctorius. Piracicaba, 1991.
74p. ilus.

Diss. (Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Eucalipto - Clone 2. Eucalipto - Efeito do fósforo 3. Eucalipto - Matéria orgânica - Efeito 4. Eucalipto - Micorriza - Inoculação "in vitro" 5. Micorriza - Inoculação "in vitro" I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 634.9734

EFEITO DA MATÉRIA ORGÂNICA E DO FÓSFORO NO
DESENVOLVIMENTO DE ECTOMICORRIZAS EM "PLANTLETS" DE
Eucalyptus INOCULADAS *in vitro* COM *Fisolithus tinctorius*

MARCO ANTONIO GALLI

Aprovada em: 14.05.1991

Comissao julgadora:

Prof. Dr. Tasso Leo krugner

ESALQ/USP

Dr. Wagner Bettiol

CNPDA/EMBRAPA

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

ESALQ/USP

Prof. Dr. Tasso Leo Krugner

Orientador

*A todos que contribuíram para a
realização desse trabalho,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Tasso Leo Krugner, pela orientação e pela atenção recebida.

Ao Professor Dr. Antonio Natal Gonçalves, pelos conhecimentos transmitidos e por colocar à disposição o laboratório de cultura de tecidos do Depto. de Ciências Florestais (ESALQ - USP).

Ao Professor Dr. José Leonardo de Moraes, pela interpretação das análises químicas e sugestões para formulação dos substratos no viveiro.

Ao Eng. Florestal José Demétrius Vieira da Cia. CHAMPION S/A, por colocar à disposição o laboratório e o viveiro para montagem dos experimentos.

Ao Biólogo Doraci Milani e aos técnicos de laboratório da Cia. CHAMPION S/A, pelo auxílio na manipulação do material *in vitro*.

Ao técnico de laboratório José Roberto Romanini do Depto. de Ciências Florestais da ESALQ - USP, pela colaboração na formulação de meios e material vegetal.

Ao colega Dr. Celso Garcia Auer, pelas sugestões e companheirismo durante a realização deste trabalho.

Aos colegas Marcelo Giovanetti Cantieri e Lilian Maria Arruda Bacchi pelas sugestões e colaboração na realização das análises estatísticas.

Aos Professores, colegas e funcionários do Depto. de Fitopatologia, que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

ÍNDICE

página

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Considerações gerais.....	04
2.2. Fatores que influenciam o desenvolvimento da associação no viveiro.....	07
2.2.1. Efeito da matéria orgânica.....	07
2.2.2. Efeitos nutricionais.....	09
2.2.3. Outros fatores.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Produção de "plantlets".....	17
3.2. Teste de crescimento de <i>P.tinctorius</i> <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de carboidratos no meio MNM e no meio de enraizamento.....	18
3.3. Produção de inóculo e inoculação <i>in vitro</i>	20
3.4. Ensaios de inoculação <i>in vitro</i>	21

3.4.1. Inoculação com <i>P.tinctorius in vitro</i> de um clone de <i>E.urophylla</i> e de um híbrido <i>E.urophylla</i> x <i>E.grandis</i> em substrato de tecido não tramado (Coursel). (1º ensaio).....	21
3.4.2. Inoculação com <i>P.tinctorius in vitro</i> no clone híbrido <i>E.urophylla</i> x <i>E.grandis</i> (H4/89), em substrato de feltro e meio líquido para enraizamento com 4g de sacarose por litro.(2º ensaio).....	22
3.4.3. Inoculação com <i>P.tinctorius in vitro</i> no clone híbrido <i>E.urophylla</i> x <i>E.grandis</i> (H4/89), em substrato de feltro e meio líquido para enraizamento com 4g de sacarose por litro.(3º ensaio).....	23
3.5. Desenvolvimento de ectomicorrizas e crescimento das "plantlets" do híbrido (H4/89) após transplante para viveiro em solo com diferentes níveis de composto orgânico e fósforo aplicados.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1.Crescimento de <i>P.tinctorius in vitro</i> em diferentes concentrações de carboidratos no meio MNM e no meio de enraizamento.....	29
4.2. Inoculação de ectomicorrizas com <i>P.tinctorius in</i>	

<i>vitro</i> em um clone de <i>E.urophylla</i> (C ₁) e um híbrido <i>E.urophylla</i> x <i>E.grandis</i> , em substrato de tecido não tramado (Coursel) e meio líquido para enraizamento. (1º ensaio).....	30
4.3. Inoculação de ectomicorrizas com <i>P.tinctarius</i> <i>in vitro</i> no clone híbrido <i>E.urophylla</i> x <i>E.grandis</i> (H4/89), em substrato de feltro e meio líquido para enraizamento com 4g de sacarose por litro . (2º ensaio).....	34
4.4. Inoculação de ectomicorrizas com <i>P.tinctarius</i> <i>in vitro</i> no clone híbrido <i>E.urophylla</i> x <i>E.grandis</i> (H4/89), em substrato de feltro e meio líquido para enraizamento com 4g de sacarose por litro . (3º ensaio).....	36
4.5. Desenvolvimento de ectomicorrizas em "plantlets" do híbrido <i>E.urophylla</i> x <i>E.grandis</i> (H4/89), após transferência para viveiro em tubetes com diferentes níveis de composto orgânico e fósforo no substrato.....	40
4.5.1. Desenvolvimento de ectomicorrizas nos tubetes após 90 dias em condições de viveiro.....	40
4.5.2. Desenvolvimento das mudas no viveiro.....	50
5. CONCLUSOES.....	55
6. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	60

LISTA DE TABELAS

página

Tabela	1. Análise química do solo*, para diferentes níveis de fósforo (P) e composto orgânico (C.O.) aplicados.....	27
Tabela	2. Crescimento de <i>P.tinctorius in vitro</i> em diferentes concentrações de carboidratos no meio MNM e no meio para enraizamento.....	30
Tabela	3. Inoculação de ectomicorrizas com <i>P.tinctorius in vitro</i> em um clone de <i>E.urophylla</i> (C ₁) e um híbrido <i>E.urophylla</i> x <i>E.grandis</i> , em substrato de tecido não tramado (Coursel) e meio líquido para enraizamento.(1º ensaio).....	32
Tabela	4. Inoculação de ectomicorrizas com <i>P.tinctorius in vitro</i> no clone híbrido <i>E.urophylla</i> x <i>E.grandis</i> (H4/89) em substrato de feltro e meio líquido para enraizamento com 4g de sacarose/l, após duas semanas . (2º ensaio).....	36
Tabela	5. Inoculação de ectomicorrizas com <i>P.tinctorius in vitro</i> no clone H4/89 em substrato de feltro e meio líquido para enraizamento com 4g de sacarose/l, após duas semanas.(3º ensaio).....	36
Tabela	6. Porcentagem de ectomicorrizas visualmente estimadas no sistema radicular de mudas do clone H4/89, 90 dias após transplante para tubetes em condições de viveiro, com diferentes níveis de composto de casca de eucalipto e fósforo aplicados.....	41
Tabela	7. Porcentagem de secções radiculares micorrizadas no clone H4/89, 90 dias após transplante para tubetes em condições de viveiro, em diferentes níveis de composto de casca de eucalipto e fósforo aplicados.....	48

- Tabela 8. Altura das mudas inoculadas *in vitro* do clone H4/89, após 90 dias em tubetes em condições de viveiro, em diferentes níveis de composto de casca de eucalipto e fósforo aplicados.....51
- Tabela 9. Diâmetro das mudas inoculadas *in vitro* do clone H4/89, após 90 dias em tubetes em condições de viveiro, em diferentes níveis de composto de casca de eucalipto e fósforo aplicados.....53
- Tabela 10. Peso da matéria seca da parte aérea das mudas do clone H4/89 inoculadas *in vitro* após 90 dias em tubetes em condições de viveiro, em diferentes níveis de composto de casca de eucalipto e fósforo aplicados.....55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Colonização ectomicorrizica de "plantlets" de *E. urophylla* (C₁) inoculados *in vitro* em substrato de tecido não tramado (Coursel) e meio para enraizamento após 28 dias38
- Figura 2. Formação de ectomicorrizas no clone H4/89 inoculados *in vitro*, em tubete após 90 dias em condições de viveiro, no tratamento com 30ppm de fósforo e 0% de composto de casca de eucalipto.....39
- Figura 3. Efeito de 4 níveis de fósforo (P) aplicado no desenvolvimento de ectomicorrizas, para 4 doses de composto de casca de eucalipto.....46
- Figura 4. Efeito de 4 doses de composto orgânico(C.O.) no desenvolvimento de ectomicorrizas, para 4 níveis de fósforo aplicado (P).....47

EFEITO DA MATÉRIA ORGÂNICA E DO FÓSFORO NO
DESENVOLVIMENTO DE ECTOMICORRIZAS EM "PLANTLETS" DE
Eucalyptus INOCULADAS *in vitro* COM *Pisolithus tinctorius*.

Autor: Marco Antonio Galli

Orientador: Tasso Leo Krugner

RESUMO

"Plantlets" de *Eucalyptus urophylla* e de um híbrido de *E.urophylla* x *E.grandis* foram inoculadas *in vitro* com discos de agar com micélio de *Pisolithus tinctorius* em substrato de tecido não tramado (Coursel) umidecido com meio de enraizamento. Após 28 dias de incubação em câmara de crescimento, 70 e 76% dos tubos inoculados apresentaram colonização ectomicorrízica *in vitro*, respectivamente para cada clone.

Testes de crescimento micelial de *P.tinctorius* *in vitro* permitiram reduzir a concentração de açúcares no meio de cultura de 28g/l para até 4g/l, sem reduzir significativamente o desenvolvimento micelial. Também não houve diferença entre a utilização de glucose ou sacarose como fonte de carbono para o fungo.

Dois experimentos foram conduzidos com outro clone (híbrido de *E.urophylla* x *E.grandis*) inoculado *in vitro* em

meio líquido com 4g de sacarose/l como fonte de carbono em substrato de feltro. Após 28 dias de incubação em câmara de crescimento, 69,6 e 93,9% dos "plantlets" inoculados apresentaram formação de ectomicorrizas respectivamente em cada experimento. "Plantlets" micorrizados do segundo experimento foram transferidos para casa de vegetação com temperatura e umidade controladas, em tubetes contendo solo arenoso misturado com 4 doses de composto orgânico na forma de casca de eucalipto (0; 20; 40; e 60% V/V), combinadas com 4 níveis de fósforo aplicados (0; 30; 60; e 90ppm). O transplante em casa-de-vegetação permitiu 100% de pegamento das "plantlets". Noventa dias após a transferência dos tubetes para as condições de viveiro, nos níveis de 0 e 30ppm de fósforo aplicado. A adição de composto orgânico aumentou o crescimento das mudas. A matéria orgânica reduziu drasticamente o desenvolvimento ectomicorrízico no nível de 30ppm de fósforo. Nos níveis de 60 e 90ppm não houve efeito da adição de composto orgânico. O desenvolvimento ectomicorrízico no geral foi baixo. Na ausência de composto orgânico, houve maior desenvolvimento de ectomicorrizas com 30ppm de fósforo aplicado e maior crescimento das mudas com 60ppm de fósforo aplicado. Na presença de composto orgânico não houve efeito de fósforo aplicado, tanto no crescimento das mudas como no desenvolvimento ectomicorrízico.

EFFECT OF ORGANIC MATTER AND PHOSPHORUS ON THE
ECTOMYCORRHIZAL DEVELOPMENT OF *Eucalyptus* PLANTLETS
INOCULATED *in vitro* WITH *Pisolithus tinctorius*.

Author: Marco Antonio Galli

Adviser: Tasso Leo Krugner

SUMMARY

Plantlets of two clones (*Eucalyptus urophylla* and a hybrid of *E.urophylla* x *E.grandis*) were inoculated *in vitro* with mycelial agar discs of *Pisolithus tinctorius* in a syntetic fiber substract (Coursel) moistened with a rooting medium. After 28 days of incubation in a growing chamber, 70 and 76% of the inoculated test tubes showed ectomycorrhizal colonization for each clone respectively.

Mycelial growth of *P.tinctorius in vitro* was not significantly reduced by decreasing the sugar concentration in the culture medium from 28 to 4 g/liter. There was also no diference between glucose and sucrose as the carbon source for the fungus.

Two *in vitro* inoculation sets of another clone (hybrid of *E.urophylla* x *E.grandis*) were also performed by using a felt rooting substrate moistened with a nutrient medium containing 4g sucrose/liter. After 28 days of incubation in a growing chamber, 69,6 and 93,9% of the inoculated test

tubes showed formation of ectomycorrhizae in each inoculation set, respectively. Mycorrhizal plantlets of the second inoculation set were transferred to a greenhouse with controlled temperature and moisture, after being transplanted to polyethylene tubes containing a sandy soil to which 4 doses of an organic matter compost of *Eucalyptus* bark were added (0; 20; 40 and 60% V/V), combined with 4 levels of applied phosphorus (0; 30; 60 and 90ppm). A 100% survival index was obtained for the transplanted seedlings. After a 90 days growing period under nursery conditions, the addition of organic matter at the 30ppm level of applied phosphorus reduced drastically the ectomycorrhizal development. Ectomycorrhizal development was in general low. At the 0 and 30ppm of applied phosphorus the application of organic matter increased significantly the growth of the plantlets, whereas at the 60 and 90ppm levels no effect of organic matter was observed. In the absence of applied organic matter, the best ectomycorrhizal development was obtained at the 30ppm of phosphorus applied, whereas the highest plantlet growth was obtained at the 60ppm of phosphorus applied. In the presence of applied organic matter, the phosphorus application did not affect both plantlet growth and ectomycorrhizal development.

INTRODUÇÃO:

Associações com fungos ectomicorrízicos são características de espécies de *Eucalyptus*, e aumentam a absorção dos nutrientes de baixa mobilidade no solo (TRAPPE, 1987; MALAJCZUK *et alii*, 1982; TONKIN *et al.* 1988). Pesquisas nessa área têm demonstrado sua capacidade em estimular o crescimento e sobrevivência de seus hospedeiros em condições adversas. Tais benefícios têm estimulado o desenvolvimento de técnicas de inoculação para produção de mudas com micorriza.

As técnicas desenvolvidas para inoculação, que incluem a adição de grandes quantidades de inóculo e incorporação ao substrato, frequentemente apresentam resultados irregulares em viveiros (KRUGNER, 1985; VIDA, 1989). A técnica de inoculação *in vitro* apresenta alta eficiência para *Eucalyptus*, obtendo-se rápida formação de micorriza, com pequena quantidade de inóculo (MALAJCZUK & HARTNEY, 1986; POISSONNIER, 1986; VIDA, 1989). Essa técnica, associada à produção de mudas micropropagadas, permite a obtenção de mudas clonadas micorrizadas, possibilitando avaliar o uso dessa técnica na produção de mudas comerciais.

Em trabalho desenvolvido por VIDA (1989) embora tenha ocorrido alta eficiência nas inoculações na fase axênica, na

fase de pós-transplante essa eficiência não foi mantida. Ficou evidente , que a presença de carboidratos solúveis no meio de cultivo *in vitro* exerce efeito negativo no desenvolvimento subsequente das micorrizas após o transplante para substrato de viveiro. Uma redução no teor dessas substâncias compatível com o desenvolvimento adequado de micorrizas, pode favorecer a associação no viveiro. Além disso, o emprego de um substrato de manuseio mais prático que vermiculita/turfa , deve trazer benefícios adicionais .

Na fase de viveiro, por sua vez, as condições de pós-transplante devem ser melhoradas, utilizando casa de vegetação com temperatura e umidade controladas, a fim de minimizar o estresse sofrido pelas mudas ao sair do laboratório.

Fatores físicos, químicos e biológicos do substrato que condicionam também o bom desenvolvimento das mudas com micorrizas, como tipo e teor de matéria orgânica (BETTIOL, 1984; REDDELL & MALAJCZUK, 1984) e o teor de fósforo (SOARES, 1985; VIEIRA & PERES, 1988a; VIEIRA & PERES, 1988b), devem também ser considerados na otimização do desenvolvimento micorrízico.

Tendo em vista esses problemas, os objetivos do presente trabalho são:

a) o desenvolvimento de uma técnica que viabilize a inoculação de fungos micorrízicos *in vitro* em mudas micro-propagadas, a partir de substratos sintéticos (fibras) e meio de cultivo com doses mínimas de carboidratos solúveis;

b) obter condições favoráveis de pós-transplante, utilizando casa de vegetação com temperatura e umidade controladas;

c) definir teores de matéria orgânica e níveis de fósforo adequados para formação de mudas micorrizadas em viveiros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais

Tem havido por parte dos pesquisadores, um aumento pelo interesse em associações simbióticas entre os organismos vivos, indicando que as associações mutualísticas ocorrem naturalmente entre os seres vivos, sendo de importância maior do que se havia pressuposto anteriormente (HARLEY & SMITH, 1983).

Os fungos ectomicorrízicos nem sempre estão presentes no solo, ou se estão, podem não ser específicos, ou ainda estar em baixa densidade de inóculo. De ocorrência natural em florestas de eucalipto, *Pisolithus tinctorius* é um fungo ectomicorrízico com crescimento satisfatório em meio de cultura, possibilitando a produção de inóculo para formação de mudas para reflorestamento (KRUGNER, 1985). Esse fungo é um gasteromiceto (ordem Sclerodermatales), ecologicamente adaptado a solos de baixa fertilidade e outras condições adversas de ambiente, situações que prevalecem na maior parte dos solos destinados para reflorestamentos (VIDA, 1989).

Ectomicorrizas são características de todas espécies de *Eucalyptus* examinadas por MALAJCZUK *et alii* (1982).

Segundo SOARES (1985), a ocorrência natural de *P.tinctorius*, tem sido registrada em povoamentos de eucalipto no Brasil. Contudo, o seu desenvolvimento em viveiro é raro, atribuindo-se isso, às adubações efetuadas no substrato, principalmente com adubos fosfatados e nitrogenados. Esse autor consira importante, a introdução em áreas novas, de espécies fúngicas que apresentem alta eficiência micorrízica e adaptação às condições ecológicas prevalecentes.

Um grande número de espécies hospedeiras foram encontradas associando-se a *P.tinctorius* formando ectomicorrizas *in vitro* (MEYER, 1973; ZAK, 1976). No entanto, síntese de micorriza *in vitro* não significa a sua ocorrência em condições naturais (VIDA, 1989).

A formação de micorrizas em condições axênicas está na dependência de vários fatores, mas o principal é a natureza do substrato, notadamente no que concerne à pH, aeração e umidade (POISSONNIER, 1986). Segundo esse autor, as vantagens de se trabalhar em condições axênicas são: a eliminação dos contaminantes na micorrização; e controlar as condições para o desenvolvimento da micorriza, como substrato, temperatura, luz e meio de síntese.

A produção de mudas com micorriza em escala comercial é dificultada, principalmente pelos seguintes fatores: metodologia inadequada para inoculação (VIDA,

1989); adequação dos substratos para formação das mudas; e seleção de isolados mais eficientes (VIEIRA & PERES, 1988). Também os elevados níveis de nutrientes para rápida produção de mudas comerciais, prejudicam o estabelecimento de associações com fungos micorrízicos (KRUGNER, 1985).

A necessidade de associação micorrízica para algumas espécies florestais utilizadas em plantações comerciais foi verificada por vários autores (MIKOLA, 1973; MARX, 1980; TRAPPE, 1987), e concluíram que a inoculação com fungos ectomicorrízicos era imprescindível para a introdução de muitas espécies de *Pinus sp.* em áreas novas.

Os viveiros florestais usam diversos substratos (misturas artificiais) para produção de mudas em tubetes. Essas misturas geralmente inibem a formação de fungos micorrízicos (TRAPPE, 1987); sugerindo o desenvolvimento de pesquisas nessa área para adequar os substratos à produção de plântulas inoculadas.

A micropropagação de árvores com características desejáveis é de grande importância nos programas de regeneração de florestas (MALAJCZUK & HARTNEY, 1986). Além disso, a inoculação de plântulas com fungos micorrízicos adequados para melhorar a sobrevivência e o crescimento após o transplante está sendo largamente praticado em florestas de coníferas nos E.U.A. (MARX *et alii*, 1984).

MALAJCZUK & HARTNEY (1986) inocularam "plantlets" de *Eucalyptus sp.* *in vitro* com uma série de fungos ectomicorrízicos em meio para cultura de raízes, e

transplantaram após duas semanas para tubetes, conseguindo sobrevivência maior que os controles não inoculados. Após doze semanas, o aumento de crescimento de "plantlets" inoculados não diferiu significativamente dos controles não inoculados. Esses resultados indicam que a inoculação de "plantlets" com fungos micorrízicos é possível tanto em meio de cultura para os fungos (MMM) como em meio para cultura de raízes.

Sob condições de moderada deficiência nutricional no viveiro, mesmo que mudas com abundante micorriza possam ter igual ou menor tamanho que mudas não inoculadas, após seu breve crescimento no viveiro, o mais importante é a performance dessas mudas no campo após o transplante (MARX & KENNEY, 1982). Os resultados no campo, especialmente em locais adversos podem justificar a inoculação destes, mesmo com atraso para produção da muda devido a baixa fertilidade necessária no viveiro.

2.2 Fatores que influenciam o desenvolvimento da associação no viveiro:

2.2.1 Efeito da matéria orgânica

O estabelecimento e desenvolvimento de micorrizas é um processo controlado por fatores inter-relacionados, que podem ser determinados pelo hospedeiro, pelo fungo, pelas condições do solo e do ambiente. Entre esses fatores, uma moderada deficiência nutricional (principalmente nitrogênio e fósforo), e uma quantidade adequada de matéria orgânica que proporcione boa umidade e aeração, são considerados de maior importância para formação de ectomicorrizas (MALAJCZUK *et alii*, 1982; HARLEY & SMITH, 1983; BETTIOL, 1984; SOARES, 1985; VIEIRA & PERES, 1988; VIDA, 1989).

A obtenção de mudas com máxima quantidade de micorrizas, através de inoculação artificial, depende entre outros fatores, do tipo e quantidade de matéria orgânica presente no substrato de crescimento das mudas. A matéria orgânica, tem mostrado resultados controversos. BETTIOL (1984) verificou uma redução na sobrevivência de fungos micorrízicos no solo com a adição de matéria orgânica. LEE (1982) verificou que o efeito estimulante de *P. tinctorius* em *Pinus sp.* foi maior em solos arenosos e argilosos com adição de matéria orgânica. ALLISON (1973) cita que a formação natural de micorrizas pode ser favorecida por abundante teor de matéria orgânica no solo.

Estes relatos encontrados na literatura, indicam que a matéria orgânica tem efeito variável, de acordo com a fonte e com o tipo de microrganismo utilizado.

SLANKIS (1974), citado por BETTIOL (1984), verificou que plântulas de *Pinus* não formam micorrizas em solos

contendo menos que 2% de humus, ao passo que desenvolve grandes quantidades quando o teor de humus é superior a essa porcentagem.

Estudando o efeito de algumas fontes de matéria orgânica na formação de micorriza com *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, BETTOL (1984) verificou que o lodo de esgoto adicionado mesmo em doses pequenas (10% V/V), reduziu acentuadamente a associação, enquanto o esterco de curral, torta de filtro e acículas de *Pinus*, só inibiram a associação quando adicionados a 50% do volume. Segundo esse autor, o efeito negativo da matéria orgânica no desenvolvimento da associação, é devido à presença de ácidos húmicos e ácidos fúlvicos presentes na matéria orgânica em decomposição.

Nesse mesmo contexto, tentando aproveitar acículas de *Pinus* para formação de mudas, AUER & KRUGNER (1983) verificaram que 10% de acículas em decomposição não afetou a formação e micorrizas por *P.tinctarius* inoculado artificialmente, mas estimulou o desenvolvimento de mudas de *Pinus oocarpa*.

2.2.2 Efeitos nutricionais

Os efeitos nutricionais para o desenvolvimento de micorriza podem aparecer na cultura *in vitro* ou no substrato de viveiro.

Testando o crescimento de *P.tinctorius* *in vitro* em meio de cultura, VIEIRA & PERES (1988a) observaram que isolados desse fungo mantinham as mesmas taxas de crescimento de 1 a 128ppm de fósforo no meio de cultura. SOARES(1985), realizando o mesmo teste, observou que o crescimento em meio de cultura não foi alterado pelas concentrações de fósforo de 0 a 64 ppm.

Embora a concentração de fósforo no meio de cultura pareça pouco alterar a taxa de crescimento dos isolados e formação de micorriza para tratamentos realizados no solo, o nível de fósforo é fator determinante no estabelecimento da associação (VIEIRA & PERES,1988b).

POISSONNIER (1986) considera importante o balanço de nutrientes na composição do meio de síntese, o qual deve ser suficientemente rico para permitir a sobrevivência da planta e dar continuidade ao desenvolvimento do fungo, porém pobre o bastante para permitir a fase simbiótica.

BOWEN (1973) relatou que a extensão da resposta dos fungos ectomicorrízicos depende do nível de nutrientes no solo. De um modo geral, a eficiência na utilização de nutrientes pelas mudas micorrizadas é maior nos níveis mais baixos de nutrientes no solo.

MULLETTE (1976) obteve alta taxa de infecção micorrízica com o fungo *P.tinctorius* somente quando os teores de fósforo extraíveis do solo pelo método Mehlich 1 foram de 1 a 5 ppm, mostrando que a formação de ectomicorrizas em *E.gummifera* com *P.tinctorius* foi afetada

pela concentração desse elemento. PICHE & FORTIN (1982) observaram que o aumento na concentração de fosfato no substrato resultava num decréscimo na porcentagem de ectomicorrizas quando o nitrogênio era mantido constante.

Num estudo do efeito da fertilidade do solo na suscetibilidade de *Pinus taeda* em formar micorrizas com *P.tinctarius*, MARX (1977) verificou que a formação foi maior nas mudas desenvolvidas em condições de baixa fertilidade do que em níveis altos de fósforo e nitrogênio.

MENGE *et alii* (1978), utilizando a técnica de raízes subdivididas e solo com baixo e alto teor de fósforo, demonstraram que o aumento da concentração de fosfato na planta reduziu a infecção das raízes por fungos ectomicorrízicos.

Com o objetivo de determinar o nível de fósforo no solo favorável à atividade da associação micorrízica entre *P.tinctarius* e plântulas de *E.grandis*, SOARES (1985) conduziu um experimento em latossolo vermelho escuro com vários níveis de fósforo. O desenvolvimento de ectomicorrizas nesse substrato foi inibida a 160 ppm de fósforo aplicado. Os efeitos da micorrização no crescimento e absorção de nutrientes pelas mudas foram positivas entre os níveis de 0,8 a 8,6ppm de fósforo extraídos por Mehlich 1 aos 77 dias após a inoculação. Esse autor observou que, quanto maior o suprimento de fósforo para a planta menor foi a formação de ectomicorrizas, devido ao aumento da concentração desse elemento na planta e não pelo efeito

direto da concentração de fósforo no solo. Contudo, o estabelecimento da associação foi conseguido até 13 ppm de fósforo extraível. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores para infecções com endomicorrizas.

Embora para *Eucalyptus* sp. a eficiência micorrizica decresce com o aumento da concentração de fosfato no solo, observou-se que nos níveis mais baixos o desenvolvimento das mudas é inferior (VIEIRA & PERES, 1988). Os níveis de fósforo e nitrogênio em viveiros comerciais são altos e inibem a infecção micorrizica (SOARES, 1985; VIEIRA & PERES, 1988).

HARLEY & SMITH (1983) relataram que para fungos endomicorrizicos, a redução na infecção se relacionava com a alta concentração de fósforo no hospedeiro, e que a viabilidade desses fungos é mais afetada pela concentração desse elemento no hospedeiro que no solo. SOARES (1985), trabalhando com ectomicorrizas, sugeriu que a concentração de N P K na planta controla a infecção por ectomicorrizas.

Trabalhando com diferentes níveis de fósforo no solo, MALAJCZUK et alii (1975) observaram em *E. calophylla* inoculados com *P. tinctorius*, que o aumento dos níveis de fosfato no solo resultou em menor efeito das micorrizas na absorção desse elemento. MULLIGAN & PATRICK (1985) também constataram que o aumento na aquisição de fósforo por plântulas de *E. pilularis* devido à associação micorrizica em solo deficiente em fósforo foi superior do que em solos fertilizados. Para comprovar isso, esses autores utilizaram fósforo marcado.

2.2.3 Outros fatores

O estabelecimento de associação micorrízica *in vitro* e sua continuidade em condições de viveiro, tanto no aspecto quantitativo como qualitativo, está sob a influência de vários outros fatores, que podem ser do próprio hospedeiro ou de origem externa.

Os fungos micorrízicos e a atividade das raízes de árvores são afetadas desfavoravelmente por extremos de umidade no solo. Sob condições de baixa umidade pode ocorrer perda de turgescência das células. Enquanto em solos muito úmidos a deficiência de oxigênio limitam severamente a atividade fúngica. Os fungos ectomicorrízicos são fortemente aeróbicos e requerem boa aeração para seu desenvolvimento nas raízes. Segundo BOUGHER & HALAJCZUK (1989), o esgotamento do oxigênio no solo não sómente modificam as propriedades físico-químicas do solo, mas também alteram a fisiologia das raízes de modo a alterar sua permeabilidade aos nutrientes. Consequentemente, a infecção micorrízica, seu desenvolvimento e subsequente absorção de fósforo são prejudicados por excesso de umidade.

As características biológicas do substrato de viveiro é um outro fator que pode interferir no estabelecimento da associação. O efeito da microflora

presente no solo ou no substrato de formação de mudas é negativo ao desenvolvimento de micorrizas VIDA (1989), sugerindo que a presença de carboidratos no meio de síntese aumenta a contaminação por saprófitas após o transplante do laboratório para o viveiro, resultando em menor desenvolvimento de micorrizas.

Bactérias saprofíticas presentes no solo comumente apresentam um efeito deletério sobre fungos ectomicorrízicos MARX (1973). Em condições axênicas, VIDA (1989) verificou que quando as plântulas estão contaminadas por *Penicillium* sp. não ocorreu infecção por *P.tinctorius*.

Segundo MARX & KENNEY (1982), inóculo de fungos ectomicorrízicos produzidos em turfa-vermiculita, adicionados ao solo torna-se rapidamente colonizado por microrganismos saprófitas devido ao alto teor de carbono orgânico no meio de síntese. Isso resulta na redução da eficiência do inóculo. Para diminuir esse problema deve-se reduzir ao máximo a concentração de açúcares no meio para produção de inóculo.

DUDDRIDGE (1986) destaca a importância do teor de açúcares disponíveis no meio de síntese de micorrizas afirmando que somente em níveis baixos de carboidratos a infecção torna-se eficiente. VIDA (1989) conseguiu maiores porcentagens de ectomicorrizas com *P.tinctorius*, em vasos contendo solo arenoso, quando inoculou os "plantlets" *in vitro* em meio mineral sem fonte de carbono orgânico, este

resultado evidencia a importância do resíduo de açúcares no meio de síntese na recolonização do solo após o transplante.

A presença abundante de carboidratos no meio de síntese induziu pronunciada resposta na produção de compostos fenólicos nos tecidos radiculares (GODEBOUT & FORTIN, 1985; MALAJCZUK *et alii* 1987). Resultados contraditórios a estes foram obtidos por PICHÉ *et alii* (1981) que não encontraram diferença nos compostos fenólicos de raízes micorrízicas e não micorrízicas de *Pinus strobus* infectados por *P.tinctorius*, concluindo que os compostos fenólicos são inerentes à planta hospedeira e não foram produzidos em resposta à infecção.

O tempo de incubação do fungo ectomicorrízico dentro do tubo de ensaio com o "plantlet", é um fator importante para o sucesso da colonização do sistema radicular e vigor após o transplante. MALAJCZUK (1986), sugere duas semanas de incubação antes do transplante para viveiro, podendo variar esse período de acordo com o crescimento do fungo. Similarmente, as condições que governam o desenvolvimento de abundante ectomicorrizas após o transplante, como fertilização e misturas no solo necessitam ser definidos.

POISSONNIER (1986), conseguiu boa quantidade de micorrizas em condições axênicas após 3 a 4 semanas, a partir de discos de micélio de *P.tinctorius* e *Paxillus involutus*.

O estado fisiológico do fungo simbiote é importante no que concerne ao poder de infecção deste. Igualmente, o

estado receptivo da planta hospedeira, que deve ser compatível com o fungo facilitando o processo de infecção (POISSONNIER, 1986). Segundo VIDA (1989), há evidências que a idade da colônia para inóculo e a retirada de discos de micélio das bordas de crescimento ativo aumentam o poder de infecção do inóculo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Produção de "plantlets"

As "plantlets" utilizadas nos experimentos foram obtidas a partir de metodologia desenvolvida por GONÇALVES (1975, 1980), e utilizada por VIDA(1989). Os experimentos foram montados com um clone comercial, híbrido *E.urophylla* x *E.grandis* codificado como H4/89, exceto no primeiro experimento *in vitro* que utilizou um clone de *E.urophylla* escolhido ao acaso para estudos. A metodologia para micropropagação e obtenção dos "plantlets" é sucintamente descrita a seguir:

- a. Coleta de ramos em jardim clonal no Horto Mogi-Guaçu, SP;
- b. Transporte para laboratório em sacos plásticos com água;
- c. Lavagem em água, corte das folhas, desinfestação dos ramos com hipoclorito de sódio em câmara asséptica e lavagem em água destilada esterilizada por tres vezes;
- d. Cultivo dos explantes (segmentos nodais) em

tubos de ensaio com meio de cultura para multiplicação do material, utilizando hormônio regulador de crescimento 6-Benzilaminopurina (6-BAP), na concentração de 1 mg/litro. A incubação foi em câmara de crescimento à 28°C, com fotoperíodo de 16 horas de luz/dia, por um período de 30 - 40 dias;

e. Alongamento das gemas em meio contendo 1mg/l de Ácido-indol-acético (AIA) e 0,2mg/l de 6-BAP, em frascos para cultura de tecidos. A incubação foi nas mesmas condições anteriores, por um período de 30 dias;

f. Enraizamento dos "plantlets" alongados, que foram seccionados individualmente e pré-enraizados em frascos de vidro por 10 dias em meio semi-sólido contendo 0,2mg/l de Ácido-indol-butírico (AIB), na câmara de crescimento.

Ao iniciar o enraizamento (8 - 10 dias), os "plantlets" estavam prontos para serem inoculados com *Pisolithus tinctorius*.

Todos os meios utilizados, para crescimento de *P.tinctorius* e/ou cultivo e enraizamento dos "plantlets", foram ajustados pH 5.6 - 5.8, usando NaOH (1M).

3.2. Crescimento de *P.tinctorius* in vitro em diferentes concentrações e carboidratos no meio MNM e no meio de enraizamento.

O isolado de *P.tinctarius* utilizado no experimento foi obtido a partir de basidiocarpos coletados em um talhão de eucalipto, híbrido *E.urophylla* x *E.grandis*, clone H4/89, com três anos de idade, o qual foi codificado como CH1. Esse isolado foi cultivado em meio de cultura Melin-Norkrans modificado (Apêndice 2).

Com objetivo de ajustar um meio adequado à síntese *in vitro* para posterior desenvolvimento no viveiro, foram realizados testes de crescimento micelial *in vitro*, em diferentes concentrações de carboidratos no meio, visando reduzir a quantidade de carbono disponível no meio sem alterar significativamente o crescimento micelial. Essa redução na quantidade de açúcares no meio deve beneficiar o estabelecimento da associação em condições não axênicas após a saída do laboratório.

Para esse teste foi montado um experimento em laboratório com o isolado CH1. Utilizou-se meio MNM e meio para enraizamento sólido variando as concentrações de carboidratos como seguem: meio MNM completo (10g glucose + 3g extrato de malte) que serviu como controle, meios com 8; 4; 2; e 0g de glucose; meio para enraizamento completo (28g sacarose), e meios com 8; 4; 2; e 0g de sacarose.

Esse experimento foi montado em placas de Petri, com 12 tratamentos com 4 repetições por tratamento.

3.3. Produção de inóculo e inoculação *in vitro*

A produção de inóculo foi feita em meio MNM sólido. Para se obter discos de micélio bem consistentes o meio foi solidificado com 18g de ágar por litro, que facilita a manipulação e corte do inóculo. Foram transferidos três discos por placa de Petri. Após três semanas de crescimento no escuro, o inóculo estava pronto para utilização. Em geral, com três colônias bem desenvolvidas por placa, pode-se retirar até 60 discos de micélio somente das bordas das colônias.

Em todos os ensaios, o inóculo foi constituído de discos de meio de cultura contendo micélio em crescimento, retirados das bordas das colônias com vazador de 5mm. A utilização de inóculo das bordas das colônias garante crescimento ativo, não necessitando repicagem de pré-crescimento em meio de cultura antes da inoculação.

Em cada tubo de ensaio, foi colocado como inóculo dois discos de micélio por "plantlet", apoiados lateralmente ao substrato umedecido em meio de cultura.

A incubação foi em câmara de crescimento para "plantlets" micropropagados, a temperatura de 28°C e fotoperíodo de 14 x 10 horas de luz por dia.

Para cada ensaio definitivo, foi montado pelo menos um ensaio preliminar para adequar a metodologia e escolher o melhor substrato.

3.4. Ensaios de inoculação *in vitro*

3.4.1. Inoculação com *P.tinctorius* *in vitro* de um clone de *E.urophylla* e de um híbrido *E.urophylla* x *E. grandis* em substrato de tecido não tramado (Coursel). (1º ensaio).

Os "plantlets" utilizados nos experimentos foram obtidos pelo método descrito no item 3.1

Nesse experimento foi utilizado um clone de *E.urophylla* (C1) e um híbrido *E.urophylla* x *E.grandis*, com um isolado de *P.tinctorius* que em testes preliminares mostrou compatibilidade com o clone C1 e com o híbrido.

Em tubos de ensaio de 200 x 22mm colocou-se como substrato um cilindro de fibra de tecido não tramado com dimensões de 50 x 70mm, enrolado mantendo um pequeno orifício central. Esse substrato foi saturado com 10ml de meio para enraizamento líquido. Os tubos foram tampados e autoclavados à 121°C (1 atm) por 20 minutos.

Em câmara asséptica os "plantlets" alongados foram separados e introduzidos dentro dos tubos, no substrato acima descrito com uma pinça.

Esse material foi incubado em câmara de crescimento com fotoperíodo de 14 x 10 horas de luz fluorescente e temperatura de 28°C.

Após 10 dias, quando as raízes começaram a aparecer no substrato, realizou-se a inoculação com discos

de micélio em câmara asséptica. Colocaram-se 2 discos de micélio por tubo. O material foi incubado novamente em câmara de crescimento por mais 20 dias quando foi feita a avaliação.

3.4.2. Inoculação com *P.tinctorius* *in vitro* no clone híbrido *E.urophylla* x *E.grandis* (H4/89), em substrato de feltro e meio líquido para enraizamento com 4g de sacarose por litro. (2º ensaio).

O clone utilizado nesse experimento foi um híbrido de *E.urophylla* x *E.grandis* de uso comercial codificado como H4/89.

Neste experimento, foi realizado um pré-enraizamento das "plantlets" em meio de enraizamento semi-sólido, e quando as raízes se encontravam com 0,5 - 1,0 cm, foram retiradas desse meio e introduzidas no substrato de feltro e meio líquido para inoculação *in vitro*.

O substrato empregado para condução dos experimentos em cultura axênica, em tubos de ensaio de 200 x 22mm, constituiu-se de um cilindro de feltro de 60 x 30mm enrolado tipo rocambole. A esse substrato, foi adicionado 6ml de meio para enraizamento contendo 4g de sacarose por litro. Essa quantidade de sacarose foi determinada à partir de testes de crescimento de *P.tinctorius* *in vitro* (Tabela 1).

O feltro foi comparado com outros substratos em

testes preliminares, e mostrou-se um material inerte, prático, barato e de fácil manipulação evitando danos no sistema radicular durante a transferência para os tubetes.

Em seguida, os tubos foram tampados com algodão e gaze e autoclavados a 121°C (1atm) por 20 minutos.

Após resfriamento, em câmara asséptica de fluxo laminar, em cada tubo foi transferido com auxílio de pinça um "plantlet" pré-enraizado (5 - 10mm de raiz), colocado no orifício central do cilindro de feltro. Lateralmente a esse substrato, foram colocados na mesma ocasião, dois discos de micélio, um de cada lado. Foram inoculados 280 tubos de ensaio.

Depois de tampados, os tubos foram colocados em grades e incubados em sala de crescimento, à temperatura de 28°C e fotoperíodo de 16 x 8 horas de luz fluorescente por dia até a época da avaliação.

3.4.3. Inoculação com *P.tinctorius* *in vitro* no clone híbrido *E.urophylla* x *E.grandis* (H4/89) em substrato de feltro e meio líquido com 4g de sacarose por litro. (3º ensaio).

Seguindo a mesma metodologia do item anterior, com "plantlets" utilizados do mesmo clone (H4/89), que tiveram boa compatibilidade com o isolado CH1 de *P.tinctorius*, foram selecionados 360 "plantlets" pré-

enraizados para serem transferidos e inoculados em tubos.

Utilizou-se o mesmo substrato (feltro) com as mesmas dimensões e formato do experimento anterior. Os tubos de ensaio utilizados neste ensaio foram de 160 x 18mm por acondicionar melhor o substrato de feltro com o inóculo e ocupar menor espaço. O meio de enraizamento com 4g de glucose por litro, teve seu volume aumentado para 7ml por tubo, que saturou o substrato e ainda deixou um pequeno excesso no fundo do tubo, resolvendo o problema de falta de umidade no substrato após algumas semanas de incubação na sala de crescimento.

A transferência, inoculação e incubação dos "plantlets", seguiram o mesmo método descrito no experimento anterior. As avaliações sobre o desenvolvimento micelial e a formação de micorriza *in vitro*, foram feitas 28 dias após a inoculação.

Após 28 dias da inoculação, foram selecionados 288 "plantlets" micorrizicos para montagem do experimento no viveiro, testando níveis de fósforo e teores de composto orgânico na forma de casca de eucalipto compostada.

3.5. Desenvolvimento de ectomicorrizas e crescimento das "plantlets" do híbrido (H4/89) após transplante para viveiro em solo com diferentes níveis de fósforo e casca de eucalipto compostada.

Aos 30 dias após a inoculação as "plantlets" micorrizados foram transplantados para tubetes em casa-de-vegetação com temperatura e umidade controladas.

Nesse experimento, utilizou-se casca de eucalipto compostada como fonte de matéria orgânica, por ser uma fonte relativamente pobre em fósforo, de modo que possa ser adicionada ao substrato em quantidades relativamente altas, sem elevar os níveis desse elemento no substrato a ponto de inibir completamente a formação de micorriza.

A adubação básica em todo experimento foi constituída de 113 ppm de K na forma de cloreto de potássio e 100 ppm de N na forma de nitrato de amônio. O fósforo foi adicionado em quantidades variáveis que serão descritas adiante.

A análise química de rotina do solo utilizado, do composto de casca de eucalipto e dos tratamentos formulados encontram-se na Tabela 1.

A partir dos resultados da análise de solo, foi feita uma correção para o cálcio nos tratamentos com 0% de composto de casca de eucalipto, devido a ausência desse elemento verificada na análise do solo. Foi adicionado uma mistura na base de 4:1 de sulfato de cálcio e sulfato de magnésio respectivamente, para elevar os níveis desses nutrientes próximos aos demais tratamentos.

Para montagem do experimento no viveiro, a partir dos 360 "plantlets" inoculados *in vitro* foram selecionados

288 "plantlets" micorrizados, que constituíram 16 tratamentos em um delineamento experimental inteiramente casualizado.

Foram testados 4 níveis de fósforo (0; 30; 60; e 90 ppm), adicionados na forma de fosfato dibásico de potássio ($\text{KH}_2(\text{PO}_4)_2$), combinados com 4 níveis de composto orgânico (0; 20; 40; e 60% V/V) na forma de casca de eucalipto compostada.

Tabela 1. Análise química do solo*, para diferentes níveis de fósforo(P) e composto orgânico(C.O.) aplicados.

amostra

P	C.O.	pH	M.O	P	K	Ca	Mg	H+Al	S	T	V%
ppm	%		%	ppm				meq/100	cm ³		
0	0	4,3	0,9	2	0,30	0,0	0,1	2,0	0,4	2,4	15,6
0	20	5,9	1,2	6	0,54	5,1	1,7	2,2	7,3	9,7	76,9
0	40	6,1	1,4	12	0,72	9,3	2,9	2,2	13,0	15,2	85,5
0	60	6,2	1,8	23	0,84	14,2	4,1	2,5	19,1	21,6	88,4
30	0	4,5	0,8	15	0,34	0,0	0,1	2,0	0,4	2,4	16,3
30	20	6,0	1,3	26	0,40	6,2	1,8	2,2	8,4	10,6	79,3
30	40	6,1	1,5	38	0,54	8,2	2,5	2,2	11,2	13,4	83,6
30	60	6,2	1,8	45	0,66	12,6	3,3	2,5	16,6	19,1	86,9
60	0	4,5	0,8	36	0,30	0,0	0,0	2,0	0,3	2,3	14,2
60	20	5,9	1,3	49	0,38	5,5	1,6	2,2	7,5	9,7	77,2
60	40	6,1	1,5	65	0,45	8,5	2,3	2,5	11,3	13,8	81,9
60	60	6,2	1,8	81	0,69	14,7	3,9	2,5	19,4	21,8	88,5
90	0	4,5	0,9	55	0,27	0,0	0,1	2,0	0,3	2,3	14,5
90	20	5,9	1,2	88	0,34	6,2	1,7	2,2	8,2	10,4	78,9
90	40	6,1	1,4	121	0,56	8,7	2,4	2,2	11,7	13,9	84,1
90	60	6,2	1,8	123	0,54	11,55	3,3	2,5	15,4	17,9	86,1
0	100	6,5	3,2	76	0,96	42,16	7,0	2,5	50,1	52,7	95,2

* Laboratório do setor de Solos e Nutrição Florestal-ESALQ.

Depois de transplantadas, as "plantlets" ficaram por 7 dias na casa de vegetação com 90% de umidade relativa e temperatura de 26°C, para facilitar o pegamento. Após esse período, o experimento ficou mais 7 dias sob um telado com 50% de sombra, após o qual foi colocado ao sol direto.

Após os primeiros 30 dias foram realizadas adubações nitrogenadas a cada 10 dias com nitrato de amônio ($\text{NH}_4(\text{NO}_3)$), na base de 25 ppm por tubete através de uma seringa dosadora. Essa reposição do nitrogênio teve a finalidade de amenizar os sintomas de deficiência (avermelhamento das folhas) e estimular o crescimento.

Os resultados foram avaliados após 90 dias, sendo considerados além da porcentagem de micorrizas observadas externamente, o diâmetro do colo (mm), a altura (cm), e o peso de matéria seca (g) da parte aérea.

Para confirmar o estabelecimento da associação, foram avaliados ainda a porcentagem de cortes de raízes com micorrizas, sendo retirados pelo menos 150 cortes de cada tratamento e feito no mínimo 50 observações por tratamento. Para a avaliação dos cortes, as amostras após lavagem em água e conservação em FAA (formol - ácido acético - álcool), foram colocadas em cubetas de 1,5 x 1,5 cm e solidificadas em ágar-água 1,2%. Após a solidificação, em micrótomo de congelamento, foram coletados cortes com 20 micrômetros de espessura e corados com lactofenol mais azul algodão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Crescimento de *P.tinctorius* *in vitro* em diferentes concentrações de carboidratos no meio MNM e no meio de enraizamento.

Os resultados deste teste de crescimento *in vitro* permitiram reduzir a concentração de glucose no meio para até 4g/l sem diminuir significativamente o crescimento micelial do fungo (Tabela 2).

Após três semanas de crescimento em placas de Petri houve uma redução na taxa de crescimento do fungo no meio com 4g de carboidratos por litro, provavelmente devido a menor disponibilidade dessa fonte de carbono no meio.

Após 28 dias de crescimento, não houve diferença significativa no diâmetro das colônias nos meios com mais de 4g de carboidratos/l. Nos meios com 2g/l e sem carboidratos (mineral) o fungo cresceu, aparentemente a partir de reservas contidas no próprio disco de inóculo, reduzindo sua taxa de crescimento já a partir da primeira semana.

Tabela 2. Crescimento de *Pisolithustinctorius* *in vitro* em diferentes concentrações de carboidratos no meio MNM e no meio para enraizamento.

Meios	Concentrações de carboidratos (g/l) *				
	completo	8	4	2	0
MNM (glucose+ extr.malte)	69,5 a**	68,2 a	65,2 a	41,7 b	16,7 c
Enraizamento (sacarose)	69,7 a	67,7 a	64,1 a	32,7 b	11,0 c
Médias	69,6 a	67,9 a	64,6 a	37,2 b	13,8 c

* Médias de 4 repetições.

** Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si (Tukey - 5%).

A partir desses resultados obtidos foram padronizados nos experimentos seguintes meio para enraizamento com 4g de sacarose/l

4.2. Inoculação de ectomicorrizas com *P.tinctorius* *in vitro* em um clone de *E.urophylla* (C1) e um híbrido *E.urophylla* x *E.grandis*, em substrato de tecido não tramado (Coursel) e meio líquido para enraizamento (1º ensaio).

O substrato empregado neste experimento apresentou

ótima capacidade de retenção de meio líquido, conservando-se úmido até 40 dias após a inoculação.

Esse material além de ser de manipulação prática, facilitou a introdução dos "plantlets" ao centro do substrato e permitiu a inoculação de discos de micélio lateralmente, sem causar danos às hifas que comprometem seu desenvolvimento no substrato e posterior infecção das raízes. Outra boa característica desse tipo de substrato é permitir a retirada do "plantlet" do tubo de ensaio após a micorrização sem causar injúrias ao sistema radicular (Figura 1), como acontece quando o substrato é composto basicamente por vermiculita e turfa, utilizado por VIDA (1989). Os resultados dessa inoculação encontram-se na Tabela 3.

As diferenças nas porcentagens de colonização micorrízica dentro de cada clone (tabela 3), podem ser explicadas pelas condições em que foram enraizados as "plantlets". Neste experimento, não foi realizado um pré-enraizamento dos "plantlets" em meio de cultura sólido para posterior inoculação *in vitro*; estes foram separados após o alongamento e transferidos diretamente para o substrato de tecido não tramado com meio de enraizamento líquido. Deste modo, houve diferenças na quantidade e qualidade das raízes formadas, devido ao fato de que nem todos "plantlets" tiveram a mesma superfície de contacto com o meio de enraizamento após sua introdução no substrato.

Tabela 3. Inoculação de ectomicorrizas com *P.tinctorius* *in vitro* em um clone de *E.urophylla* (C1) e um híbrido *E.urophylla* x *E.grandis*, em substrato de tecido não tramado (Coursel) e meio líquido para enraizamento (1^m ensaio).

	% DE TUBOS INOCULADOS *	
	Clone C1 <i>E.urophylla</i>	Híbrido <i>E.Urophylla</i> x <i>E.grandis</i>
Formação completa de micorrizas (80 - 100%)	44	40
Formação parcial de micorrizas (até 80%)	26	36
Secamento dos "plantlets" e/ou ausência de micorrizas	20	14
Tubos contaminados	10	10
TOTAL	100	100

* Porcentagens obtidas a partir de 50 tubos de ensaio por clone.

Como o substrato é constituído por um rolinho tipo "rocambole", este tende a se abrir durante a manipulação para transferência do "plantlet" no seu interior, provocando um contacto desuniforme entre o tecido vegetal e o meio líquido, e em consequência disso um enraizamento pouco uniforme. Nos tubos em que isso ocorreu, houve secamento ou enraizamento deficiente dos "plantlets".

Onde houve secamento dos "plantlets" ou crescimento de microrganismos contaminantes, os tubos foram descartados.

Ficou claro que com um sistema radicular bem desenvolvido e ramificado, em contacto com um isolado específico ao hospedeiro, consegue-se facilmente 100% de raízes com micorrizas em condições axénicas (Figura 1).

O inóculo constituído de discos de micélio, deve ser colocado bem próximo à região onde estão saindo as primeiras raízes no substrato, de modo que possam se encontrar e iniciar a colonização logo nos primeiros dias.

Nos tubos em que os ápices radiculares demoraram algumas semanas para encontrar o micélio do fungo, ou o inóculo desceu para o fundo do tubo, não houve formação completa de micorrizas em todo sistema radicular. A formação de manto fúngico sómente ficou evidente quando o micélio atingiu as raízes nos primeiros dias de crescimento, confirmando que a infecção ocorre preferencialmente nos ápices radiculares (HARLEY & SMITH, 1983; VIDA, 1989).

4.3. Inoculação de ectomicorrizas com *P.tinctorius* *in vitro* no clone híbrido *E.urophylla* x *E.grandis* (H4/89), em substrato de feltro e meio líquido para enraizamento com 4g de sacarose/l (2º ensaio).

O substrato de feltro escolhido em testes preliminares, mostrou as mesmas características do tecido não tramado, constituindo um material inerte propício ao desenvolvimento das raízes e do fungo.

O pré-enraizamento resolveu o problema de secamento e falhas na formação de raízes ocorrida no experimento anterior. Contudo, houve desta vez um problema maior com o aparecimento de microrganismos contaminantes, conforme mostra a Tabela 4.

Após 12 dias de incubação foram descartados os tubos de ensaio que apresentaram contaminações ou secamento dos "plantlets", totalizando 30,3% do total.

O enraizamento dos "plantlets" foi mais uniforme e ramificado que no experimento anterior, iniciando a formação de micorrizas após uma semana. Após 12 dias já se observou a formação de manto fúngico, confirmando a existência de grande compatibilidade entre o clone utilizado e o isolado escolhido. (Figura 1).

Tabela 4. Inoculação de ectomicorrizas com *P.tinctorius* *in vitro* no clone híbrido *E.urophylla* x *E.grandis* (H4/89) em substrato de feltro e meio de enraizamento com 4g de sacarose/litro, após duas semanas. (2º ensaio).

	Nº de tubos	%
Formação de micorrizas *	195	69,6
Secamento dos "plantlets" ou ausência de micorrizas	12	4,3
Contaminações	73	26,1
Total	280	100,0

* Foi considerado como formação de micorriza raízes apresentando formação de manto fúngico característico.

Esses resultados mostram que houve formação de 69,6% de micorrização *in vitro*, resultado abaixo do esperado, devido a presença de outros microrganismos nos tubos. O problema de contaminantes em grande quantidade, reduziu o total

de mudas com formação de micorrizas.

- 4.4. Inoculação de ectomicorrizas com *P.tinctorius* in vitro no clone híbrido *E.urophylla* x *E.grandis* (H4/89), em substrato de feltro e meio líquido para enraizamento com 4g de sacarose/l. (3º ensaio).

Algumas modificações feitas, como volume de meio líquido, dimensões do tubo de ensaio e posição e vigor do inóculo, deram resultados satisfatórios aumentando a formação de micorrizas. Cuidados maiores tomados em relação a manutenção da assepsia durante a transferência e inoculação também foram importantes (Tabela 5).

O aumento de 1ml de meio líquido por tubo, favoreceu o crescimento ativo do inóculo por mais tempo, aumentando a área explorada pelo fungo e a quantidade de raízes colonizadas.

O uso de colônias jovens com aproximadamente 3 semanas de crescimento para inóculo e a retirada de discos apenas dos bordos de crescimento, praticamente não deixou falhas nos pontos de inoculação. O posicionamento do inóculo dentro dos tubos, foi feito colocando um disco na parte inferior do tubo e outro mais acima e do lado oposto,

formando dois pontos de crescimento equidistantes.

Os resultados desse experimento *in vitro* encontram-se na tabela a seguir:

Tabela 5. Inoculação de ectomicorrizas com *Fisolithus tinctorius* *in vitro* no clone híbrido *E.urophylla* x *E.grandis* (H4/89), em substrato de feltro e meio líquido para enraizamento com 4g de sacarose/l, após duas semanas (3^o ensaio).

	N ^o de "plantlets"	%
Com formação de micorrizas *	338	93,9
secamento dos "plantlets" ou ausência de micorrizas	18	5,0
Contaminações	4	1,1
Total	360	100,0

* Foi considerado como formação de micorrizas raízes apresentando manto fúngico característico, visível a olho nú.

A alta porcentagem de formação de micorriza nesse experimento *in vitro*, foi resultado do aprimoramento na técnica de transferência e inoculação, e permitiu selecionar "plantlets" micorrizados bem uniformes para montagem do experimento no viveiro (Tabela 5).

Figura 1. Colonização ectomicorrízica de "plantlets" de *E. urophylla* (C₁) inoculados *in vitro* em substrato de tecido não tramado (Coursel) e meio para enraizamento após 28 dias .

Figura 2. Formação de ectomicorrizas no clone H4/89 inoculados *in vitro*, em tubete após 90 dias em condições de viveiro, no tratamento com 30ppm de fósforo e 0% de composto orgânico aplicados.

4.5. Desenvolvimento de ectomicorrizas em "plantlets" do híbrido *E.urophylla* x *E.grandis* clone H4/89 , após transferência para viveiro em tubetes com diferentes níveis de composto de casca de eucalipto e fósforo no substrato.

Os "plantlets" na época do transplante (30 dias após a inoculação) apresentaram o sistema radicular bem desenvolvido e ramificado com elevada colonização ectomicorrízica.

No transplante em casa de vegetação, com umidade e temperatura controladas, após 8 dias fez-se uma avaliação do pegamento das mudas nos tubetes, conseguindo-se 100% de pegamento no transplante.

4.5.1. Desenvolvimento de ectomicorrizas nos tubetes após 90 dias em condições de viveiro.

Os resultados obtidos nesse experimento, permitiram tirar algumas conclusões sobre o tipo de matéria orgânica que deve ser utilizado para conseguir formação de ectomicorrizas em tubetes. O substrato à base de composto de casca de eucalipto e solo arenoso, embora longe ainda de ser o ideal, permitiu o desenvolvimento de micorriza em vários tratamentos (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Formação de ectomicorrizas visualmente estimadas* no sistema radicular de mudas do clone H4/89, 90 dias após transplante para tubetes em condições de viveiro, com diferentes níveis de composto de casca de eucalipto e fósforo aplicados.

Níveis de composto de casca de eucalipto (% V/V)					
Níveis de Fósforo(ppm)	0	20	40	60	Média
0	1,24	1,35	1,24	1,30	1,28
30	4,73	1,68	1,18	0,81	2,10
60	2,56	1,62	1,08	0,81	1,52
90	2,77	1,66	1,24	1,30	1,63
Média	2,82	1,58	1,18	0,94	

C.V. (%) 68,9

* Média de 10 repetições (mudas). Dados em porcentagem transformados em $\sqrt{x+0,5}$.

Os dados originais encontram-se nas Figuras 3 e 4.

Durante a quantificação visual da porcentagem de micorrizas, algumas observações foram feitas sobre o desenvolvimento da parte aérea das mudas.

No tratamento com nível 0% de composto orgânico e 0 de fósforo aplicado, embora tenha formado micorrizas, as mudas mostraram-se raquíticas com uma altura muito abaixo do padrão e fortemente arroxeadas devido a deficiência de fósforo no solo (Tabela 1). Nos tratamentos com 0% de composto orgânico nos demais níveis de fósforo, embora também tenham estabelecido micorrizas, houve uma característica generalizada de perda de dominância apical, provavelmente devido a falta de micronutrientes que estariam presentes na matéria orgânica. Além disso, houve nesses tratamentos uma acentuada queda de folhas, retorcimento do caule principalmente na região basal e bifurcações secundárias. Esses sintomas observados evidenciaram a necessidade do uso de matéria orgânica como fonte de micronutrientes para formação de mudas no viveiro.

Houve efeito da adição de fósforo e de composto orgânico no solo sobre o desenvolvimento micorrízico (Tabelas 6 e 7; Figuras 3 e 4; Apêndice 3).

A adição de composto orgânico reduziu a formação de ectomicorrizas, mas melhorou o padrão de crescimento das mudas.

A maior quantidade de ectomicorrizas observada foi nos tratamentos com 30 e 60ppm de fósforo aplicados, devendo o nível ótimo estar próximo de 40ppm aplicados (Figura 4).

Para o tipo de latossolo arenoso utilizado, a análise de solo mostra que extraiu-se em torno de 50% do fósforo aplicado pelo extrator Melich 1 (Tabela 1). A adição de matéria orgânica nos tratamentos elevou a quantidade de fósforo extraível proporcionalmente ao aumento do volume de matéria orgânica.

Em trabalhos realizados por SOARES *et alii* (1985) e SOARES *et alii* (1990) sobre o efeito de níveis de fósforo na formação de ectomicorrizas com *E.grandis* x *P.tinctorius* em um latossolo vermelho escuro, a formação de ectomicorrizas foi inibida a partir de 75ppm de fósforo aplicado. Neste trabalho obteve-se em média 1/5 de fósforo extraível em relação ao aplicado (Melich 1).

VIEIRA & PERES (1988a) conduziram um experimento em casa-de-vegetação com *E.grandis* x *P.tinctorius* e verificaram que a maior taxa de infecção foi com 47ppm aplicados, e que o efeito simbiótico somente ocorreu com 23ppm de fósforo. Não houve formação de ectomicorrizas nos níveis de 11,7 e 0ppm de fósforo aplicados. A análise de solo dos tratamentos desse experimento revelaram em torno de 1/9 de fósforo extraível em relação ao aplicado.

Tais diferenças obtidas nas análises de solo, da quantidade extraída em relação ao total, podem ser devido a diferenças no tipo de solo utilizado, quantidade de matéria orgânica presente, fonte de fósforo utilizada e outros fatores relacionados a própria análise de solo. De um modo

geral, pode-se aceitar na maioria dos casos, em torno de 1/3 de fósforo extraído em relação ao aplicado* .

Nos tratamentos com níveis de 60 e 90ppm de fósforo aplicados e 40 e 60% de composto orgânico, foi comum o aparecimento de frutificações do fungo ectomicorrízico *Thelephora* sp, sendo este provavelmente mais adaptado a níveis mais altos de fósforo do que *P.tinctorius*.

No tratamento com 90ppm de fósforo aplicado e 60% de composto orgânico, além de não haver estabelecimento de micorrizas, diminuiu o padrão de crescimento das mudas, havendo novamente perda de dominância apical e retorcimento do caule em várias mudas, aparecendo sintomas de deficiência de zinco nas folhas mais velhas.

Os resultados obtidos indicam que é possível ajustar um nível intermediário em torno de 30 a 60ppm de fósforo aplicado, com 20 a 40% de composto orgânico (dependendo do tipo de composto), e conseguir mudas com micorrizas mantendo um padrão de crescimento razoável para a formação de mudas em viveiros.

Há necessidade de conseguir um tipo de composto orgânico, que eleve pouco os níveis de fósforo quando incorporado ao solo, que forneça uma quantidade adequada de micronutrientes e melhore as características físicas do substrato, sem interferir no estabelecimento de micorrizas.

* GONÇALVES, J.L. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Setor de Solos e Nutrição Florestal / USP, Piracicaba, SP). Comunicação pessoal, 1991.

As doses de composto de casca de eucalipto e fósforo que promoveram o melhor desenvolvimento das plantas não foram as mesmas que permitiram o melhor desenvolvimento micorrízico.

A maior porcentagem de micorrizas obtidas foi no solo sem adição de matéria orgânica, nos níveis de 30 e 60 ppm de fósforo aplicados, indicando que deve existir um nível ótimo entre esse intervalo (Figura 3). A partir de 20% de composto orgânico no substrato, a formação de micorrizas diminuiu acentuadamente, não indo além da região de inoculação nos tratamentos com 40 e 60% de composto de casca de eucalipto (Figura 4).

Figura 3. Efeito de 4 níveis de fósforo (P) aplicado no desenvolvimento de ectomicorrizas, para 4 doses de composto orgânico (C.O.).

Figura 4. Efeito de 4 doses de composto orgânico (C.O.) no desenvolvimento de ectomicorrizas, para 4 níveis de fósforo aplicado (P).

Tabela 7. Porcentagem de secções radiculares micorrizadas*no clone H4/89, 90 dias após transplante para tubetes em condições de viveiro, em diferentes níveis de composto de casca de eucalipto e fósforo.

Níveis de composto de casca de eucalipto (V/V)					
Níveis de fósforo (ppm)	0	20	40	60	Média
0	22 *	20	6	0	12,0
30	72	70	20	0	40,5
60	34	24	6	0	16,0
90	22	4	0	0	6,5
Média	37,5	29,5	8,0	0,0	

* Porcentagens obtidas a partir de 50 observações de cortes microscópicos por tratamento.

Verificou-se uma porcentagem maior de micorrizas nos cortes realizados no micrótomo, do que na Quantificação feita visualmente de micorrizas (Tabela 7, Figuras 3 e 4). A estimativa da porcentagem de micorrizas através de observação visual foi menor, provavelmente devido a dificuldade em se observar a formação do manto externamente, após a retirada da muda do tubete. Sómente é possível

observar a formação do manto a olho nú, quando este é bem denso e espesso. Além disso, outros fatores como a falta de porosidade na região das raízes em contacto com a parede interna do tubete e compactação das raízes nesse local podem interferir no recobrimento das raízes pelo manto.

A melhor combinação de fósforo e composto de casca de eucalipto para produção de mudas está na faixa de 20 a 40% de casca e 30 a 60 ppm de fósforo aplicados. Embora nesses tratamentos a estimativa visual da porcentagem de micorrizas tenha sido relativamente baixa, na avaliação da porcentagem de cortes micorrízicos esses tratamentos apresentaram uma quantidade razoável de infecção com formação de manto característico.

A avaliação do número de cortes com micorriza é uma quantificação bastante segura da micorrização, uma vez que a diferenciação entre um corte de raiz com micorriza e um sem é bastante nítida, pela coloração característica adquirida pelo manto e maior diâmetro externo da secção radicular.

A amostragem para os cortes micorrízicos foi composta tanto por raízes com manto fúngico característico como por raízes aparentemente sem o manto. As raízes para amostragem foram cortadas sempre na região logo abaixo do substrato de feltro, após lavagem para retirada do solo.

Nas observações feitas para avaliação do número de cortes com micorriza no microscópio, verificou-se espessuras variáveis nos mantos formados ao redor das células do córtex.

Em corte transversal de raízes sem micorrizas, as células da epiderme apresentaram uma coloração azul sómente no contorno da parede celular, sendo essa parede fina e com um espaço intercelular menor do que entre células micorrizadas, devido a ausência da rede de Hartig.

No geral, além desse tipo de coloração característica, quando não havia presença de manto fúngico o diâmetro das raízes era menor do que as raízes com micorrizas.

Em raízes mais velhas sem micorrizas, pode-se notar além dessas características, a formação de uma camada suberificada externamente à superfície de coloração diferente das com manto fúngico.

Em cortes de raízes com micorrizas, o manto de hifas externo ao córtex apresentou coloração azul devido ao corante, com espessura variando de 2 a 3 camadas de células da raiz, que resultou no aumento do diâmetro das raízes. Não foram constatadas diferenças anatômicas nas células da epiderme como alongamento e orientação oblíqua, conforme citado por VIDA (1989).

HARLEY & SMITH (1983) estudando cortes de micorrizas em "plantlets" de *Eucalyptus spp*, mostraram que o aumento no diâmetro é principalmente devido ao aumento no sentido radial das camadas de células externas das raízes. CHILVERS & PRYOR (1985) constataram cerca do dobro de diâmetro de raízes de *Eucalyptus spp* micorrizadas quando comparadas com raízes sem micorriza.

4.5.2. Desenvolvimento das mudas no viveiro.

Houve aumento no crescimento das plantas com a adição de composto orgânico e fósforo no solo (Tabelas 8, 9 e 10; Apêndices 4, 5 e 6). O maior crescimento foi com 60% de composto orgânico, nos níveis de 30 e 60 ppm de fósforo aplicado (Tabelas 8 e 9). Esses dois tratamentos não resultaram em retorcimento na base do caule nem perda de dominância apical, sintomas característicos de deficiências em micronutrientes.

Tabela 8. Altura das mudas (Cm) inoculadas *in vitro*, após 90 dias em tubetes em condições de viveiro, com diferentes níveis de composto de casca de eucalipto e fósforo aplicado.

Níveis de fósforo (ppm)	Níveis de composto de casca de eucalipto (V/V)				
	0	20	40	60	Média*
0	13,30	18,85	21,30	22,05	18,87
30	20,05	21,55	23,30	25,60	22,62
60	23,20	24,80	24,80	25,05	24,46
90	22,00	22,05	22,60	23,00	22,41
Média *	19,64	21,81	23,00	23,92	

* Médias de 10 repetições por tratamento.

O vigor das mudas e o padrão de crescimento foram os melhores no tratamento com 60% de composto orgânico, nos níveis intermediários de fósforo (30 - 60 ppm), mas não foi constatado formação de micorriza sob observação visual, nem nas secções transversais de raízes observadas ao microscópio.

Para os níveis de 40% de composto orgânico com 0 e 30 ppm de fósforo aplicado, o padrão de crescimento ficou bem próximo das melhores mudas. Nestes tratamentos foi observado em cortes nas secções transversais até 20% de raízes apresentando colonização micorrízica, embora poucas vezes se observou formação de manto na estimativa visual.

Nos tratamentos com 30 ppm de fósforo aplicado, com 0 e 20% de composto orgânico, estabeleceram-se os níveis mais elevados de associação micorrízica, até 72% dos cortes observados (Tabela 7). A altura das mudas foi abaixo do padrão comercial, provavelmente devido à menor disponibilidade de nutrientes, que embora desfavoreçam o rápido crescimento da muda, parecem estimular o desenvolvimento da associação nas raízes.

Esses resultados mostram que nos níveis intermediários de composto de casca de eucalipto e fósforo houve um melhor desenvolvimento das mudas, conseguindo-se um padrão de crescimento considerado bom e uma muda bastante rústica após 3 meses em condições de viveiro, características estas

que aproximaram estas mudas das mudas produzidas em viveiros comerciais.

O nível ótimo para estabelecimento da associação está abaixo do ótimo para crescimento das mudas. Vários autores (MARX & KENNEY, 1982; MALAJCZUK *et alii*, 1975; POISSONNIER, 1986) sugerem que o efeito benéfico da inoculação de micorrizas deve se manifestar em condições de campo em locais adversos, mesmo que durante seu breve período no viveiro apresentem igual ou menor tamanho que mudas sem micorrizas em substratos mais férteis.

Tabela 9. Diâmetro do colo (mm) das mudas do clone H4/89 inoculadas *in vitro* 90 dias após transplante para tubetes em condições de viveiro, em diferentes níveis de composto de casca de eucalipto e fósforo aplicados.

Níveis de composto de casca de eucalipto V/V					
Níveis de fósforo(ppm)	0	20	40	60	Média *
0	2,44	2,88	3,18	3,20	2,92
30	2,85	3,06	3,13	3,13	3,04
60	2,96	3,30	3,19	3,30	3,19
90	2,99	3,32	3,29	3,37	3,23
Média *	2,18	3,14	3,19	3,25	

* Médias de 10 repetições por tratamento.

Os resultados apresentados na tabela 9, mostram que o aumento do diâmetro das mudas foi proporcional ao aumento dos níveis de composto orgânico e fósforo no substrato, mostrando uma tendência para o maior diâmetro corresponder a maior altura da muda.

No geral, pode-se afirmar que para as combinações acima de 30 ppm de fósforo aplicado e 20% de composto orgânico, os padrões de altura e diâmetro foram bons e não diferem significativamente entre si nos tratamentos.

As médias de ganho de peso na parte aérea foram proporcionais aos aumentos dos níveis de composto orgânico e fósforo aplicados ao substrato. Não houve correlação direta entre a porcentagem de formação de micorrizas e o ganho de peso na parte aérea em nenhum dos tratamentos. Também não houve correlação entre o aumento de peso de matéria seca com maior altura e diâmetro das mudas dentro dos tratamentos

Tabela 10. Peso da matéria seca(g) da parte aérea das mudas* clone H4/89 inoculadas *in vitro*, após 90 dias em tubetes em condições de viveiro, em diferentes níveis de composto de casca de eucalipto e fósforo aplicados.

Níveis de fósforo (ppm)	Níveis de composto de casca de eucalipto V/V				
	0	20	40	60	Média
0	0,81	1,32	1,62	1,93	1,42
30	1,03	1,51	1,74	1,97	1,56
60	1,07	1,62	1,70	1,88	1,57
90	0,87	1,95	1,78	2,14	1,68
Média	0,95	1,60	1,71	1,98	

* Médias de 10 repetições por tratamento.

Nos níveis intermediários de fósforo estudados (30 a 60ppm aplicados) foi possível conciliar o desenvolvimento satisfatório das mudas com o estabelecimento de ectomicorrizas com *P.tinctorius*.

Um fato questionável é a necessidade de se utilizar matéria orgânica no substrato para produção de mudas. Do ponto de vista nutricional um substrato mineral adequadamente fertilizado poderá substituir o uso de matéria

orgânica com vantagens adicionais, principalmente no que se refere a antagonismo microbiano com o fungo micorrízico e presença de propágulos patogênicos presentes na matéria orgânica.

O uso de substratos exclusivamente minerais, como vermiculita suplementada adequadamente com soluções nutritivas, poderá ser uma opção para melhorar a uniformidade e elevar a micorrização em condições de viveiro, onde os substratos orgânicos tem se mostrado mais sujeitos a alterações físicas, químicas e biológicas.

No entanto, para o desenvolvimento de um substrato ideal para produção de mudas micorrizadas, não deverá ser descartado o uso de matéria orgânica antes que sejam testadas outras fontes. Substratos exclusivamente minerais suplementados com macro e micronutrientes, também serão objetos de pesquisa na tentativa de melhorar a uniformidade e elevar a micorrização em condições de viveiro.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram concluir que:

A. O uso de substratos a base de fibras sintéticas tipo "Coursel" ou feltro para inoculação *in vitro*, é adequado para o desenvolvimento das raízes e das hifas do fungo, conseguindo-se facilmente mais de 90% de ectomicorrizas por esse método.

B. O isolado de *P.tinctarius* utilizado nos ensaios cresce satisfatoriamente em concentrações de carboidratos reduzidas até 4g/l.

C. A utilização de casa-de-vegetação com temperatura e umidade controladas, permitiu o pegamento de 100% das mudas após a transferência para os tubetes .

D. A adição de matéria orgânica na forma de casca de eucalipto decomposta reduziu a formação de ectomicorrizas, inibindo completamente a associação quando adicionada acima de 40% V/V.

E. A dose ótima de fósforo aplicado ao solo para formação de ectomicorrizas está entre 30 e 60ppm; os níveis de 0 e 90ppm foram limitantes ao desenvolvimento de ectomicorrizas.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ALLISON, F.E. Soil organic matter and its role in crop production. London, Elsevier Scientific Publishing Company. 1973. 637 p.
- AUER, C.G. & KRUGNER, T.L. Efeito da incorporação de acículas de *Pinus* em decomposição e do tipo de inóculo vegetativo de *Pisolithus tinctorius* na formação de micorrizas em mudas de *Pinus oocarpa*. In: Congresso Brasileiro de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, 3; Florianópolis, SC. 1983. Anais. p.127.
- BARROS, N.F.; BRANDI, R.M. & REIS, M.S. Micorriza em eucalipto. Revista Arvore, Viçosa, 2(2) . 1978. p.130 - 140.
- BETTIOL, W. Influência de algumas fontes de matéria orgânica na formação de ectomicorrizas em mudas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* pelos fungos *Pisolithus tinctorius* e *Thelephora terrestris*. Piracicaba, 1984. 79 p. Tese Mestrado.

- BOUGHER, N.L. & KALAJCZUK, R. Effects of high soil moisture on formation of ectomycorrhizas and growth of karri (*Eucalyptus diversicolor*) seedlings inoculated with *Descolea maculata*, *Pisolithus tinctorius* and *Laccaria laccata*. New Phytologist. 1990. v.114. p.87-91.
- BOWEN, G.D. Mineral nutrition of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C. & KOSLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology. New York, Academic Press, 1973. 444 p.
- CHILVERS, G.A. Host range of some eucalypt mycorrhizal fungi. Australian Journal of Botany. 1973. v.21: p.103-111.
- CHILVERS, G.A & HARLEY, J.L. Visualization of phosphate accumulation in beech mycorrhizas. The New Phytologist Australia. 1979. v.87 p.320-325.
- CHILVERS, G.A. & FRYOR, L.D. The structure of eucalypt mycorrhizas. Australian Journal of Botany. 1965. v.13, p.245-259.
- DIXON, R.K.; BEHNS, G.T.; GARRETT, G.S. COX; & SANDER, I.L. Synthesis of ectomycorrhizae on container-grow oak seedlings. Southern Journal of Applied Forestry. 9 (2) : 95-99. 1985.

DUDRIDGE, J.A. The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. III. Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevillei* (KLOTZSCH) SING. and 11 species of ectomycorrhizal host *in vitro* in the absence of exogenous carbohydrate. New Phytologist. 1986. v.103, p.457-464.

GONÇALVES, A.N. The growth and development physiology of *Eucalyptus* in cell and tissue culture systems. Ohio State University. 1975. 210 p. Tese de Mestrado.

GONÇALVES, A.N. Reversão a juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla* S.T.BLAKE *in vitro*. Piracicaba, 1982 97 p. Tese Doutorado.

HACSKAYLO, E. Carbohydrate physiology of ectomycorrhizae. In: MARKS, C.G. & KOZLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology. New York, Academic Press. 1972. p.207-230.

HARLEY, J.L. The Biology of Mycorrhizae. London, Ed. Leonard Hill. 1969. 334p.

HARLEY, J.L. & SMITH, S.E. Mycorrhizal Symbiosis. Oxford . 1983. 450 p.

- HEIRINCH, P.A.; MULLIGAN, D.R. & PATRICK, J.W. The effect of ectomycorrhizas on the phosphorus and dry weight acquisition on *Eucalyptus* seedlings. Plant and Soil, 109. p. 147-149. 1988.
- KRUGNER, T.L. Ectomicorrizas: Caracterização, produção de inóculo e inoculação. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS. Lavras. 1985. p.113-123.
- LEE, L.; CHILVERS, M. & ASHFORD, A.E. A histochemical study of fenolic materials in mycorrhizal and uninfected roots of *Eucalyptus fastigata* Deane & Maiden. New Phytologist. 1977. v.78. p. 313-328.
- KALAJCZUK, N.; McCOMB, A.J.; & LONERGAN, J.F. Phosphorus uptake and growth of mycorrhizal and uninfected seedlings of *Eucalyptus calophylla*. Australian Journal of Botany 1975. v.23. p.231-238.
- KALAJCZUK, N.; MOLINA, R. & TRAPPE, J.M. Ectomycorrhizae formation in *Eucalyptus*. The New Phytologist. 1982. v.91. p.467-482.

MALAJCZUK, N. & HARTNEY, V.L. Procedure for inoculations of micropropagated plantlets of *Eucalyptus camaldulensis* with ectomycorrhizal fungi and comparison with seedling inoculation using inoculum contained in a peat/vermiculite carrier. Australian Journal of Research. 1986. v.16 p.199-206.

MARKS, G.C. & FOSTER, R.C. Structure, morphogenesis, and ultrastructure of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C. & KOSLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae : Their Ecology and Physiology. Madison. 1973. p. 4-42.

MARX, D.H. & BRYAN, W.C. The significance of ectomycorrhizae trees. Australian Journal of Botany. 1974. v.22 p. 107-117.

MARX, D.H. Ectomycorrhizal fungus inoculations: a tool for improving forestation practices. In: MIKOLA, P. Tropical Mycorrhiza Research. Oxford. London. 1980. 270p.

MARX, D.H. & KENNEY, D.S. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. In: SCHENCK, N.S. Methods and Principles of Mycorrhizal Research. St. Paul. 1982. p.131-146.

MARX, D.H.; CORDELL, C.E.; KENNEY, D.S.; MEXAL, J.G.; ARTHAN, J.D.
 RIFFLE, J.W. & MOLINA, R.J. Commercial vegetative inoculum
 of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques of
 development of ectomycorrhizae on bare-root tree seedling
 Forest Science. Monograph. 1984. 25p.

MENGE, J.A.; GRAND, L.F. & HAINES, L.W. The effect of
 fertilization on growth and mycorrhizae numbers in 11 -
 year-old Loblolly Pine plantations. Forest Science.
 1977. v.23. p.37-44.

MEYER, F.H. Physiology of Mycorrhiza. Annual Review Plant
 Physiology. 1974. v.25. p. 567-586.

MIKOLA, P. Application of mycorrhizal symbiosis in forestry
 practice. In: MARKS, C.G. & KOSLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae -
 Their Ecology and Physiology. Madison. 1973.
 p. 383-416.

MOLINA, R. Pure culture synthesis and host specificity of
 red alder mycorrhizae. Canadian Journal of Botany. 1979.
 v.57. p.12223-12228.

- MULLETTE,K.J. Studies of eucalypt mycorrhizas. In: A method of mycorrhizae inoculation in *Eucalyptus gummifera* by *Pisolithus tinctorius*. Australian Journal of Botany. 1976. v.24. p.193-200.
- MULLIGAN,D.R. & PATRICK,J.W. Phosphorus and carbon economies of ectomycorrhizal seedlings of *Eucalyptus pilularis* . Australian Journal of Botany. 1985. v.24. p.193-200.
- NOVAIS,R.F; et alii. Níveis críticos de fósforo no solo para eucalipto. Revista Arvore. Viçosa. 1982. v.6. p.29-37.
- PICHÉ,Y.; FORTIN,J.A. & LA FONTAINE,J. Cytoplasmic phenols and polysaccharide in ectomycorrhizal and nonmycorrhizal short roots pine. New Phytologist. 1981. v.88. p.695-703.
- PICHÉ,Y. & FORTIN,J.A. Development of mycorrhizas, extra-matrical micelium and sclerotia on *Pinus strobus* seedlings. New Phytologist. 1982. v. 91. p. 211-220.

- POISSONNIER, M. Mycorrhization "*in vitro*" de clones d'eucalyptus. Note de Laboratoire. In: ANNALES DE RECHERCHES SYLVICOLES. Association Forêt Cellulose. Paris. 1986. p. 81-93.
- REDDELL, P. & MALAJCZUK, N. Formation of Mycorrhizae by Jarrah (*Eucalyptus marginata*) in litter and soil. Australian Journal of Botany. 1984. v.32. p. 511-520.
- RIFFLE, J.W. & MARONEK, D.M. Ectomycorrhizal inoculation . Procedures for greenhouse and nursery studies. In : SCHENCK, N.S. Methods and Principles of Ectomycorrhizal Research, St. Paul. 1982. p.147-155.
- REYNOIRD, J.P. & STRULLU, D.G. Obtention D'ectomycorrhizes chez des plants d'eucalyptus cultivés in vitro. Biologie et Forêt. 1986. v.13. p.33-38.
- SARRUGE, J.R. Soluções Nutritivas. Summa Phytopathologica . Piracicaba. 1975. v.1(3). p.231-233.
- SMITH, R.A. Nutricional study of *Pisolithus tinctorius*. Mycologia. 74 (1) : 54-58. 1982.

SOARES, I.; BORGES, A.C.; BARROS, N.F.; NEVES, J.C.L. & BELLEI, M.M. Crescimento e absorção de nutrientes por mudas de eucalipto micorrizadas com *Pisolithus tinctorius* em diferentes níveis de fósforo no solo. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS. Lavras. Anais. 1985. p.59.

SOARES, I. Níveis de fósforo no desenvolvimento de ectomicorrizas por *Pisolithus tinctorius* e no desenvolvimento de mudas de eucalipto. Viçosa. UFV. 1985 (Tese Mestrado).

SOARES, I. Níveis de fósforo na formação de ectomicorrizas em mudas de eucalipto. Revista Brasileira de Ciências do solo. Campinas, Set/Dez 1990. v.14. p. 327-332.

TRAPPE, M.J. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. Annual Review of Phytopathology. 1977. v.15. p. 203-222.

TOMMERUP, I.C.; KUEK, C. & MALAJCZUK, N. Ectomycorrhizal inoculum production and utilization in Australia. In: MYCORRHYZAE IN THE NEXT DECADE - Practical Applications and Research Priorities. North American Conference on Mycorrhizae. May 3-8. Gainesville, Florida, 1987.

- VIDA, J.B. Obtenção de ectomicorrizas em mudas de *Eucalyptus* a partir de "plantlets" e plântulas inoculadas *in vitro* com *Pisolithus tinctorius*. Piracicaba. 1989. 180 p.1989. (Tese de Doutorado).
- VIEIRA, R.F. Efeito de fatores edáficos associados ao cerrado no crescimento de *Pisolithus tinctorius* em meio de cultura e na infecção micorrízica de *Eucalyptus grandis* em condições controladas. Viçosa, 1984. 84 Pg. Tese mestrado.
- VIEIRA, R.F. & PERES, J.R.R. (a). Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para *Eucalyptus grandis*. Revista Brasileira de Ciências do solo, 1988. v.12. p.231-235.
- VIEIRA, R.F. & PERES, J.R.R. (b). Definição do teor de fósforo no solo para máxima eficiência da associação ectomicorrízica em *Eucalyptus grandis*. Revista Brasileira de Ciências do solo, 1988. v.12. p. 237-241.
- YOKOMIZO, N.K.S. & KRUGNER, T.L. Avaliação comparativa e efeitos de isolados de *Pisolithus tinctorius* em mudas de espécies de *Pinus* e *Eucalyptus*. Silvicultura em São Paulo. 17-19: 23. 1985.

ZAK, B. Classification of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C. &
KOZLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae : their ecology and
physiology. Madison, 1973. p.43-78.

APENDICE 1. Composição do meio de cultura para micropropagação *in vitro*.

Soluções estoques:	mg/ml
KNO_3	1.000
KH_2PO_4	170
$\text{Ca} (\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236
$\text{Mg} \text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
$\text{Fe} \text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{Na}_2 \text{EDTA}$	37,3
$\text{H}_3 \text{BO}_3$	6,2
$\text{Co} \text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{Cu} \text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{Mn} \text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,7
$\text{Mo} \text{O}_3$	0,144
$\text{Zn} \text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,0
KI	0,75
Meso Inositol	100
Tiamina	5
Piridoxina	0,5
Ácido Nicotínico	0,5
Pantotenato de Cálcio	1
Sacarose	30g/l
Agar	8g/l

APENDICE 2. Composição do meio MNM (Melin-Norkran Modificado).

	g/l
1. Extrato de malte	3,0
2. Glucose	10,0
3. $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	0,25
4. KH_2PO_4	0,5
5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,15
6. CaCl_2	0,05
7. FeCl_3	0,01
8. NaCl	0,025
9. Tiamina	0,0001

APENDICE 3. Análise de variância da variável micorriza após 90 dias em condições de viveiro, expressa em porcentagem do sistema radicular com formação de manto fúngico.

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
P	3	14.1195092	4.7065031	3.7130	0.01303
CO	3	83.9303119	27.9767706	22.0711	0.00001
P*CO	9	50.3007110	5.5978560	4.4162	0.00012
RESIDUO	144	182.5306743	1.2675741		
TOTAL	159	330.9612064			

MEDIA GERAL = 1.633705

COEFICIENTE DE VARIACAO = 68.915 %

APENDICE 4. Análise de variância da variável altura após 90 dias em condições de viveiro, expressa em centímetros da parte aérea.

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
P	3	654.2062500	218.0687500	33.5472	0.00001
CO	3	411.4812500	137.1604167	21.1005	0.00001
P*CO	9	258.3562500	28.7062500	4.4161	0.00012
RESIDUO	144	936.0500000	6.5003472		
TOTAL	159	2260.0937500			

MEDIA GERAL = 22.093750

COEFICIENTE DE VARIACAO = 11.540 %

APÊNDICE 5. Análise de variância da variável diâmetro após 90 dias em condições de viveiro, expressa em milímetros no colo da muda.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
P	3	2.4471507	0.8157169	12.1913	0.00001
CO	3	4.7081513	1.5693838	23.4552	0.00001
P*CO	9	1.2795980	0.1421776	2.1249	0.03065
RESIDUO	144	9.6350374	0.0669100		
TOTAL	159	18.0699375			

MEDIA GERAL = 3.099375

COEFICIENTE DE VARIACAO = 8.346 %

APÊNDICE 6. Análise de variância da variável peso de matéria seca após 90 dias em condições de viveiro, expressa em gramas.

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
CO	3	13.8488630	4.6162877	43.6503	0.00001
P	3	0.8281109	0.2760370	2.6101	0.05607
CO*P	9	1.0035310	0.1115034	1.0543	0.40566
RESIDUO	80	8.4604955	0.1057562		
TOTAL	95	24.1410004			

MEDIA GERAL = 1.560000

COEFICIENTE DE VARIACAO = 20.846 %