OBTENÇÃO DE ECTOMICORRIZAS EM MUDAS DE *Eucalyptus* A PARTIR
DE "PLANTLETS" E PLÂNTULAS INOCULADAS *In vitro* COM
Pisolithus tinctorius (Pers.) Coker & Couch

JOÃO BATISTA VIDA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: PROF. Dr. TASSO LEO KRÜGNER^{II}

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1989

V648o Vida, João Batista
Obtenção de ectomicorrizas em mudas de Eucalyptus a partir de "plantlets" e plântulas inoculadas in vitro com Pisolithus tinctorius (Pers.) Coker & Corich. Piracicaba, 1989.
177p.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Eucalipto - Micorriza - Inoculação
2. Eucalipto - Variedade 3: Micorriza - Inoculação I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 634.9734

OBTENÇÃO DE ECTOMICORRIZAS EM MUDAS DE *Eucalyptus* A PARTIR
DE "PLANTLETS" E PLÂNTULAS INOCULADAS *In vitro* COM
Pisolithus tinctorius (Pers.) Coker & Couch

JOÃO BATISTA VIDA

Aprovado em: 19/10/89

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Tasso Leo Krügnier

ESALQ/USP

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

ESALQ/USP

Drª Siu Mui Tsai

CENA/USP

Dr. Ming Tien Lin

Bioplanta/Campinas

Drª Vera Lúcia Ramos Bononi

Instituto de Botânica
(São Paulo)

Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER
Orientador

Aos meus pais
aos meus irmãos
à minha esposa e filha
DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Tasso Leo Krüger, pela orientação e pela grande atenção recebidas.
- Ao Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves, pela co-orientação e por colocar à disposição o laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Ciências Florestais (ESALQ/USP) para realização de parte desse trabalho.
- Ao técnico do laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Ciências Florestais (ESLQ/USP) José Roberto Romani nini pela colaboração e sugestões na montagem dos ensaios experimentais.
- À colega Lilian Maria Arruda Bacchi, pelas sugestões e colaboração nas análises estatísticas.
- Ao colega Celso Garcia Auer pelas sugestões e auxílio nas discussões.
- Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, professores, colegas e funcionários pelo apoio e amizade recebidos.
- À Universidade Estadual de Maringá, através da Pro-reitoria de Pesquisas e Pós-graduação pelo grande apoio recebido.
- À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), através do Programa Interno de Capitação Docente (PICD).
- À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Í N D I C E

Página

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	001
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	004
2.1. Considerações Gerais.....	004
2.2. Associações ectomicorrízicas em <i>Eucalyptus</i> spp..	010
2.3. Associações ectomicorrízicas em clones de <i>Eucalyptus</i> spp e de outras espécies hospedeiras....	024
2.4. Associações ectomicorrízicas em plântulas de outras espécies hospedeiras.....	029
2.5. O efeito negativo de alguns fatores na formação de ectomicorrizas.....	035
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	044
3.1. Desenvolvimento de ectomicorrizas em "plantlets" de <i>E. urophylla</i> , de <i>E. grandis</i> e de um híbrido (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) em cultura axênica.....	050
3.2. Desenvolvimento de ectomicorrizas em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> em cultura axênica, em meio orgânico.....	052
3.3. Desenvolvimento de ectomicorrizas em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> em cultura axênica, em meio inorgânico.....	054
3.4. Desenvolvimento de ectomicorrizas em "plantlets" de <i>E. urophylla</i> , de <i>E. grandis</i> e de um híbrido (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) inoculadas através da técnica do papel sanduiche.....	056

3.5. Desenvolvimento de ectomicorrizas em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> inoculadas através da técnica do papel sanduiche.....	059
3.6. Perpetuação de ectomicorrizas em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> inoculadas pela técnica do papel sanduiche e transplantadas para solo esterilizado.....	060
3.7. Perpetuação de ectomicorrizas em "plantlets" de <i>E. urophylla</i> , de <i>E. grandis</i> e de um híbrido (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) inoculadas em cultura axênica e transplantadas para solo esterilizado.....	062
3.8. Perpetuação de ectomicorrizas em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> inoculadas em meio orgânico e transplantadas para solo esterilizado.....	064
3.9. Perpetuação de ectomicorrizas em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> inoculadas em cultura axênica, em meio inorgânico e transplantadas para solo esterilizado.....	065
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	067
4.1. Desenvolvimento de ectomicorrizas em "plantlets" de <i>E. urophylla</i> , de <i>E. grandis</i> e de um híbrido (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) em cultura <u>axênica</u>	067
4.2. Desenvolvimento de ectomicorrizas em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> em cultura axênica, em meio orgânico.....	082
4.3. Desenvolvimento de ectomicorrizas em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> em cultura axênica, em meio inorgânico.....	089
4.4. Desenvolvimento de ectomicorrizas em "plantlets" de <i>E. urophylla</i> , de <i>E. grandis</i> e de um híbrido (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) inoculadas através da técnica do papel sanduiche.....	107
4.5. Desenvolvimento de ectomicorrizas em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> inoculadas através da técnica do papel sanduiche.....	115
4.6. Perpetuação de ectomicorrizas em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> inoculadas pela técnica do papel sanduiche e transplantadas para solo esterilizado.....	121

4.7. Perpetuação de ectomicorrizas em "plantlets" de <i>E. urophylla</i> , de <i>E. grandis</i> e de um híbrido (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) inoculadas em cultura axênica e transplantadas para solo esterilizado..	127
4.8. Perpetuação de ectomicorrizas em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> inoculadas em meio orgânico e transplantadas para solo esterilizado.....	134
4.9. Perpetuação de ectomicorrizas em plântulas de <i>urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> inoculadas em cultura axênica, em meio inorgânico e transplantadas para solo esterilizado.....	140
5. CONCLUSÕES.....	155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1.	Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em "plantlets" de <i>E. urophylla</i> , de <i>E. grandis</i> e de um híbrido (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) por <i>Pisolithus tinctorius</i> em meio de cultivo com carbono orgânico disponível, 15 dias após a inoculação.....	069
Tabela 2.	Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em "plantlets" de <i>E. urophylla</i> , de <i>E. grandis</i> e de um híbrido (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) por <i>Pisolithus tinctorius</i> em meio de cultivo com carbono disponível, 30 dias após a inoculação.....	071
Tabela 3.	Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em "plantlets" de <i>E. urophylla</i> , de <i>E. grandis</i> e de um híbrido (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) por <i>Pisolithus tinctorius</i> em meio de cultivo com carbono orgânico disponível, 45 dias após a inoculação.....	075
Tabela 4.	Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> por <i>Pisolithus tinctorius</i> em meio de cultivo com carbono orgânico disponível, 15 dias após a inoculação.....	083
Tabela 5.	Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> por <i>Pisolithus tinctorius</i> em meio de cultivo com carbono orgânico disponível, 30 dias após a inoculação.....	085
Tabela 6.	Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> por <i>Pisolithus tinctorius</i> em meio de cultivo com carbono orgânico disponível, 45 dias após a inoculação.....	087
Tabela 7.	Formação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada) em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> por <i>Pisolithus tinctorius</i> em meio de cultivo sem carbono orgânico disponível, 30 dias após a inoculação...	091

Tabela 8.	Formação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada) em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> por <i>Pisolithus tinctorius</i> em meio de cultivo sem carbono orgânico disponível, 50 dias após a inoculação...	093
Tabela 9.	Formação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada) em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> por <i>Pisolithus tinctorius</i> em meio de cultivo sem carbono orgânico disponível, 70 dias após a inoculação...	102
Tabela 10.	Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em "plantlets" de <i>E. urophylla</i> , e de <i>E. grandis</i> e de um híbrido (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) por <i>Pisolithus tinctorius</i> através da técnica do papel sanduiche, 12 dias após a inoculação.....	108
Tabela 11.	Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em "plantlets" de <i>E. urophylla</i> , e de <i>E. grandis</i> e de um híbrido (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) por <i>Pisolithus tinctorius</i> através da técnica do papel sanduiche, 24 dias após a inoculação.....	111
Tabela 12.	Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos), em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> por <i>Pisolithus tinctorius</i> através da técnica do papel sanduiche, 12 dias após a inoculação.....	116
Tabela 13.	Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> por <i>Pisolithus tinctorius</i> através da técnica do papel sanduiche, 24 dias após a inoculação.....	118
Tabela 14.	Perpetuação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada) em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> inoculadas com <i>Pisolithus tinctorius</i> através da técnica do papel sanduiche e avaliação aos 80 dias após o transplante para solo esterilizado.....	122
Tabela 15	Perpetuação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada) em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> inoculadas com <i>Pisolithus tinctorius</i> através da técnica do papel sanduiche e avaliação aos 120 dias após o transplante para solo esterilizado.....	125

Tabela 16.	Perpetuação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada) em "plantlets" de <i>E. urophylla</i> , de <i>E. grandis</i> e de um híbrido (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) inoculadas in vitro , com <i>Pisolithus tinctorius</i> em meio de cultivo com carbono orgânico disponível e avaliação aos 90 dias após o transplante para solo <u>es</u> terilizado.....	132
Tabela 17.	Perpetuação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada) em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> inoculadas in vitro com <i>Pisolithus tinctorius</i> em meio de cultivo com carbono orgânico disponível e avaliação aos 60 dias após o transplante para solo <u>esteri</u> lizado.....	135
Tabela 18.	Perpetuação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada) em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> inoculadas in vitro com <i>Pisolithus tinctorius</i> em meio de cultivo com carbono orgânico disponível e avaliação aos 90 dias após o transplante para solo <u>esteri</u> lizado.....	138
Tabela 19	Perpetuação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada) em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> inoculadas in vitro com <i>Pisolithus tinctorius</i> , em meio de cultivo sem carbono orgânico disponível e avaliação aos 60 dias após o transplante para solo <u>es</u> terilizado.....	142
Tabela 20.	Perpetuação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada) em plântulas de <i>E. urophylla</i> e de <i>E. grandis</i> inoculadas in vitro com <i>Pisolithus tinctorius</i> em meio de cultivo sem carbono disponível e avaliação aos 90 dias após o transplante para solo esterilizado..	145

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ectomicorrizas formadas em "plantlets" de um híbrido (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>), em meio orgânico 30 dias após a inoculação com o <u>isola</u> do E4 de <i>Pisolithus tinctorius</i>	080
Figura 2. Ectomicorrizas formadas em "plantlet" de um híbrido (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>), 24 dias após a inoculação com o isolado E4 de <i>Pisolithus tinctorius</i> usando a técnica do papel sandui-che.....	081
Figura 3. Secção transversal de micorriza em "plantlet" de um híbrido (<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>), 15 dias após a inoculação com o isolado E4 de <i>Pisolithus tinctorius</i> , em meio orgânico.....	114
Figura 4. Ectomicorrizas desenvolvidas em plântula de <i>E. urophylla</i> , inoculadas <u>in vitro</u> com o <u>isola</u> do RVE 82-1 de <i>Pis•olithus tinctorius</i> , 90 dias <u>a</u> pós o transplante para solo esterilizado....	154

CURRICULUM VITAE

JOÃO BATISTA VIDA nasceu em 08 de maio de 1954, na cidade de Patos de Minas (MG), onde concluiu o 1º Grau, no Colégio Estadual Zama Maciel. Em seguida ingressou no Colégio Agrícola Antônio Versiani Athayde, em Montes Claros, onde se formou como técnico de nível médio em Agro-Pecuária. Em 1975 entrou para a Universidade Federal de Viçosa, onde se graduou em Agronomia no ano de 1978. No ano de 1979 na mesma instituição iniciou o curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, a nível de mestrado e o concluiu em 1982. Em 1981 ingressou na Universidade Estadual de Maringá, passando a integrar o setor de Fitopatologia do Departamento de Agronomia. Em 1983 realizou curso de Pós-Graduação "lato senso" em defensivos agrícolas. A partir de 1985 iniciou curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, a nível de doutorado na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em Piracicaba (SP).

OBTENÇÃO DE ECTOMICORRIZAS EM MUDAS DE *Eucalyptus* A PARTIR
DE "PLANTLETS" E PLÂNTULAS INOCULADAS "IN VITRO" COM
Pisolithus tinctorius (Pers.,) Coker & Couch

Autor: JOÃO BATISTA VIDA

Orientador: Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER

RESUMO

"Plantlets" de *Eucalyptus urophylla*, de *E. grandis* e de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) e plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* foram inoculadas *in vitro* com micélio de seis isolados de *Pisolithus tinctorius*, em substrato de turfa-vermiculita umedecido com solução nutritiva, com e sem carbono orgânico disponível.

Em "plantlets" do híbrido e de *E. urophylla*, a colonização ectomicorrízica foi no mínimo de 82,6% e 66,1% do sistema radicular, respectivamente, com pouca variação entre os isolados fúngicos, após 45 dias de incubação no substrato com carbono orgânico disponível. Em "plantlets" de *E. grandis*, a colonização foi no máximo de 56,2%, com grande variação entre os isolados fúngicos. Em plântulas, ela foi de pelo menos 91,1% com pequena variação entre os isolados fúngicos e entre espécies hospedeiras.

Na ausência de carbono orgânico, observou-se colonização ectomicorrízica de pelo menos 92,3% e 60,0% para um isolado de *P. tinctorius* em plântulas de *E. urophylla* e *E. gran*dis, respectivamente e no máximo 15,0% e 8,0% em *E. urophylla* e *E. grandis*, respectivamente, para outros dois isolados fúngicos. Os demais isolados permaneceram num nível intermediário.

Em "plantlets" com elevada colonização ectomicorrízica formada em meio orgânico e transferidas para solo previamente esterelizado, somente para três isolados fúngicos ocorreu perpetuação das ectomicorrizas, com no máximo 10% do sistema radicular colonizado, 90 dias após o transplante.

Em plântulas com elevada colonização ectomicorrízica e transferidas para solo previamente esterilizado, a perpetuação das ectomicorrizas foi constatada em grande quantidade somente para aquelas formadas na ausência de nutrientes orgânicos, com grandes diferenças entre a agressividade dos isolados fúngicos em cada espécie hospedeira. *Eucalyptus urophylla* apresentou colonização micorrízica bem maior, do que *E. grandis*, 90 dias após o transplante.

FORMATION OF ECTOMYCORRHIZAE IN PLANTLETS AND SEEDLINGS
OF *Eucalyptus* INOCULATED IN VITRO WITH
Pisolithus tinctorius

Author: JOÃO BATISTA VIDA

Adviser: Prof. Dr. TASSO LEO KRUGNER

SUMMARY

Plantlets of *Eucalyptus urophylla*, *E. grandis* and an *E. grandis* x *E. urophylla* hybrid and seedlings of *E. urophylla* and *E. grandis* were inoculated in vitro with mycelium of six isolates of *Pisolithus tinctorius* in a peat-vermiculite substrate moistened with a nutrient solution, with and without available organic carbon.

Ectomycorrhizal colonization was at least 82,6 and 66,1% of the root system in the hybrid and *E. urophylla* plantlets, respectively, after an incubation period of 45 days in the presence of organic carbon. There was little variation among fungal isolates. For *E. grandis*, the maximum colonization rate was 56,2%, with great variation among isolates. Root colonization in seedlings was at least 91,1%, with little variation among host materials and isolates of *P. tinctorius*.

In the absence of organic carbon in the substrate, the ectomycorrhizal colonization for one of the isolates was at least 92,3 and 60,0% in seedlings of *E. urophylla* and *E. grandis*, respectively. For two other isolates maximum colonizations were 15,0 and 80% in *E. urophylla* and *E. grandis*, respectively. The other three isolates gave intermediary, colonization rates.

Perpetuation of ectomycorrhizal development 90 days after transplant to sterilized soil of plantlets with high ectomycorrhizal colonization in the organic substrate was obtained only for three isolates of the fungus at a maximum rate of 10% of the root system. In seedlings, perpetuation of ectomycorrhizal development after transplant was successfully obtained only for those that were formed in the absence of organic carbon. In this case, there were great differences among isolates in each host material. *Eucalyptus urophylla* showed greater ectomycorrhizal development than *E. grandis*.

1. INTRODUÇÃO

As ectomicorrizas não são de ocorrência generalizada, restringindo-se a poucas famílias de plantas, principalmente *Pinaceae*, *Betulaceae*, *Ericaceae* e *Mirtaceae* (DIXON et alii, 1984; GRAND, 1976; MARX, 1989). Alguns gêneros dessas famílias são micotróficos dependentes como *Pinus*, *Quercus*, *Abies* e *Picea* (MARX, 1980; MEYER, 1973). O gênero *Eucalyptus* é apontado como ectomicorrízico facultativo (MALAJCZUK et alii, 1982) e a importância dos eventuais benefícios da simbiose para a cultura precisa ser melhor estudada, em razão da escassez de trabalhos já desenvolvidos e com resultados contraditórios.

Uma das dificuldades encontradas em *Eucalyptus* é a adequação de metodologia, para o sucesso da inoculação, principalmente em estudos fora do laboratório (BACCHI, 1988; YOKOMIZO & KRUGNER, 1983/85a). Uma alternativa poderia ser a inoculação *in vitro* e após o estabelecimento da colonização ectomicorrízica fazer o transplante para o viveiro. Desta forma poderia ser superada as várias limitações da técnica convencional de produção de inóculo micelial e sua aplicação (KRUGNER, 1985; MALAJCZUK & HARTNEY, 1986). Com

o emprego dessa técnica, a seleção de isolados fúngicos mais adequados para cada espécie, procedência, progênie ou clone poderia também ser facilitada.

Com o domínio da técnica de cultura de tecidos para produção de clones de *Eucalyptus* (GONÇALVES, 1975; GONÇALVES, 1982), nova tecnologia estará à disposição dos reflorestadores. Essa técnica permite a manutenção de características superiores, com material geneticamente uniforme e apresenta altas taxas de multiplicação, não apresenta incompatibilidade, não se restringe ao uso de material juvenil, exige pouco espaço e apresenta economia de tempo (GONÇALVES, 1982). Essa inovação tecnológica poderá trazer grandes benefícios para o estudo das associações ectomicorrízicas, uma vez que é viável a inoculação do material micropropagado com um fungo ectomicorrízico, durante ou logo após a formação das raízes (MALAJCZUK & HARTNEY, 1986; POISSONNIER, 1986; REYNOIRD & STRULLU, 1986; STRULLU et alii, 1986).

Tanto "plantlets" (planta clonal produzida por cultura de tecido), quanto plântulas quando fossem transferidas para casa-de-vegetação ou viveiro, já estariam micorrizadas e com o desenvolvimento do sistema radicular, ocorreria a perpetuação das ectomicorrizas formadas *in vitro*. No entanto, a presença de carboidratos nos meios de enraizamentos empregados nesta técnica poderia interferir nos processos de infecção e perpetuação das ectomicorrizas.

Pisolithus tinctorius (Pers.) Coker & Couch, encontrado frequentemente em associação com espécies de *Eucalyptus* apresenta grande adaptabilidade fisiológica a nível de espécie de hospedeiro e uma infinidade de ecotipos (MARX et alii. 1984; MITCHELL, 1984; TRAPPE, 1977), que são características importantes no processo de seleção de isolados.

Esse trabalho teve como principais objetivos:

- avaliar a formação de ectomicorrizas por diferentes isolados de *P. tinctorius* em "plantlets" de *E. urophylla* S.T. Blake, de *E. grandis* W. Hill: Maiden, de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) e em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis*, em meio de síntese com e sem carbono orgânico disponível.
- avaliar a perpetuação de ectomicorrizas após transplante para solo previamente esterilizado, em "plantlets" de *E. urophylla*, de *E. grandis* e de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) e em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* formadas por diferentes isolados de *P. tinctorius* em meio de síntese com e sem carbono orgânico disponível.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações Gerais

Melin* citado por MOLINA & PALMER (1982) desenvolveu a técnica de síntese de micorriza em cultura axênica, para demonstrar, experimentalmente, a habilidade de fungos formar ectomicorrizas em hospedeiros específicos. Inoculando plântulas da família Pinaceae, como *Picea abies*, *Pinus sylvestris* e *Larix europaea*, Melin* reconheceu claramente, que diferentes fungos ectomicorrízicos podiam afetar os seus respectivos hospedeiros em diferentes níveis.

Desde então, grande progresso tem sido alcançado, envolvendo as ectomicorrizas, utilizando cultura axênica, principalmente em hospedeiros das famílias Pinaceae, Betulaceae e Fagaceae. Muitas informações foram obtidas sobre os aspectos estruturais, morfológicos e fisiológicos dessa simbiose (DALPÊ, 1986; DUDRIDGE, 1986; HACSKAYLO, 1953; KOPE & WARCUP, 1986; MEYER, 1974; TRAPPE, 1967).

* MELIN; E. Über die mykorrhizenpilze von *Pinus sylvestris* L. und *Picea abies* (L.) Karst svensk Bot. Tidskr., 15: 192-203, 1921.

No entanto, trabalhos tratando de ectomicorizas em hospedeiros subtropicais e tropicais, como *Eucalyptus* spp., são em pequeno número. Em consequência existem poucas informações da sua fisiologia no hospedeiro e muitas pesquisas precisam ser feitas para esclarecer vários aspectos dessa as sociação simbiótica.

Isso se deve em grande parte, ao fato de que muitas técnicas de síntese para o estabelecimento de ectomicorizas em coníferas *in vitro* e principalmente em casa-de-vegetação e em viveiro, quando utilizadas para *Eucalyptus*, levaram a resultados erráticos (BACCHI, 1988; MALACJZUK et alii, 1975; YOKOMIZO e KRUGNER, 1983/85a). É provável que os insucessos foram devidos à inadequabilidade das metodologias empregadas (YOKOMIZO & KRUGNER, 1983/85a; VIEIRA & PERES, 1988b), como tipo de inóculo e inoculação, substrato, fertilização e ambiente inadequados. Outro fator que certamente está relacionado ao êxito dessa simbiose é a dependência ao micotrofismo do hospedeiro. A alta dependência de *Pinus* spp., *Quercus* spp., *Fagus* spp., *Larix* spp., *Abies* spp., *Piceae* spp., *Betula* spp., já foi largamente demonstrada (DIXON et alii, 1984; HARLEY & SMITH, 1982; MARX 1980; MEYER, 1973; MITCHELL et alii, 1984).

No entanto, no que se refere ao micotrofismo de *Eucalyptus* spp., poucos estudos foram realizados e a dúvida ainda persiste, quanto aos efeitos benéficos das ectomicorri

zas, uma vez que os resultados dos trabalhos foram contraditórios.

Somente mais recentemente, com o desenvolvimento das técnicas modernas em culturas axênicas, maior atenção tem sido dado às ectomicorrizas em *Eucalyptus* spp., (CHILVERS et alii, 1986; GRENVILLE et alii, 1986; HORAN et alii, 1988; MALAJCZUK & HARTNEY, 1986).

Pisolithus tinctorius é um gasteromiceto largamente distribuído no mundo e foi relatado ocorrer em mais de 30 países nos continentes Europeu, Asiático, Africano, Oceânia, América do Norte, Central e do Sul (GRAND, 1976; LAMPKY & LAMPKY, 1973; MARX, 1977; SMITH, 1982).

Embora *P. tinctorius* tem sido relatado em vários "sites" e solos, existe consenso geral, que o fungo é mais comum em "habitats" de solos pobres arenosos e argilosos (BOWEN & THEODOROU, 1973; GRAND, 1976; HILE & HENNEN, 1969; LAMPKY & LAMPKY, 1973; MARX, 1977).

Basidiocarpos de *P. tinctorius* foram relatados estar associados às espécies *Arbustus menziesii*, *Castanea dentata*, *Citrus* spp., *Eucalyptus* spp., *Juniperus* spp., *Lantana* spp., *Nyssa sylvatica*, *Pinus* spp., *Populus trichocarpa*, *Quercus* spp., *Roystonea oleracea* (GRAND, 1976; MARX, 1977; MARX & BRYAN, 1974). Embora *in vitro*, um número maior de espécies hospedeiras foram encontradas se associar a *P. tinctorius* e formar ectomocorrizas (MARX, 1980a; MARX & BRYAN, 1970; MEYER, 1973). No entanto, síntese

de micorriza *in vitro* não significa a sua ocorrência em condições naturais (MOLINA, 1979a; ZAK, 1976).

No Brasil, a ocorrência de ectomicorrizas nos ecossistemas indígenas parece não ser generalizada (KRUGNER, 1985). Entretanto *P. tinctorius* juntamente com *Scleroderma* spp. são os fungos ectomicorrízicos mais frequentemente encontrados em talhões de *Eucalyptus* spp., (BARROS et alii, 1978; YOKOMIZO & KRUGNER, 1983/85b). YOKOMIZO & KRUGNER (1983/85b) observaram a presença de basidiocarpo de *P. tinctorius* ocorrendo em povoamento de *E. citriodora*, *E. grandis*, *E. saligna* e *E. viminalis*.

Em cultura axênica, CHILVERS (1973) inoculando culturas puras de *P. tinctorius* observou a formação de ectomicorrizas em *E. maculata*, *E. fastigata*, *E. sieberi*, *E. radiata*, *E. bridgesiana*, *E. st. johnii*, *E. dalrympleana*, *E. polyanthemos* e *E. leucoxylon*.

Apesar de ser um basidiomiceto relativamente promíscuo, formando ectomicorrizas em várias espécies, tanto de ginospermas, quanto de angiospermas, *P. tinctorius* apresenta alto grau de especialização fisiológica a nível de gênero hospedeiro (CHILVERS, 1973; HARLEY & SMITH, 1982; MARX & KENNEY, 1982; VIEIRA, 1984; YOKOMIZO & KRUGNER, 1983/85b). Entretanto, recentemente POISSONNIER, 1986), sob condições axênicas, em substrato contendo carbono orgânico disponível observou que um isolado de *P. tinctorius*, obtido de *Pinus*

pinaster formou micorrizas em "plantlets" de *E. gunnii*.

Resultado semelhante foi encontrado por ASHTON (1976), usando um isolado de *P. tinctorius* originado de *Pinus* spp, e inoculado num híbrido de *Eucalyptus* em condições de viveiro. Todavia, dentro das espécies do gênero *Eucalyptus* existe pouca especificidade entre o fungo simbiote e o hospedeiro. Apenas alguns isolados parecem ser mais adaptados para determinadas espécies (CHILVERS, 1973). Condição análoga ocorre em *Pinus* (MARX & BRYAN, 1970).

Quando se considera os milhões de hectares com potencial para florestas exóticas, que poderão ser estabelecidas nas nações do terceiro mundo, como também os milhões de hectares aguardando regeneração artificial, a importância de seleção, propagação e manejo de inóculos superiores de fungos ectomicorrízicos no manejo florestal se torna muito importante (MARX & KENNEY, 1982).

Inoculação com cultura micelial de fungos ectomicorrízicos passou a ser estudada, mais intensamente, a partir de 1950. Muitos esforços foram dispendidos para desenvolver metodologias, que tinham como objetivo final, o uso de inóculo micelial em escala comercial (TRAPPE, 1977). Isso se justifica, porque o uso de cultura pura de fungo ectomicorrízico tem sido, repetidamente recomendado, como a melhor forma de inóculo sob o ponto de vista científico (KRUGNER, 1985; MIKOLA, 1973; TRAPPE, 1977). Vários pesquisadores

também se preocuparam em mostrar as várias desvantagens do uso de inóculo constituído de basidiosporos e terriço retirados de povoamentos adultos (ALVAREZ & TRAPPE, 1983; MARX & KENNEY, 1982; KRUGNER, 1985).

O uso de inóculo micelial, em larga escala, em viveiros ainda é severamente dificultado, principalmente devido a dois fatores: dificuldade de produção em quantidades suficientes, em razão da baixa taxa de crescimento dos fungos ectomicorrízicos em cultura pura e desconhecimento da espécie ou isolado fúngico que deve ser usado sob diferentes condições (MARX & KENNEY, 1982; MIKOLA, 1973). A maior meta nos programas de pesquisa nessa área tem como objetivo principal desenvolver técnicas eficientes para produção de inóculo e inoculação com fungos ectomicorrízicos (RIFFLE & MARONEK, 1982).

Em razão dessas dificuldades, cultura pura tem sido usada em escala comercial somente para *P. tinctorius*, particularmente em *Pinus* spp. (MARX et alii, 1984).

MARX (1980b) escolheu *P. tinctorius* para produção de inóculo micelial, porque é um fungo considerado de grande valor, pela sua ocorrência natural e aparente adaptação ecológica em locais adversos depalperados pela mineração, onde a adaptação de *Pinus* spp. era impossível.

Para outras espécies florestais, particularmen

te as de *Eucalyptus*, os métodos correntes disponíveis para inoculação de plântulas, em viveiro envolvem a adição de inóculo vegetativo, que tem provado serem de custos proibitivos, fisicamente imanejáveis e de resultados não previsíveis (MALAJCZUK & HARTNEY, 1986).

O uso de plântulas ou clones, já micorrízicos, inoculados *in vitro* e transferidos para viveiro possui uma série de vantagens. Nessas condições, características necessárias, quando se faz o uso de inóculo micelial em viveiro podem ser dispensadas, como sobrevivência ao rigor de várias manipulações (trituração, lavagem, secamento), ao armazenamento, à incorporação ao solo, à competição com microflora do solo e à adversidade de temperatura e umidade do solo (MALAJCZUK & HARTNEY, 1986; MARX & KENNEY, 1982).

O desenvolvimento de técnicas para produção de mudas de *Eucalyptus* e *Pinus*, através de cultura de tecidos em condições axênicas, que poderão tornar viáveis em escala comercial em pouco tempo, poderá superar boa parte das dificuldades, até então encontradas, devido ao uso de inóculo comercial (KRUGNER, 1985).

2.2. Associações ectomocorrízicas em *Eucalyptus* spp.

Segundo CHILVERS & PRYOR (1965) e KOPE & WARCUP (1986), o primeiro relato da ocorrência de ectomicorri-

zas em *Eucalyptus* foi feito por Samuel* em 1926.

A grande maioria dos trabalhos, em que se obteve êxito na formação de ectomicorrizas em *Eucalyptus* sp, usando *P. tinctorius* foram conduzidos em cultura axênica.

CHILVERS & GUST (1982a) usaram a "técnica de garrafas de crescimento" para estudar aspectos morfológicos e estruturais das micorrizas formadas entre *P. tinctorius* e *E. st. johnii*. Em perlita umidecida com solução nutritiva, eles observaram um gradiente decrescente na taxa média de crescimento nas raízes micorrízicas de segunda a quinta ordem. As micorrizas cresceram muito mais lentamente, do que as raízes não infectadas de equivalente ordem, cuja magnitude foi estimada ser de um fator cinco. Maior número de ápices terciários e quaternários foram convertidos a micorrizas, do que ápices secundários. Os ápices das raízes primárias e secundárias cresceram muito mais rapidamente, do que o fungo, com os dois se distanciando cada vez mais, quando cresciam na mesma direção. No mesmo trabalho, mas usando como inóculo, solo de uma floresta da mesma espécie, os autores observaram comportamento semelhante nas micorrizas e raízes.

MASSICOTTE et alii (1987) recorreram à "técnica de saco de crescimento", descrita por FORTIN et alii (1980)

* SAMUEL, G. Note on the distribution of micorrhiza. *Transactions of the Royal Society of South Australia*, 50: 245-246, 1926.

para estudar o processo de formação de ectomicorriza entre *P. tinctorius* e plântulas de *E. pilularis*. Usando inóculo micelial e avaliações diárias, até 10 semanas após a inoculação, os autores verificaram que, muitas raízes laterais foram colonizadas em toda a sua extensão formando manto bem visível, com exceção das raízes primárias. Tanto as raízes laterais jovens, quanto as raízes longas produziram estímulo, que atraiu o fungo simbionte. A penetração da rede-de-Hartig foi impedida pela hipoderme, se restringindo às células epidérmicas e na região da coifa só ocorreu formação de manto espesso.

Os autores suspeitaram que lamelas de suberina, que são conhecidas ocorrer na hipoderme sejam responsáveis por esse fenômeno. Outro aspecto observado foi o alargamento das células epidérmicas após formação da rede-de-Hartig. Evidências surgiram que *P. tinctorius* melhorou o início de desenvolvimento das raízes laterais, que foram colonizadas por hifas mais internas do manto da raiz-mãe, as quais estavam próximas do primórdio da raiz lateral. Colonização e consequentemente, formação da rede-de-Hartig não ocorreram a partir de rede-de-Hartig pré-existente da raiz-mãe. Os pelos radiculares presentes, durante a colonização da raiz foram encobertos pelo manto e aparentemente se degeneraram.

CHILVERS et alii (1986) desenvolveram com grande sucesso a técnica do papel sanduiche para estudar o desenvolvimento de ectomicorrizas formadas em *E. globulus* subsp. *bicostata* por *P. tinctorius* e *Paxillus involutus*. Através de cor

tes de raízes observados ao microscópio foi verificado, que após cinco dias à inoculação, houve formação de micorrizas completas, pelos fungos simbiotes, com manto e rede de Hartig. Duas semanas após a inoculação, 40 a 80% dos ápices das raízes secundárias foram transformados em micorrizas e as raízes primárias, em todas as repetições, não foram infectadas. Em sala de crescimento, usando vaso de argila contendo turfa especial, os autores empregaram uma variante da técnica do papel sanduiche. Eles constataram, que três semanas após a inoculação havia a presença de alguma micorriza formada por *P. tinctorius*.

A técnica do papel sanduiche modificada foi adotada por GRENVILLE et alii (1986) para observar a afinidade de cinco isolados de *P. tinctorius* em plântulas de *E. pilularis*. Passados seis dias a inoculação, três isolados haviam formado micorrizas; enquanto que o 4º e o 5º isolados as formaram somente após 8 e 9 dias, respectivamente. Através de cortes micorrízicos observados ao microscópio, os autores confirmaram as constatações de MASSICOTTE et alii (1987). Também foi notado que o isolado, que mais formou micorrizas, correspondeu aquele que apresentou maior taxa de crescimento em cultura pura.

Para estudar os eventos sequenciais, que ocorreram durante a formação de ectomicorrizas entre *E. globulus* subsp. *bicostata*, *P. tinctorius* e *P. involus*, HORAN et alii (1988) recorreram à técnica do papel sanduiche de CHILVERS et alii

(1986). A sequência de eventos, no processo inicial de infecção foi a mesma para ambos os fungos simbiotes, os quais formaram micorrizas, que se alastraram a mesma taxa. Após o primeiro dia à inoculação, os fungos tinham induzido mudanças nos ápices radiculares, com aparecimento de "flecks" marrons, só visíveis ao estereomicroscópio, mostrando que já houve interação química entre fungos e raízes, sem ligamento físico. Dois dias após a inoculação, uma fina trama de hifas ocorreu ao redor de muitas raízes, com particular acúmulo nos ápices. Em cortes longitudinais poderiam ser visto as hifas invadindo as camadas de células externas, ao redor da região anterior da ponta da raiz e pode ser detectado pela primeira vez um aumento no diâmetro dos tecidos das raízes. Quatro dias após a inoculação, os ápices das raízes já possuíam aparência de micorriza característica. Nesse intervalo, o manto fúngico era bem desenvolvido ao redor da ponta da raiz e o fungo iniciava a penetração nas células epidérmicas. Poucas mudanças ocorreram após o quarto dia da inoculação, exceto para o crescimento em extensão dos ápices micorrízicos, para o aumento da densidade do manto e para o crescimento radial das células epidérmicas.

Antes do desenvolvimento dessas técnicas modernas de cultura axênica, esse tipo de estudo era bastante complexo para ser conduzido, uma vez que as dificuldades em acompanhar a sequência de eventos durante a formação de ectomycorrizas eram grandes.

Vários resultados de trabalhos têm mostrado que, ainda não existe consenso geral, quanto aos efeitos benéficos das ectomicorrizas em *Eucalyptus* sp.. Enquanto se obteve sucesso em algumas inoculações, em outras, o fracasso foi constante. VIEIRA (1984) estudou a formação de ectomicorrizas entre plântulas de *E. grandis* e isolados de *P. tinctorius*. Dos três isolados fúngicos testados em cultura axênica, RVE82 e RVE571 originados de *Eucalyptus* sp. e 185 originado de *Pinus* spp., somente o primeiro apresentou alto grau de infecção micorrízica, embora o segundo isolado tenha apresentado desenvolvimento micelial no substrato. Quando as plântulas foram transferidas para vasos, em casa-de-vegetação, as micorrizas formadas *in vitro* pelo isolado RVE82 se perpetuaram e houve colonização de 95% da amostra de raízes analisada. Em nenhum tratamento se verificou ganho de altura de plântula e de peso de matéria seca, mesmo onde ocorreu alta porcentagem de colonização.

VIEIRA & PERES (1988a) testaram a compatibilidade de seis isolados de *P. tinctorius* em plântulas de *E. grandis*, em condições de casa-de-vegetação, usando solo esterilizado e como inóculo suspensão micelial produzida em meio de cultura MNM. A 23 ppm de fósforo, eles verificaram colonização micorrízica superior a 59% para todos os isolados e benefícios altamente significativos para o hospedeiro, quanto ao peso da matéria seca, a altura de plântulas e ganhos de P, K, N, Ca e Mg. Sob essas condições, cinco isolados não dife-

riram estatisticamente. A 90 ppm de fósforo, embora tenha ocorrido razoável colonização micorrízica, nenhum benefício foi verificado para o hospedeiro.

YOKOMIZO & KRUGNER (1983/85a) não obtiveram sucesso na inoculação de plântulas de *E. saligna* e *E. citriodora*, com isolados de *P. tinctorius* originados de basidiocarpos procedentes de *E. saligna* e de *Pinus taeda*. Quando eles usaram inóculo micelial veiculado em turfa-vermiculita em condições de casa-de-vegetação, nenhuma micorriza foi formada nas plântulas hospedeiras, 130 dias após à inoculação. Quando usaram como inóculo basidiocarpos de mesma origem e sob as mesmas condições, também nenhuma micorriza foi detectada, após seis meses à inoculação. Em ambas as inoculações não houve nenhum ganho na altura de copa e peso seco total das plantas. No entanto, sob as mesmas condições, quando os autores inocularam plântulas de *Pinus elliotti* com micélio e basidiosporos de *P. tinctorius* originados de *Pinus* spp., constataram alta porcentagem de micorrizas no hospedeiro.

Recorrendo à técnica do papel sanduiche descrita por CHILVERS (1986), BACCHI (1988) mostrou que *E. grandis* formou ectomicorrizas com dois isolados de *P. tinctorius* originados de *Eucalyptus* spp.. No entanto, inoculações de plântulas de *E. grandis* e *E. urophylla*, em condições de viveiro, com os dois isolados fúngicos produziram resultados negativos, quanto à colonização micorrízica. Vários tipos de inóculo e vários métodos de inoculação foram utilizados em plântulas das duas espécies hospedeiras, de várias idades, mas sob ne-

nhuma condição foi detectado formação de ectomicorriza típica. Também não foi observado diferenças significativas entre altura, diâmetro do caule e peso da parte aérea entre mudas inoculadas e não inoculadas.

MULLETTE (1986) usando como inóculo basidiocarpo maduro e moído de *P. tinctorius* induziu a formação de ectomicorrizas, em grande quantidade em *E. gummiifera*, sob condições de casa-de-vegetação, em dois tipos de substrato e concentrações variadas de ortofosfato. Na concentração de fósforo de 1 a 5 ppm e inóculo de 4.10^{-3} g esporos/planta, em areia quartzosa, 70% do sistema radicular estava micorrízico, seis meses após à inoculação. Essa porcentagem subiu para 92%, quando o inóculo foi solo arenoso não esterilizado originado de floresta do mesmo hospedeiro.

Benefícios para plântulas de *E. pilularis* resultantes da inoculação com *P. tinctorius* foram encontrados por HEIRINCH et alii (1988). Eles inocularam, com corpos de frutificação esfarelados, plântulas cultivadas em cascalho-areia quartzosa, nutridas com várias formas e concentrações de fósforo. Aos 300 dias, após a inoculação, as plântulas supridas com NaH_2PO_4 (1,5 a 15 ppm), Fe/Al fitato (1,5 a 150 ppm) e Fe/ AlPO_4 (1,5 ppm), 50 a 90% dos ápices radiculares estavam micorrízicos. Além disso, tanto a aquisição de fósforo, como o peso das plântulas foram melhorados.

Com o objetivo de determinar o nível de fósfo-

ro no solo favorável à atividade da associação micorrízica entre *P. tinctorius* e *E. grandis*, SOARES et alii (1985) conduziram um ensaio em latossolo vermelho-escuro esterilizado. A perpetuação das ectomicorrizas, nesse substrato, foi inibida a 160,5 ppm de fósforo. Os efeitos das micorrizas no crescimento e absorção de nutrientes pelas plântulas foram positivos e significativos, entre níveis de fósforo de 0,8 a 8,6 ppm, até aos 77 dias após a inoculação, quando se fez a avaliação.

GARBAYE et alii (1988) estudaram o efeito de seis espécies de fungos ectomicorrízicos sob a forma de inóculo micelial veiculado em turfa-vermiculita, em plântulas de um híbrido de eucalipto (*E. urophylla* x *E. kirtonianana*), no Congo. Em solo fumigado, um isolado de *P. tinctorius* induziu significativas maior colonização e altura de plântulas. Os demais fungos simbiotes foram inferiores e muitos não diferiram da testemunha, não inoculada, mas contaminada por simbiotes nativos. Eles mostram que essas vantagens foram mantidas até 25 meses após o transplante para solo natural de viveiro. Após esse período, todos os tratamentos foram dominados por *Scleroderma* sp., um competidor nativo.

YOKOMIZO & KRUGNER (1983/85a) estudando ectomicorrizas de *P. tinctorius* em *Eucalyptus* spp. observaram que a associação não apresentou efeitos no desenvolvimento do hospedeiro, pelo menos na fase de viveiro.

Neumann* citado por MALAJCZUK et alii (1975) relatou melhor crescimento em plântulas de *E. camaldulensis* na presença de *P. tinctorius*, embora nenhuma micorriza tenha sido formada. O autor atribuiu essa resposta, à atividade do fungo simbiote na rizosfera, mais do que a um efeito simbiótico mais intrínseco.

Uhlig** citado por IMOÑA & PRADO JR. (1978) verificaram o crescimento vigoroso de *E. rostrata*, *E. umbellata* e *E. rudis* em presença de micorriza, em solos básicos, no Sudão.

MALAJCZUK & HARTNEY (1986) citam que trabalhos desenvolvidos por eles (não publicados) mostraram que determinados isolados de *P. tinctorius* estimularam, significativamente o crescimento de *Eucalyptus*, em áreas de mineração de bauxita na Austrália.

O aumento na aquisição de fósforo por plântula de *E. pilularis*, devido à associação ectomicorrízica, em solo deficiente em fósforo e em área fertilizada foi constatado por MULLIGAN & PATRICK (1985). Usando elemento marcado, os autores verificaram que, plântulas infectadas naturalmente, aumentaram a absorção de fósforo. Além disso, as plântulas

* NEUMANN, R. Relationships between *Pisolithus tinctorius* (Mich. ex. Pers.) Eoker et Couch. and *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Bull. Res Counc. Isr. Sect. D Bot., 7: 116-120, 1959.

**UHLIG, S. Beitrag zum problem der mykorrhiza in *Eucalyptus*. Zentralblatt fur Bakterologie, Parasitenkunde, Infektions Krankheiten und hygiene. Jena (Abt-2), 122(3): 271-274, 1978.

colonizadas apresentaram maior ganho no crescimento através de maior aumento na fotossíntese.

PRYOR (1956) cita que, o pobre crescimento e clorose em plântulas e frequentemente morte logo após o segundo e terceiro par de folhas de *E. dives*, *E. pauciflora*, *E. robertsonii* e *E. fastigata*, no Iraque, foram supostamente, provavelmente devido à falta de micorriza. O autor, ainda se refere que, na Nova Zelândia, espécies de *Eucalyptus* do grupo *Renantherae*, quando foram introduzidas tiveram problemas no desenvolvimento, que foi supostamente, ser devido à falta de micorrizas.

Segundo MALAJCZUK et alii (1975), plântulas de *E. calophylla*, em solos lateríticos foram beneficiadas por ectomicorrizas. Em plântulas inoculadas com solo natural, originado de floresta da mesma espécie formaram-se micorrizas abundantemente, as quais aumentaram, significativamente o teor de fósforo no hospedeiro. Também foi observado, que as micorrizas substituíram adubações com alto teor de fosfato. No entanto, quando os autores fizeram inoculações com micélio de *Rhizopogon luteolus*, poucas micorrizas se formaram e nenhum benefício para as plântulas foi detectado.

Plântulas de *E. regnans* foram beneficiadas, quando inoculadas com o fungo ectomicorrízico *Mesophellia arenaria*, tanto em condições de casa-de-vegetação, quanto em condições de campo. Nesta última condição, plântulas inoculadas com

mistura de micélio, corpos de frutificação e micorrizas apresentaram micorrizas piramidais e tiveram a altura aumentada 2,5 vezes, em relação ao controle. Em outro experimento conduzido em casa-de-vegetação, usando solo esterilizado, as plântulas foram inoculadas com corpos de frutificação e micélio. Os resultados indicaram aumento significativo no peso seco e frequência de ectomicorrizas (ASHTON, 1976).

Ectomicorrizas de cor escura, originadas de infecção natural foram formadas entre *E. pilularis* e um fungo ectomicorrízico, supostamente ser *Cenococcum geophilum*. Em condições de casa-de-vegetação, em solo pobre, as plântulas aumentaram, significativamente, a absorção de fósforo, após 96 dias ao semeio. No entanto, nenhum ganho de peso seco foi notado, mas grande número de ectomicorrizas estavam presentes. Passados 176 dias ao semeio ocorreram aumentos na absorção de fósforo e no peso seco das plântulas, os quais estavam correlacionados com o número de micorrizas (HEINRICH & PATRICK, 1986).

Um experimento realizado por LAPEYRIE & CHILVERS (1985), em solo calcário, com infecção micorrízica natural foi obtido crescimento significativo de plântulas de *E. dumosa*. As plântulas inoculadas em casa-de-vegetação, após dois meses possuíam o dobro de crescimento e maior influxo de fósforo, do que as não inoculadas. Esse diferencial cresceu para 8 vezes, com relação à altura das plântulas, e ao peso se

co após cinco meses. Os autores verificaram que, dois meses após a inoculação, as plântulas apresentaram com altos níveis de colonização, principalmente por M.V.A. do gênero *Glomus*. Entretanto, avaliação aos cinco meses mostrou que estava ocorrendo inversão na porcentagem de colonização entre MVA e ectomicorrizas.

A distribuição de ápices ectomicorrízicos no sistema radicular de *E. st. johnii* foi estudada por CHILVERS & GUST (1982). Em condições de casa-de-vegetação, usando como inóculo, solo de floresta da mesma espécie, eles observaram maior número de ápices micorrízicos na metade superior do sistema radicular. Todos os ápices primários e grande número dos secundários não foram infectados. Entretanto, a maioria das ramificações de quarta ordem se transformaram em micorrizas. De acordo com os autores, o aparecimento desses ápices no sistema radicular obedeceu uma ordem cronológica após a germinação: quatro semanas para raízes terciárias e seis semanas para raízes de quarta ordem.

Alto grau de associação entre basidiocarpos de *Scleroderma flavidum* com *E. pauciflora* e *E. robertsonii* foi constatado em florestas no mediterrâneo. Testes experimentais mostraram, que plantas não micorrízicas revelaram descoloração geral e pobre crescimento, enquanto que aquelas micorrízicas apresentaram coloração e crescimento normais após 4 a 8 meses de idade, (PRYOR, 1956).

MALAJCZUK et alii (1984) constataram, em cultura axênica, a formação de ectomicorrizas em *E. diversicolor*, *E. camaldulensis*, *E. marginata* e *E. microcorys* por *Hydmangium carneum*, *Hebeloma crustuliforme* e *Amanita muscaria*. Em substrato com carbono orgânico disponível, as micorrizas formadas apresentaram manto espesso e rede-de-Hartig restrita às células epidérmicas. Quando usaram os simbiontes *Rhizopogon vulgaris* e *Suillus lakei*, específicos para coníferas, nenhuma micorriza foi constatada. No entanto observaram a presença de manto nas raízes dos hospedeiros resultante de um estímulo não específico.

Sob as mesmas condições, MALAJCZUK et alii, (1982) examinaram a capacidade de uma série de espécies de fungos micorrízicos se associarem simbioticamente a uma série de espécies de *Eucalyptus*. *Pisolithus tinctorius* formou micorrizas em todos os hospedeiros testados, mas mostrou maior especialização para determinadas espécies. A colonização micorrízica variou entre 30-69% em *E. marginata*, *E. maculata*, *E. regnans* e *E. diversicolor*; entre 1-29% em *E. camaldulensis*, *E. sieberi*, *E. obliqua*, *E. st. johnii*, *E. calophylla*, *E. microcorys* e *E. dalrympleana*. Os autores observaram que as plântulas de *Eucalyptus* sp. reagiram à inoculação com *Rhizopogon* sp. e *Suillus* sp., mas não formaram nenhuma micorriza.

Na grande maioria dos trabalhos, onde se encontrou efeitos benéficos das ectomicorrizas em *Eucalyptus* sp, os fungos simbiontes testados não prometem boas perspectivas para uso em inoculações artificiais em larga escala. São fun-

gos ainda não cultiváveis em meio de cultura artificial ou de baixa taxa de crescimento, quando comparados com *P. tinctorius*. A dependência ou os efeitos benéficos a *Eucalyptus* sp. por fungos ectomicorrízicos, com vistas ao uso de inoculações em larga escala carece ainda de mais estudos.

2.3. Associações ectomicorrízicas em clones de *Eucalyptus* spp. e de outras espécies hospedeiras.

Recentemente tem sido publicado alguns poucos trabalhos, onde se usou inoculações, em cultura axênica, com fungos ectomicorrízicos, em clones de *Eucalyptus* spp. e outras espécies florestais, originados através de cultura de tecidos ou enraizamento de estaca.

AUER et alii (1985) observaram a formação de ectomicorrizas em "plantlets" de *E. urophylla*, em cultura axênica, em tubo de ensaio. Logo após o enraizamento dos explantes, no próprio meio de cultura para enraizamento inocularam discos de meio de cultura contendo micélio de *P. tinctorius*. Após três semanas foi constatado o crescimento das "plantlets" e de *P. tinctorius* sobre o meio de cultura e sobre as "plantlets". Também verificaram colonização ectomicorrízica do sistema radicular, com desenvolvimento de manto micelial esparço e alterações na coloração das raízes.

POISSONNIER (1986), em cultura axênica induziu a formação de ectomicorrizas por isolados de *P. tinctorius* (originados de *Pinus pinaster* e de *E. dalrympleana*) e por *P. involutus*

em clones de *E. gunnii*, originados do enraizamento de micro-estacas de gemas. Em todos os quatro substratos testados, vermiculita, perlita, celulose e blocos de lã-de-rocha, umedecidos com o meio de cultura MNM e inoculados com micélio foi notado a formação de micorrizas por todos os isolados dos fungos simbiontes. Após 3 a 4 semanas a inoculação, somente ao redor do local de colocação do inóculo formou-se micorrizas, as quais foram pouco visíveis a olho nu. Aparentemente, os fungos prejudicaram o crescimento dos clones. Passadas 6 a 7 semanas da inoculação, em 26% e 25% dos clones inoculados obteve-se a síntese de micorrizas por *T. tinctorius* e *P. involutus*, respectivamente. Cortes das micorrizas observados ao microscópio mostraram manto bem espesso, com hifas densas e rede-de-Hartig bem desenvolvida. Também, o autor verificou alta porcentagem de cortes com manto, mas sem rede-de-Hartig.

MALAJCZUK & HARTNEY (1986) desenvolveram estudos comparando a colonização micorrízica em "plantlets" e plântulas de *E. camaldulensis* com vários isolados de *P. tinctorius*, *Scleroderma paradoxum*, *Hydnangium carneum* e *Laccaria laccata*. Em cultura axênica, "plantlets" inoculados com micélio, logo após o início do enraizamento houve crescimento das quatro espécies fúngicas sobre o substrato agarizado. Após cinco semanas à inoculação, os fungos tomaram quase toda a parte aérea das "plantlets" e muitas já tinham morrido abafadas, particularmente aquelas inoculadas com *P. tinctorius*. Micorrizas fo-

ram formadas somente nas raízes que cresceram acima da superfície do meio de cultura agarizado e em maior porcentagem por *P. tinctorius* e *S. paradoxum*. Para as "plantlets", que após duas semanas à inoculação foram transferidas para tubetes, a sobrevivência pós transplante foi melhorada, em relação à testemunha não inoculada, mas somente para determinados isolados dos fungos simbiotes. Após 12 semanas ao transplante para tubetes, as micorrizas de todos os isolados se perpetuaram, extensivamente, exceto para *Hysterangium carneum*. Não houve incremento de algum ganho nas "plantlets" inoculadas. Para plântulas inoculadas com micélio em turfa-vermiculita -a-reia ocorreu substancial formação de ectomicorrizas somente com um dos 14 isolados de *P. tinctorius* e com os de *L. laccata* e *H. carneum*. Isolados de *S. paradoxum* e *H. carneum* não iniciaram formação de nenhuma ectomicorriza. Não existiram diferenças significativas entre plântulas micorrízicas e não micorrízicas.

O desenvolvimento de ectomicorrizas foi mostrado ocorrer, em cultura axênica, entre "plantlets" de *E. gunnii* e *P. involutus*. Após o enraizamento das gemas, as "plantlets" foram transferidas para turfa-vermiculita umidecidas com solução nutritiva e inoculadas com suspensão micelial. O crescimento simultâneo do fungo e hospedeiro no substrato permitiu a formação de grande quantidade de micorrizas, com manto e rede-de-Hartig bem evidentes (REYNOIRD & STRULLU, 1986).

A formação de ectomicorrizas em cultura axêni-

ca e seu benefício para clones de castanheira (*Castanea sativa*) foram mostrados por STRULLU *et alii* (1986), usando como fungo simbiote *P. involutus*. Após o enraizamento de micro estacas inocularam os clones em turfa-vermiculita, com suspensão micelial e passadas 9-10 semanas já foi possível detectar a altura superior das plantas. Após 22 semanas à inoculação, cortes observados ao microscópio mostraram manto e início de formação da rede-de-Hartig nas raízes secundárias.

PARK (1971) induziu a formação de ectomicorrizas em estacas enraizadas de *Tilia americana* com *Genococcum grani-forme* e *Lactarius* sp., em condições de casa-de-vegetação. Após seis meses à inoculação com micélio dos fungos, 58,2% dos clones apresentaram micorrizas. Em cortes observados ao microscópio foi confirmada a presença de ectomicorrizas características, com manto de rede-de-Hartig.

Para estudar a atividade de fosfatases, ANTI-BUS *et alii* (1981) induziu a formação de ectomicorrizas por *Hebeloma pusillum*, *Genococcum geophilum* e *Entoloma sericeum* em clones de *Salix rotundifolia*, originados de enraizamento de estacas. Dos vários isolados fúngicos testados, todos aqueles de *E. sericeum* e *H. pusillum* formaram micorrizas típicas, enquanto que o mesmo não ocorreu com os isolados de *C. geophilum*. Para essa espécie fúngica, apenas os isolados originados de ecossistemas com temperaturas mais elevadas se associaram ao hospedeiro.

2.4. Associações ectomicorrízicas em plântulas de outras espécies hospedeiras.

Grande número de trabalhos, tratando de vários aspectos da simbiose mostraram a facilidade do desenvolvimento de ectomicorrizas em diversas espécies hospedeiras originadas de clima temperado (FINLAY & READ, 1986; HUNG & CHIEN, 1979; PICHE & FORTIN, 1982; MARX, 1980a; MARX & BRYAN, 1974; MARX & BRYAN, 1975; PONS et alii, 1986; SUGGS & GRAND (1972).

Desde 1917, Melin*, citado por MEYER (1974) observou, em condições de campo, que algumas espécies de *Pinus* e *Picea* não cresciam e desenvolviam ou eram muito definhadas, na ausência de fungos ectomicorrízicos. Schramm**, citado por MARX (1980a) relata que *P. tinctorius* foi essencial para o estabelecimento de *Betula*, *Pinus*, *Populus* e *Quercus* em depósito de minas de antracite nos Estados Unidos. O autor cita as vantagens de ectomicorrizas formadas por *P. tinctorius*, em relação a outros fungos, para a sobrevivência e crescimento de plântulas de *Pinus* spp., em locais adversos.

FORTIN et alii (1980) desenvolveram a "técnica de sacos de crescimento de poliéster", para estudar o desenvolvimento de ectomicorrizas em plântulas de *Pinus strobus*. De

* MELIN, E. Norrl. Handbibl., 7:1-426, 1917.

**SCHRAMM, J.E. Plant colonization studies on black wastes from anthracite mining in Pensylvania. Amer. Philoso Soc.. 56:1-134, 1966.

seis espécies de fungos ectomicorrízicos testados, somente *P. tinctorius* e *C. graniforme* se associaram ao hospedeiro. Através de avaliações diárias foi possível notar, que após cinco dias à inoculação houve formação de manto e rede-de-Hartig. Os autores relataram, que existiu extensivo desenvolvimento de hifas na superfície e ao lado das raízes, no sentido acrópeto, em decorrência do estímulo químico dos exsudados.

Os estágios iniciais de formação de manto e estabelecimento de rede-de-Hartig entre *Amanita muscaria* e *Picea abies*, em cultura axênica foram examinados por KOTTKE & OBERWINKLER (1986). Eles denotaram que, a decomposição das células da coifa da raiz parece ser um fator comum e facilita o contato com as células corticais. Esse processo parece, também estimular a formação de manto, uma vez que as hifas formaram uma estrutura pseudo-parenquimática. Não existiu nenhum desenvolvimento da rede-de-Hartig no ápice meristemático das raízes e as hifas digeriram as células moribundas da coifa. Além disso, a fonte nutricional do substrato exerceu efeito importante no processo morfogênético de formação do manto.

No entanto, através de estudos realizados no desenvolvimento de ectomicorrizas em *Picea abies* por *Piloderma croceum* (*Corticium bicolor*), NYLUND & UNESTAM (1982) observaram, que os eventos sequenciais na formação de micorrizas foram diferentes daqueles relatados ocorrer em *Eucalyptus* sp.. Inicialmente, próximo às raízes, existiu notável estímulo no crescimen

to do fungo. Uma vez alcançada a raiz, o fungo formou um envelope de hifas mais adensadas e cresceu mais rapidamente sobre as radicelas, do que sobre o substrato. Após a formação desse envelope, diferente do manto, as hifas originadas dele penetraram na epiderme em vários pontos, somente na região do córtex maduro. Após o início da penetração das hifas nas células corticais é que teve início a formação do manto verdadeiro.

WARRINGTON et alii (1981) fizeram ver, que a penetração de hifas de *P. tinctorius* em raízes de *Pinus taeda* ocorre, concomitantemente ao início de formação de manto. Eles também concluíram, que nas raízes já existem aberturas para pronta penetração das hifas. Além disso notaram que, as hifas poderiam penetrar diretamente, rompendo a epiderme. Afirmaram que, dependendo das espécies hospedeira e fúngica, a rede-de-Hartig pode ser formada concomitante e até antes do manto estar completamente formado.

A resposta de *Pinus contorta* em turfa-vermiculita, em casa-de-vegetação, à inoculação de micélio de *P. tinctorius* ocorreu mesmo com baixa porcentagem de colonização micorrízica. Seis semanas após a inoculação, no máximo 7,04% do sistema radicular havia sido colonizado e o hospedeiro apresentou resposta significativa no crescimento (EKWEBELAM & REID, 1983). No entanto, MARX et alii (1984) verificaram, em condições de campo, que efeitos benéficos, significativos para plantas de *Pinus* sp., somente foram obtidos, quando no mi

nimo metade das raízes estavam micorrízicas com *P. tinctorius*. HARLEY & SMITH (1982) afirmaram que, alta porcentagem de colonização micorrízica, nem sempre implica em ganho de crescimento do hospedeiro. Eles relataram que raízes de *Pinus radiata* com 72% de infecção de *Rhizopogon roseolus* não apresentaram maior peso e altura, do que plantas não micorrízicas. Frequentemente, diferentes combinações hospedeiro-isolados fúngicos apresentaram eficiências diferentes no crescimento da planta. Marx*, citado pelos autores, estudando o efeito de diferentes isolados de *P. tinctorius*, em plântulas de *Q. rubra* mostrou que três diferentes isolados induziram diferentes ganhos de altura e peso seco no hospedeiro e diferentes porcentagens de colonização ectomicorrízica.

MARX & BRYAN (1970) mostraram que um isolado de *P. tinctorius* originado de *Pinus* spp. reagiu, diferentemente, quanto à formação de micorriza, com várias espécies de *Pinus*. Não se associou com *Pinus aristata*, *P. contorta*, *P. griffithii*, *P. lambertiana* e *P. ponderosa*. Infectou pobremente *P. clausa*, *P. densiflora*, *P. echinata*, *P. ellioti* var. *ellioti*, *P. nigra*, *P. palustris*, *P. strobus* e *P. taeda*. Associou-se moderadamente com *P. banksiana*, *P. pinaster*, *P. resinosa*, *P. rigida* e *P. sylvestris*. E formou alta porcentagem de micorrizas em *P. virginiana*. Os autores, também verificaram comportamento semelhante para dois

*MARX, D.H. Synthesis of *Pisolithus* ectomycorrhizae on white oak seedlings in fumigated nursery soil. For. Service Research Note, USDA, 3E 280.

isolados de *T. terrestris* em várias espécies de *Pinus*.

MARX et alii (1984) testando inóculo micelial de *P. tinctorius*, em várias espécies de *Pinus*, em vários locais dos Estados Unidos, em três anos sucessivos e simulando produção de inóculo e inoculação em escala comercial conseguiram resultados bastante promissores. O inóculo produzido em turfa-vermiculita e lavado em água promoveu ganhos significativos para os hospedeiros. No entanto, quando esse mesmo inóculo não foi lavado em água, a porcentagem de micorrizas desenvolvidas, de maneira geral foi baixa, sem ganho de crescimento para os hospedeiros.

Grandes diferenças foram encontradas entre isolados de *R. luteolus* na formação de ectomicorrizas em *Pinus radiata*, em solo esterilizado, *in vitro*. Dos cinco isolados testados, somente em dois observou-se correspondência entre crescimento em meio de cultura e a capacidade de formar micorrizas (THEODOROU & BOWEN, 1971).

BENECKE & GOBL (1974) mostraram a importância de se conhecer o fungo ectomicorrízico a ser utilizado nas inoculações. Plântulas de *Pinus mugo* foram significativamente beneficiadas por *Hebeloma mesophaeum*, do que quando inoculadas por inóculo natural constituído de população de fungos nativos.

Não só no hospedeiro *Pinus* spp. existe grande número de trabalhos sobre ectomicorrizas, mas também em *Quercus*

spp, que é bastante micotrófico, essa simbiose vem sendo muito estudada.

Plântulas de carvalho (*Quercus velutina*) inoculadas com micélio de *P. tinctorius* tiveram benefícios significativos, quando a associação se estabeleceu. Em casa-de-vegetação, usando solo esterilizado, o peso total, o peso seco, a área foliar e o número de raízes laterais foram, significativamente aumentados. Em viveiro, 40% dos ápices radiculares haviam se transformados em micorrizas após 8 meses. Nessa condição, o aumento no crescimento das plântulas foi significativo, com acréscimos no peso seco, na parte aérea e no diâmetro do coleto (DIXON et alii, 1981a). DIXON et alii (1981b) também inocularam plântulas do mesmo hospedeiro, com outro isolado do mesmo fungo simbiote, sob as mesmas condições e compararam o efeito resultante após o transplante para o campo, usando mudas em torrão e de raiz nua. Após um ano, tanto em casa-de-vegetação, como em viveiro houve aproximadamente 40% de colonização do sistema radicular. No entanto, as plântulas inoculadas em viveiro foram significativamente maiores do que as da casa-de-vegetação. A porcentagem de sobrevivência, o crescimento da parte aérea e das raízes das mudas em torrão aumentaram significativamente, em relação às mudas de raiz nua após o transplante para o campo.

DIXON et alii (1984) testaram 11 isolados de *P. tinctorius*, *C. geophilum*, *T. terrestris* e *S. luteus* em *Q. alba*, *Q. velutina* e *Q. robur*, para quantificar o desenvolvimento ectomi

corrízico e o seu relacionamento com o crescimento das plântulas. Em condições de casa-de-vegetação, usando inóculo micelial, todos os isolados testados formaram micorrizas, mas em porcentagens bastante variáveis, dependendo da combinação espécie hospedeira-isolado. Dois isolados de *P. tinctorius*, um de *T. terrestris* e um de *S. luteus* foram os melhores e estimularam aumento no crescimento e peso seco radicular. Entretanto, entre todos os isolados, dois outros de *P. tinctorius* tiveram o pior comportamento na formação de micorriza.

MITCHELL et alii (1984) estudaram a eficiência de 11 isolados de *P. tinctorius*, *S. granulatus*, *S. luteus*, *T. terrestris* e *C. geophilum* em *Q. alba*, *Q. velutina* e *Q. robur*. Em casa-de-vegetação, usando inóculo micelial, todos os isolados desenvolveram micorriza em cada espécie de carvalho. No total, *Q. robur* teve 39% das raízes laterais infectadas, *Q. velutina*, 29% e *Q. alba*, 22%. A interação entre os cinco isolados testados de *P. tinctorius* com as espécies de carvalho ficou bem evidenciada, com alguns deles apresentando a mais alta taxa de colonização e outros as mais baixas. Quanto ao conteúdo de nutrientes foliar, muitas interações existiram entre os isolados de cada espécie fúngica, com cada espécie hospedeira.

As vantagens da inoculação de *Q. velutina*, com inóculo micelial de *P. tinctorius* e *S. luteus*, em casa-de-vegetação foram comparadas por DAUGHTRIDGE et alii (1986). Ambos os fungos estimularam o crescimento, a área foliar, o peso de folhas, caule e raízes, em relação à testemunha não inocu

lada, após 19 semanas à inoculação. *Pisolithus tinctorius* foi, significativamente superior a *S. luteus* em todas as variáveis analisadas. A porcentagem de infecção das raízes foi de 78% para *P. tinctorius* e 58% para *S. luteus*. Após a quarta semana a inoculação havia menos de 5% de micorrizas, mas ainda foi o suficiente para induzir estímulo, significativo no crescimento.

A formação de ectomicorrizas entre *P. tinctorius*, *C. geophilum*, *S. auranteum* e *R. nigrescens* com *Q. rubra* foi estudada por BECKJORD & MCINTOSH (1984). Sob condições de casa-de-vegetação e empregando inóculo micelial, todos os fungos induziram o desenvolvimento micorrízico, exceto *R. nigrescens*. Quatro semanas após a inoculação, as plantas estavam mais desenvolvidas e foram transplantadas para o campo, em dois locais. Em solo silte-argiloso distrófico, após duas estações, as plantas inoculadas com *P. tinctorius*, *C. geophilum* *S. auranteum* apresentaram maior crescimento em relação à testemunha não inoculada e diferenças significativas entre os tratamentos. Em solo de resíduo de mineração, aconteceu ótimo desenvolvimento das associações ectomicorrízicas, mas não ocorreu nenhuma diferença significativa entre os tratamentos.

2.5. O efeito negativo de alguns fatores na formação de ectomicorrizas

A formação de ectomicorrizas, tanto no aspecto quantitativo, quanto no aspecto qualitativo está sob a influ

ência de vários fatores, que podem ser intrínsecos aos hospedeiros ou de origem externa.

Trabalhos nesta área foram unânimes em mostrar o efeito negativo da flora microbiana do solo.

RIDGE & THEODOROU (1972), relataram que bactérias do tipo *Pseudomonas* fluorescentes, recolonizadoras de solo esterilizado decresceram de maneira significativa, a colonização de *R. luteolus* em raízes de *Pinus radiata*. Resultados semelhantes foram encontrados por Bowen & Theodorou*, citados por BOWEN & THEODOROU (1973). MARX (1973) observou que plântulas de *Pinus* sp. inoculadas com substrato contendo *P. tinctorius*, contaminado por fungos e bactérias saprofíticos, não foram colonizadas. Sob as mesmas condições, BRYAN et alii (1945), encontraram que isolados de *Penicillium gensemi* produziram o antibiótico gliotoxin, que teve forte efeito deletério sobre os fungos ectomicorrízicos *S. bovinus*, *S. grevillei* e *C. graniforme*.

Segundo MARX & ROSS (1970) inoculações de basídeos de *T. terrestris* induziram abundante colonização ectomicorrízica em *Pinus taeda*, em cultura axênica. No entanto, quando as plântulas estavam contaminadas por *Penicillium* sp., não existiu nenhuma infecção.

* BOWEN, G.D. & THEODOROU, C. 1971. Dados não publicados.

O inóculo de fungos ectomicorrízicos produzido em turfa-vermiculita ou substrato similar, adicionado ao solo, torna-se rapidamente colonizado por microrganismos saprófitas. Como consequência poderá ocorrer redução na eficiência do inóculo. Com isso deve-se reduzir ao máximo, a concentração de açúcares, que acompanham o inóculo (MARX & KENNEY, 1982).

SUMMERBELL (1987) testou *in vitro*, o efeito antagonístico de 10 espécies fúngicas à infecção micorrízica de *Picea mariana* por *Laccaria bicolor*. Em plântulas com 30 dias de idade inoculadas com o fungo micorrízico e em seguida com os antagonistas, após seis semanas de incubação, quatro espécies inibiram a colonização: *Trichoderma viridi*, *T. polysporum*, *T. inflatum* e *T. beigelii*. *Trichoderma viridi* previniu completamente a associação simbiótica e *T. polysporum* foi igualmente antagônico, quando conídios estavam presentes. As outras seis espécies, *Fusarium proliferatum*, *Toly cladium inflatum*, *Mortierella verticillata*, *M. isabellinus*, *M. atrovirens-alpha* e *Penicillium spinulosum* não tiveram nenhum efeito. Em inoculações mais atrasadas com *T. viridi*, após a formação micorrízica, a perpetuação da associação simbiótica foi reprimida. Testes em meio de cultura não mostraram nenhum efeito antagonístico.

Em condições axênicas, DUDDRIDGE (1986b) enfocou a importância do teor de açúcares disponíveis no meio de síntese de ectomicorrizas de *S. grevillei* com *Larix kaempferia*, *Pinus sylvestris*, *Betula pubescens* e *Allocasuarina inopholia*. Fitomi-

crografias mostraram que mudanças dramáticas foram produzidas na estrutura da interfase hospedeiro-fungo, quando se adicionou glicose no meio de síntese. Além disso, a agressividade do fungo micorrízico estava em relação direta com a quantidade de energia no meio síntese. Esse aumento da agressividade foi demonstrada por frequente penetração intracelular, entumecimento e degradação de áreas localizadas na parede do hospedeiro e espessamento e aposições na parede. Tais mecanismos de reação não ocorreram na simbiose na ausência de glicose.

Outro fator, que pode afetar na formação de ectomicorrizas, pouco estudado e bastante polêmico, quanto ao seu efeito negativo é o envolvimento de compostos fenólicos ou outras barreiras químicas e físicas de origem hospedeira.

A indução na produção de fitoalexinas e seu efeito na formação de micorrizas orquidáceas foi bem documentado (MARX, 1973; HARLEY & SMITH, 1982).

SYLVIA e SINCLAIR (1985a) mostraram que a infecção de *Pseudotsuga menziesii* por *Laccaria laccata* elicitou a produção de compostos fenólicos nas células corticais, que protegeram o hospedeiro do ataque de *Fusarium oxysporum*. Eles verificaram ainda que metabólitos do fungo simbiote induziu o mesmo tipo de resposta e que, os compostos fenólicos formados não interferiram na colonização micorrízica.

MALAJCZUK et alii (1982; 1984) estudando a com-

patibilidade de várias espécies de fungos ectomicorrízicos e seus hospedeiros verificaram que, muitas espécies de *Eucalyptus* reagiram a *Rhizopogon* sp. e *Suillus* spp. com escurecimento das células epidérmicas e corticais das raízes curtas. Os autores afirmaram que se tratava, provavelmente do acúmulo de compostos fenólicos. Nenhuma reação nas raízes de *Eucalyptus* sp. foi observada para os outros isolados de fungos incompatíveis testados.

A produção de fenóis por raízes de *E. fastigata* infectadas naturalmente por fungos ectomicorrízicos foi verificado por LING LEE et alii (1977). Usando métodos histoquímicos, os autores observaram a presença de fenóis, largamente distribuídos, tanto em raízes colonizadas, quanto em raízes não colonizadas. Nas micorrizas, eles encontraram que, os fenóis estavam presentes nos vacúolos das células da coifa, da epiderme, do cortex externo, endoderme, em algumas células da medula e também como depósitos derivados das células da coifa da raiz embebidos na bainha fúngica. Os autores suspeitavam que, somente os fenóis vacuolares das células epidérmicas mostraram evidências de serem produzidos devido a uma resposta à presença dos fungos micorrízicos. Além disso notaram que, os fenóis pareceram não oferecer nenhuma barreira à colonização pelos fungos ectomicorrízicos.

HARLEY & SMITH (1982) afirmaram que, tanto cé

lulas epidérmicas, como células corticais de *E. fastigata*, quando infectadas por fungos micorrízicos, podem produzir compostos fenólicos em seus vacúolos. Os autores lembraram que os compostos fenólicos observados por LING LEE et alii (1977) e supostamente serem produzidos pela influência do fungo micorrízico em *E. fastigiata* estavam compartimentalizados nos vacúolos. Eles afirmaram que não existe nenhuma concordância sobre o efeito de fungos micorrízicos na produção de fenóis e nem na sua função. GODBOUT & FORTIN (1985) afirmaram que a presença de açúcares no meio de síntese induz pronunciada resposta com produção de compostos fenólicos.

MALAJCZUK et alii (1987) investigaram a associação ectomicorrízica entre *E. marginata*, *E. diversicolor* e *Cortinarius globuliformis*, *C. ochraceus* e *Hysterangium inflatum*, em florestas no Norte da Austrália. Constataram que as espécies de *Cortinarius* foram dominantes na flora de fungos superiores. Embora tivesse ocorrido alta colonização, cortes das micorrizas mostraram que, a infecção resultou no acúmulo de compostos fenólicos nos tecidos das raízes. Esse acúmulo ocorreu especialmente na epiderme e regiões da hipoderme. Também ficou evidenciado lignificação da hipoderme e células corticais externas.

DELL & WALLACE (1981) analisando cortes de raízes de *E. marginata*, originado de floresta onde existia a presença de *Phytophthora cinnamomi* encontraram o seguinte: a coifa continha materiais fenólicos e as paredes das células exter-

nas do córtex continham proeminente banda de espessamento; a camada de células hipodérmicas possuía as paredes suberizadas; nas raízes curtas, a parede da primeira e segunda camadas de células corticais possuíam a parede secundária lignificada; as camadas de células corticais mais internas eram impregnadas com depósitos de polifenóis. Os autores discutiram que, essas reações poderiam ser uma resposta ativa de resistência à infecção fúngica.

Segundo DUDDRIDGE (1986a), plântulas de *Pinus sylvestris* e *Pseudotsuga menziesii* formaram ectomicorrizas com *S. grevillei*, in vitro e concomitantemente ao processo de infecção fúngica ocorreram aumentos nas quantidades dos compostos fenólicos na interfase fungo-hospedeiro. Também observou formação de aposições nas paredes, frequentemente.

PICHÉ et alii (1981) não encontraram nenhuma diferença nos compostos fenólicos de raízes micorrízicas e não micorrízicas de *Pinus strobus* infectados por *P. tinctorius*. Eles concluíram, que os compostos fenólicos nas raízes micorrízicas são inerentes à planta hospedeira e não são produzidos como reação à infecção.

A atividade de fenilalanina amônia liase e peroxidase foi medida por RONALD & SODERHALL (1985), em plântulas de *P. sylvestris* inoculadas e não inoculadas por *L. lacca*-*ta*, in vitro. A atividade de peroxidase medida em extratos de plantas micorrízicas e não micorrízicas foi a mesma. Nenu-

ma atividade significatica de peroxidase foi detectada em *L. laccata*. No entanto, a atividade de fenilalanina amônia liase foi, aproximadamente duas vezes mais alta em raízes micorrízicas. Todavia, os autores mostraram, que essa atividade a mais de fenilalanina amônia liase se deveu à atividade dessa enzima também presente no fungo simbiote.

De acordo com KOTTE & OBERWINKLER (1986), a formação de ectomicorrizas em *Picea abies* por *Amanita muscaria* ocorreu concomitantemente às reações de defesa nas células das raízes. Eles relataram a ocorrência de crescimentos internos da parede celular nas células corticais (estruras de transferência) em contato com as hifas penetrando inter-celulamente e observaram hifas dissolvendo paredes celulares das células da coifa contendo polifenóis. Os autores relataram que não existiu nenhuma invasão de células vivas contendo depósitos de polifenóis na periferia interna da parede, ou com gotículas de polifenóis nos vacúolos, mas somente de células da coifa totalmente cheias de polifenóis.

Plântulas de *Alnus glutinosa*, *A. incana*, *A. rhombifolia* e *A. sinuata* reagiram à inoculação com *P. involutus*, formando ectomicorrizas não típicas, com manto e rede-de-Hartig não característicos, *in vitro*. Raízes dos hospedeiros reagiram fortemente à infecção, produzindo compostos fenólicos nas células epidérmicas e corticais adjacentes às hifas. Anéis desses compostos foram encontrados em células epidérmicas e corticais, em contato imediato com hifas do manto circundan-

do as radicelas. Nenhuma rede-de-Hartig foi visível. Resultados similares, também foram encontrados, quando se inoculou *P. tinctorius* em *A. glutinosa*, sob as mesmas condições (MOLINA, 1981).

Parece que em determinadas associações ectomícorrizicas compatíveis, o fungo simbiote pode induzir alguma reação de defesa no hospedeiro. Mas apesar disso, alguns trabalhos mostraram evidências, que essas mudanças não impediram a formação de micorriza. Esse aspecto já foi bem mostrado em M.V.A., onde o fungo infectante induziu produção de fitoalexina pelo hospedeiro, que foi tóxica a fitopatógenos, mas não ao fungo M.V.A.

Outro fator que merece ser chamado atenção é que, em alguns trabalhos foi analisado fenóis totais nas raízes e muitos desses compostos estão compartimentalizados nas células e portanto inativos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As "plantlets" (plantas clonais produzidas através de cultura de tecidos) utilizadas nos ensaios foram de *E. urophylla*, *E. grandis* e um híbrido originado do cruzamento das duas espécies.

A metodologia empregada para a obtenção das "plantlets" foi aquela utilizada por GONÇALVES (1980, 1982) e ROTH (1984).

Os explantes para o estabelecimento da cultura de gemas e subsequente produção de clones originaram-se de segmentos nodais de ramos de crescimento do ano, da copa das árvores. A seguinte marcha foi desenvolvida:

- a. coleta de ramos de crescimento anual das árvores no campo;
- b. transporte dos ramos ao laboratório, acondicionados em sacos plásticos abertos, com água na base;
- c. no laboratório procedeu-se ao desfolhamento dos ramos;
- d. lavagem dos ramos desfolhados com detergente comercial;
- e. remoção dos segmentos nodais;

- f. lavagem dos segmentos nodais em água corrente por 30 minutos;
- g. tratamento dos segmentos nodais com benlate (benomil- 250 g/l), em banho com borbulhamento, por 30 minutos;
- h. tratamento dos segmentos nodais com hipoclorito de sódio a 1%, por 30 minutos, em câmara asséptica;
- i. lavagem dos segmentos nodais em água destilada, por três vezes;
- j. lavagem dos segmentos nodais em ácido clorídrico 0,01N, esterilizado, por cinco minutos;
- k. lavagem dos segmentos nodais em água esterilizada por três vezes;
- l. cultivo dos explantes.

Os explantes foram cultivados em tubo-de-ensaio 18x150 mm, contendo 10 ml do meio de cultura desenvolvido por GONÇALVES (1980), modificado por GONÇALVES* (1987). A composição desse meio de cultura se encontra no apêndice 1. Para o estabelecimento da cultura de gemas, a partir dos explantes nodais, o hormônio regulador usado foi 6-benzilamino purina (6-BAP), na concentração de 1mg/l de meio de cultura.

*GONÇALVES, A.N. (departamento de Ciências Florestais ESALQ-USP) comunicação pessoal, 1987.

Após a multiplicação das gemas, as culturas foram transferidas para erlenmeyers de 125 ml, contendo 40 ml do meio de cultura relacionado no Apêndice 1, para que ocorresse o alongamento. Para esta função, dois hormônios reguladores foram empregados; ácido indol acético (AIA) e 6-benzilaminopurina (6-BAP) nas concentrações de 1 mg/l e 0,5 mg/l, respectivamente. Para *E. urophylla*, o período de alongação foi de 24-26 dias, para *E. grandis*, de 30-35 dias e para o híbrido, de 15-18 dias.

As gemas alongadas foram transferidas para placas-de-Petri, separadas individualmente e repicadas para tubos de ensaio 13 x 100 mm, contendo 5 ml do meio de cultura relacionado no Apêndice 1. Para induzir o enraizamento das gemas, o hormônio utilizado foi ácido indolbutírico (AIB), na concentração de 0,2 mg/l.

Antes de serem adicionados aos meios de cultura, os hormônios foram solubilizados em KOH (solução 1 N), usando três gotas para cada litro de meio de cultura.

As culturas dos explantes foram mantidas em laboratório, sob fotoperíodo de 16/8 horas, com luz complementar de 300 lux, fornecida por 50% de lâmpadas gro-lux e 50% de lâmpadas fluorescentes luz do dia. O período de enraizamento foi de aproximadamente 20 dias para *E. urophylla*, 28 dias para *E. grandis* e 15 dias para o híbrido.

Após o enraizamento, as "plantlets" estavam

prontas para as inoculações com o fungo ectomicorrízico *P. tinctorius*.

As "plantlets" de *E. urophylla*, *E. grandis* e do híbrido foram codificadas no laboratório de cultura de tecidos, do Departamento de Ciências Florestais com Cl, G0245 e Y0001, respectivamente.

As plântulas utilizadas nos ensaios se constituíram das espécies de *E. urophylla* e *E. grandis*. Sementes de ambas as espécies, separadas de resíduos de frutos foram desinfectadas pela passagem sucessiva em álcool 70%, por 30 segundos e em hipoclorito de sódio 2%, durante cinco minutos. Em sequência, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada-esterilizada e colocadas para germinar em placa-de-Petri contendo solução de SARRUGE (1975), agarizada a 1,5%. A composição dessa solução encontra-se no Apêndice 2. Em seguida incubou-se as placas-de-Petri sob luz fluorescente, com fotoperíodo de 12/12 horas, a 27°C. Após 7 a 8 dias, quando as raízes atingiram cerca de 2 cm, as plântulas foram retiradas e utilizadas nos ensaios experimentais.

O substrato empregado para condução dos ensaios em cultura axênica, em tubos-de-ensaio constituiu-se de uma mistura de turfa-vermiculita (1:9 V/V). A vermiculita foi lavada três vezes em água destilada e secada em estufa a 60°C. A turfa apresentou as seguintes características: pH 4,0; 38% de carbono - 14 ppm de P - 38 ppm de K - 15,6 - 30,4 e 0,51 meq/100 ml de Ca + Mg e Al, respectivamente.

Todas as soluções nutritivas e meios de cultura para crescimento de *P. tinctorius* e/ou hospedeiros foram corrigidas para pH 5,5 - 5,8, usando HCl ou NaOH.

Nos ensaios para verificar a perpetuação de ectomicorrizas formadas em cultura axênica, o substrato empregado foi solo silte-argiloso, que vinha sendo utilizado no viveiro do Departamento de Ciências Florestais-ESALQ, com as seguintes características: pH 4,9 - 0,3% de carbono - 5 ppm de P - 41 ppm de K - 2,4 + 0,64 meq/100 ml de Ca e Mg, respectivamente - 0,13 meq/100 ml de Al - 3,14 meq/100 ml de S e 4,34 meq/100 ml de CTC. Esse solo foi misturado com areia lavada e peneirada, na proporção de 4:1 (V/V), posteriormente adubado com a fórmula NPK (4-14-8), na proporção de 20ppm de P_2O_5 . Em seguida esterilizou-o em autoclave a 120°C por quatro horas.

Em todos os ensaios utilizaram-se seis isolados de *P. tinctorius*. Três deles foram fornecidos pela micoteca do Centro Nacional de Pesquisa do Cerrado (EMBRAPA-Planaltina - DF) e codificados como RVE851, RVE854, RVE 82-1 e os outros três retirados da micoteca do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (Piracicaba - São Paulo) e codificados como E4, E6 e E7. O isolado RVE851 foi coletado de *E. tereticornis* em 1985, o RVE 854 de *Eucalyptus* spp., o RVE82-1 de *E. grandis* em 1982 e reisolado em 1986, o E4 de *E. grandis*, o E6 de *Eucalyptus* spp. e o E7 coletado de *E. citriodora*. Os três últimos isolados foram co-

letados em 1986. A escolha desses isolados foi baseado nas características físicas das colônias no meio de cultura Melin-Norkrans modificado MNM por MARX (1969). A composição desse meio de cultura encontra-se no apêndice 3. A ordem decrescente da taxa de crescimento dos isolados, no início do primeiro ensaio foi RVE854, RVE82-1 = E6 = E4, RVE851 e E7. No decorrer da execução dos ensaios ocorreram modificações nessa ordem. Os isolados RVE854, RVE851 possuíam colônias de coloração amarela-escura; E6 e RVE82-1 amarela-clara e E4, E7 tonalidade amarela intermediária. Os isolados RVE854, RVE851, RVE82-1, E4 e E6 possuíam crescimento denso de hifas; E7 possuía crescimento bem espalhado das hifas, no início do primeiro ensaio. No decorrer da condução dos ensaios esse comportamento modificou-se para alguns isolados. O isolado RVE851, além do crescimento horizontal sobre o meio de cultura formava colônia com acentuado crescimento vertical.

O inóculo utilizado em todos os ensaios, à exceção daqueles onde se adotou a técnica do papel sanduíche foi constituído de discos de meio de cultura contendo micélio dos isolados de *P. tinctorius* retirados dos bordos de colônias com 18-20 dias de idade, desenvolvidas em meio de cultura MNM, em placas-de-Petri.

Em todos os ensaios, o delineamento experimental adotado foi o de blocos inteiramente casualizados, com quatro repetições por tratamento, envolvendo plântulas e com três repetições por tratamento, envolvendo "plantlets".

Para cada ensaio definitivo foi desenvolvido , no mínimo, um ensaio preliminar.

3.1. Desenvolvimento de ectomicorrizas em "plantlets" de *E. urophylla*, de *E. grandis* e de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) em cultura axênica.

Em tubos-de-ensaio 18 x 360 mm colocaram-se 34 ml da mistura turfa-vermiculita. Em seguida adicionaram - se 17 ml da solução de SARRUGE (1975), acompanhada de NaCl, glucose, tiamina e extrato de malte nas concentrações de 0,025 g - 10,0 g - 100 µg e 3,0 g para cada litro de solução, respectivamente. Doravante, esse meio de cultivo passa ser chamado de meio orgânico.

Posteriormente, esse substrato nos tubos passou por esterilização em autoclave, a 120°C, por 50 minutos.

No dia seguinte à esterilização, cada tubo foi inoculado com cinco discos de meio de cultura, de 0,6 cm de diâmetro, contendo micélio, de cada isolado de *P. tinctorius*. Esses discos foram colocados juntos à superfície interna do tubo, distribuídos ao longo do substrato. No mesmo dia à inoculação dos tubos, com uma pinça de ponta longa transferiu - se as "plantlets". Em cada tubo foi colocada uma "plantlet", que constituiu uma repetição. Como testemunha foram utilizadas "plantlets", sob as mesmas condições, mas não inoculadas. A extensão de cada tubo correspondente àquela ocupada pelo subs

trato foi coberta com papel alumínio. Entre as inoculações das "plantlets" do híbrido de *E. urophylla* e de *E. grandis*, existiram diferenças de 8 e 15 dias, respectivamente, em razão das diferenças de tempo de enraizamento das gemas.

Após a transferência das "plantlets", os tubos foram colocados em suportes e incubados em sala de crescimento, sob luz complementar fornecida por 50% de lâmpadas gro-lux e 50% de lâmpadas fluorescentes luz do dia, com fotope-ríodo 12/12 horas, a 27°C.

Os tubos-de-ensaio que apresentaram sinais de crescimento de microorganismos contaminantes e onde as "plan-tlets" morreram foram descartados. Devido a esses problemas inoculou-se o dobro de "plantlets" necessários para os trata-mentos.

Aos 15, 30 e 45 dias após a inoculação, reali-zaram-se as avaliações.

Cada período de avaliação se constitui um en-saio experimental.

Para cada ensaio, quando da leitura, as "plan-tlets" foram retiradas dos tubos-de-ensaio e as raízes lava-das em água corrente para separação dos grânulos do substra-to.

Em seguida separaram-nas da parte aérea e as preservaram em FAA, durante 2-4 dias. A composição do FAA en-contra-se no Apêndice 4.

Posteriormente retiraram-se as raízes do FAA, cortaram-nas em segmentos de 1,0 a 2,0 cm. Os segmentos de raízes foram mergulhados, verticalmente em ágar-água (1,2%) fundente, em cubetas de 1,5 cm x 1,5 cm de altura e diâmetro. Após a solidificação, transferiram-se as cubetas para congelador de geladeira de uso doméstico. No dia seguinte, cada bloco de ágar-água-raízes foi retirado da cubeta, levado a um micrótomo manual, congelado com nitrogênio líquido e as raízes cortadas em secções de 20 μ m de espessura.

Cada tratamento composto de três "plantlets" formou um único bloco de raízes.

Os cortes de cada bloco de raízes foram transferidos para "becker" contendo água e corados com lactofenol. Após agitação para homogeneizar a suspensão de cortes, com um conta-gotas retiraram-se amostras, colocaram-nas em lâminas e observou-se ao microscópio ótico. A avaliação da formação de ectomicorrizas foi expressada em porcentagem de cortes apresentando manto típico e/ou rede-de-Hartig. Para cada tratamento observaram-se, no mínimo 150 cortes.

3.2. Desenvolvimento de ectomicorrizas em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* em cultura axênica, em meio orgânico.

O substrato, o meio de cultura, assim como o seu preparo se constituíram os mesmos do item 3.1..

Os isolados de *P. tinctorius* e o processo de inoculação, também foram aqueles adotados no item 3.1..

Após a inoculação do substrato transferiu-se para cada tubo-de-ensaio uma plântula *E. urophylla* ou *E. grandis*. Cada tubo-de-ensaio, com uma plântula se constituiu uma repetição. Como testemunha usaram-se plântulas sob as mesmas condições, mas não inoculadas.

Seguindo a inoculação, os tubos com as plântulas foram distribuídos em suportes e incubados sob as mesmas condições do item 3.1.

Todos os tubos apresentando qualquer sinal de contaminação por microorganismos saprófitas foram descartados. Em razão desse aspecto, para cada ensaio foram inoculados 20% de plântulas além da quantidade necessária para os tratamentos.

Passados 15, 30 e 45 dias da inoculação fizeram-se as avaliações. Cada período de avaliação se constituiu um ensaio experimental.

Na avaliação de cada ensaio, as plântulas foram retiradas dos tubos-de-ensaio e as raízes submetidas ao mesmo procedimento dispensado no item 3.1.

Cada bloco de ágar-água englobou raízes de quatro plântulas de um tratamento.

Como na item 3.1., a avaliação da formação de micorrizas em cada ensaio foi expressa em porcentagem de cor-

tes apresentando manto típico e/ou rede-de-Hartig. Para cada tratamento observaram-se, no mínimo 150 cortes.

3.3. Desenvolvimento de ectomicorrizas em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* em cultura axênica, em meio inorgânico.

Em tubos-de-ensaio 18 x 360mm colocaram-se 34 ml de turfa-vermiculita. Posteriormente adicionaram-se 17 ml da solução de SARRUGE (1975). Doravante esse meio de cultivo passa a ser chamado de meio inorgânico. Em seguida, os tubos -de-ensaio com o substrato passaram por esterilização em autoclave a 120°C, por 50 minutos.

No dia seguinte, transferiu-se uma plântula de *E. urophylla* ou *E. grandis* para cada tubo-de-ensaio. Envolveu-se com papel alumínio, a parte dos tubos, que continha o substrato.

Após, colocaram-nos em suportes e os incubaram sob as mesmas condições do item 3.1.. O período de incubação foi de 30 dias, quando as raízes das plântulas de *E. urophylla* e *E. grandis* atingiram cerca de 5 cm e 4 cm, respectivamente.

Em seguida, os tubos com as plântulas foram transferidos para câmara asséptica e inoculados com os isolados de *P. tinctorius* como segue. Discos de meio de cultura de 0,6 cm de diâmetro, contendo micélio foram transferidos para

placas-de-Petri contendo meio de cultura MNM. Essas placas - de-Petri foram incubadas a 27°C, durante três dias, para início de crescimento micelial. Após esse período transferiram-se três discos de micélio de cada isolado fúngico, para cada plântula de *Eucalyptus* spp. nos tubos de ensaio. Os discos de micélio foram colocados em contato direto com o sistema radicular das plântulas, à profundidade em torno de 2 cm. Cada plântula constitui-se numa repetição. Como testemunha utilizaram-se plântulas sob as mesmas condições, mas não inoculadas.

Após a inoculação, as plântulas voltaram às mesmas condições de incubação.

Durante todo o período de incubação, os tubos que apresentaram qualquer sinal de contaminação por microrganismos foram descartados. Em razão desse aspecto, para cada ensaio foram inoculados 20% de plântulas além do necessário para cada tratamento.

Aos 30, 50 e 70 dias, após a inoculação realizaram-se as avaliações. Cada período de avaliação se constituiu um ensaio experimental.

Na avaliação de cada ensaio, as plântulas foram retiradas dos tubos-de-ensaio e o sistema radicular separado dos grânulos do substrato, em água corrente. A formação de micorrizas foi estimada através da observação visual, ex-

pressando-se a porcentagem da superfície do sistema radicular apresentando colonização por *P. tinctorius*.

Amostras de raízes, também foram examinadas ao estereomicroscópio para confirmação dos resultados verificados na leitura visual.

Após cada leitura, amostras de raízes micorrízicas foram cortadas ao micrótomo, obedecendo ao procedimento adotado no item 3.1. e as micorrizas observadas ao microscópio ótico.

3.4. Desenvolvimento de ectomicorrizas em "plantlets" de *E. urophylla*, de *E. grandis* e um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) inoculadas através da técnica do papel sanduiche.

Para induzir o desenvolvimento de ectomicorrizas em cultura axênica adotou-se a técnica do papel sanduiche desenvolvida por CHILVERS et alii (1986).

Adicionaram-se em torno de 18 ml de meio de cultura MNM, 1,2% agarizado, em cada placa-de-Petri 15 x 90 mm. Após a solidificação colocou-se sobre o meio de cultura um semi-disco de celulose prensada, de 6,0 cm de raio, umidecido com o mesmo meio de cultura e esterilizado em autoclave. Sobre os semi-discos de celulose prensada foram colocados cinco discos de meio de cultura de 0,6 cm de diâmetro, contendo micélio de *P. tinctorius*, originados dos bordos de cultura em

MNM, com 20 dias de idade. Os discos foram distribuídos, equidistantemente. Para cada isolado de *P. tinctorius* inocularam-se 15 placas-de-Petri.

Em seguida, as placas-de-Petri foram incubadas em estufa a 27°C, durante 15-18 dias. Esse tempo foi suficiente para o fungo crescer sobre toda a superfície dos semi-discos de celulose. Após isso, os semi-discos colonizados foram usados para inocular as "plantlets".

Sincronizadamente à produção do inóculo prepararam-se os hospedeiros para a inoculação. Adicionaram-se 18 ml da solução de SARRUGE (1975), 1,2% agarizada, em placas-de-Petri 15 x 90 mm. Após a solidificação colocou-se sobre o meio de cultivo, um disco de papel de filtro esterilizado em autoclave. Sobre o disco de papel de filtro transferiu-se uma "plantlet" de *Eucalyptus* de cada espécie. Em seguida cobriu-se a "plantlet" com outro disco de papel de filtro de mesmo diâmetro, mas com uma falha radial em forma de cunha, de modo que esta falha permitisse a cobertura apenas do sistema radicular.

Em seguida, as placas-de-Petri com as "plantlets" foram empilhadas em caixa, em ângulo de 60° e as caixas colocadas sob luz complementar, sob as mesmas condições do item 3.1., durante 12 dias.

Após esse período, em câmara asséptica retirou-se o disco de papel de filtro com a falha radial, que co

bria as "plantlets" e o substituiu pelo semi-disco de celulose colonizado por *P. tinctorius*, de modo que as hifas ficassem em contato direto com as raízes.

Posteriormente, as placas-de-Petri com as "plantlets" inoculadas foram novamente empilhadas como anteriormente e incubadas sob as mesmas condições anteriores.

Cada "plantlet" em cada placa-de-Petri se constituiu uma repetição para cada tratamento. Como testemunha utilizaram-se "plantlets" sob as mesmas condições, mas não inoculadas.

Em qualquer fase do ensaio, toda placa-de- Petri que apresentou sinais de contaminação por microrganismos foi descartada. Em razão desse aspecto preparou-se o dobro de inóculo e hospedeiro além do necessário para os tratamentos.

Passados 12 e 24 dias à inoculação com os isolados de *P. tinctorius*, fizeram-se as avaliações. Cada período de avaliação constituiu-se num ensaio experimental.

Na avaliação de cada ensaio, as "plantlets" foram retiradas das placas-de-Petri e o sistema radicular submetido ao mesmo procedimento adotado no item 3.1. A quantificação das micorrizas formadas foi feita, também como no item 3.1..

3.5. Desenvolvimento de ectomicorrizas em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* inoculadas através da técnica do papel sanduiche.

O preparo do inóculo a partir dos isolados de *P. tinctorius* foi como no item 3.4. Analogamente aconteceu para o preparo dos hospedeiros. No lugar de "plantlets" usaram-se plântulas recém germinadas.

As placas-de-Petri, após a transferência das plântulas foram incubadas como no item 3.4.. O período de incubação foi de 8 dias.

Após esse período, em câmara asséptica procedeu-se à inoculação das plântulas com os isolados de *P. tinctorius*, semelhantemente à inoculação das "plantlets" no item 3.4..

Seguindo a inoculação, as plântulas foram retornadas às mesmas condições de incubação anteriores.

Como testemunha empregaram-se plântulas sob as mesmas condições, mas não inoculadas.

Como no item 3.4., qualquer placa-de-Petri com contaminação microbiana era descartada. Em razão desse aspecto preparou-se o dobro de inóculo e hospedeiros além do necessário para os tratamentos.

Após 12 e 24 dias à inoculação procederam-se às

avaliações. Cada período de avaliação constitui-se um ensaio experimental.

Na avaliação de cada ensaio, as "plantlets" foram retiradas das placas-de-Petri e o sistema radicular submetido ao procedimento adotado no item 3.1.. A quantificação das micorrizas formadas foi realizada, adotando-se também o mesmo procedimento do item 3.1..

3.6. Perpetuação de ectomicorrizas em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* inoculadas pela técnica do papel sanduiche e transplantadas para solo esterilizado.

As ectomicorrizas, inicialmente foram formadas em cultura axênica, através da técnica do papel sanduiche, como no item 3.5., utilizando as mesmas espécies hospedeiras, os mesmos isolados de *P. tinctorius* e a mesma metodologia.

Trinta dias após a inoculação retiraram-se as plântulas das placas-de-Petri e as transplantaram. Como as raízes estavam aderidas ao disco de papel de filtro, ambos foram transferidos para vasos de alumínio de 1,5 l de capacidade, contendo solo previamente esterilizado. Cada vaso recebeu duas plântulas dispostas 15 cm uma da outra. O vaso com duas plântulas constituiu uma repetição. Como testemunha utilizaram-se plântulas, sob as mesmas condições, não inoculadas.

Em seguida, os vasos foram colocados em ambiente natural, sombreado, durante uma semana. Posteriormente, de forma progressiva, sob ambiente natural, aumentou-se a exposição das plântulas ao sol, até torná-la definitiva. Esse período de adaptação ambiental durou uma semana.

Desde o transplante, até as leituras, as plântulas foram irrigadas, quando necessário, com água de torneira.

Após 80 e 120 dias ao transplante realizaram-se as avaliações. Cada período de avaliação se constituiu um ensaio experimental.

Na avaliação de cada ensaio experimental, as plântulas foram retiradas dos vasos e o sistema radicular separado do solo. A quantidade de micorrizas formadas foi estimada através da observação visual e expressada em porcentagem da superfície do sistema radicular apresentando colonização por *P. tinctorius*.

A porcentagem de ectomicorrizas formadas em cada repetição foi expressa pela média da porcentagem de micorrizas formadas nas duas plântulas em cada vaso e o resultado de cada tratamento expresso pela média das quatro repetições. Amostras das raízes micorrízicas foram examinadas ao estereomicroscópio para confirmação dos resultados.

3.7. Perpetuação de ectomicorrizas em "plantlets" de *E. urophylla*, de *E. grandis* e de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) inoculadas em cultura axênica e transplantadas para solo esterilizado.

A metodologia empregada para produção das "plantlets" micorrízicas, em cultura axênica foi aquela desenvolvida no item 3.1., com os mesmos isolados fúngicos, substrato, meio de cultivo e "plantlets".

Passados 45 e 60 dias à inoculação, as "plantlets" foram retiradas dos tubos-de-ensaio, de modo que o sistema radicular, juntamente com o substrato colonizado pelas hifas de *P. tinctorius* formassem um único bloco cilíndrico.

Em seguida, as "plantlets" foram transplantadas para vasos de argila de 1,5 l de capacidade, contendo solo previamente esterilizado. As "plantlets" transplantadas após 60 dias à inoculação passaram por períodos crescentes de exposição ao sol, nos últimos cinco dias de cultura axênica. Em cada vaso foram colocadas duas "plantlets", que constituíram uma repetição. Como testemunha utilizaram-se "plantlets" sob as mesmas condições, mas não inoculadas.

Cada período de incubação das "plantlets", após a inoculação, se constituiu um ensaio experimental. Para cada ensaio experimental transplantaram-se o dobro de "plantlets" além do necessário para cada tratamento.

Após o transplante, os vasos foram colocados em ambiente natural, sombreado, durante 12 dias. Posteriormente, também sob ambiente natural aumentou-se, progressivamente, a exposição das "plantlets" ao sol, até torná-la definitiva. Esse período de adaptação ambiental persistiu por 12 dias.

Desde o transplante até a avaliação, as "plantlets" foram irrigadas, quando necessário com água de torneira.

A avaliação de cada ensaio foi realizada 90 dias após a transferência para vasos.

As "plantlets" foram retiradas dos vasos e o sistema radicular separado do solo. A quantificação micorrízica foi estimada adotando-se o mesmo procedimento do item 3.6..

Para cada tratamento observaram-se quatro "plantlets", separadas ao acaso, independente de estar uma ou duas por vaso. Isto porque em vários tratamentos morreram várias "plantlets".

Em cada ensaio, após a avaliação, nos tratamentos que apresentaram perpetuação de micorrizas, amostras de raízes foram retiradas e submetidas ao mesmo procedimento do item 3.1., para observar ao microscópio ótico, as micorrizas formadas.

3.8. Perpetuação de ectomicorrizas em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* inoculadas em cultura axênica , em meio orgânico e transplantadas para solo esterilizado.

A metodologia empregada para produção de plântulas micorrízicas em cultura axênica foi aquela desenvolvida no item 3.2., com os mesmos isolados fúngicos, substratos, meio de cultivo e espécies hospedeiras.

Passados 60 dias à inoculação, as plântulas foram retiradas dos tubos-de-ensaio, de modo que o sistema radicular, juntamente com o substrato colonizado pelas hifas de *P. tinctorius* formaram um bloco cilíndrico.

Em seguida, as plântulas foram transplantadas para vasos de alumínio de 1,5 l de capacidade contendo solo previamente esterilizado. Cada vaso recebeu duas plântulas , que constituíram uma repetição. Como testemunha utilizaram-se plântulas sob as mesmas condições, mas não inoculadas.

Posterior ao transplante, os vasos com as plântulas foram colocados em ambiente natural, sombreado, durante cinco dias. Depois, também sob ambiente natural aumentou-se, progressivamente a exposição das plântulas ao sol, até torná-la definitiva. Esse período de adaptação ambiental persistiu por uma semana.

Desde o transplante até as leituras, as plântu-

las foram irrigadas, quando necessário, com água de torneira.

As avaliações foram executadas aos 60 e 90 dias após o transplante. Cada período de avaliação se constituiu um ensaio experimental.

Na avaliação de cada ensaio, as plântulas foram retiradas dos vasos e submetidas ao mesmo procedimento desenvolvido no item 3.6., para se estimar a colonização micorrízica. Em cada ensaio, após a avaliação, uma amostra de raízes micorrízicas de cada tratamento foi submetida ao mesmo procedimento executado no item 3.1., com a finalidade de observar, ao microscópio ótico, as micorrizas formadas.

3.9. Perpetuação de ectomicorrizas em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* inoculadas em cultura axênica, em meio inorgânico e transplantadas para solo esterilizado.

A metodologia empregada para produção das plântulas micorrízicas, em cultura axênica foi aquela desenvolvida no item 3.3., com os mesmos isolados fúngicos, substrato, meio de cultivo e espécies hospedeiras.

Após 60 dias à inoculação com *P. tinctorius*, as plântulas foram retiradas dos tubos-de-ensaio, de modo que o sistema radicular ficou acompanhado do substrato colonizado pelas hifas fúngicas. Em seguida, as plântulas foram transplantadas para vasos de alumínio, de 1,5 l de capacidade, con

tendo solo esterilizado. Cada vaso recebeu duas plântulas, que constituíram uma repetição. Como testemunha utilizaram-se plântulas submetidas à mesma metodologia, mas não inoculadas.

Posteriormente, os vasos com as plântulas foram colocados em ambiente natural, sombreado, durante cinco dias. Depois, também sob ambiente natural aumentou-se progressivamente a exposição das plântulas ao sol, até torná-la definitiva. Esse período de adaptação ambiental durou uma semana.

Desde o transplante até as leituras, as plântulas foram irrigadas, quando necessário, com água de torneira.

As avaliações foram executadas aos 60 e 90 dias após o transplante. Cada período de avaliação se constituiu um ensaio experimental.

Na avaliação de cada ensaio, as plântulas foram retiradas dos vasos e submetidas ao mesmo procedimento no item 3.6., para se estimar a colonização micorrízica. Em cada ensaio, após a avaliação, uma amostra de raízes micorrízicas, em cada tratamento foi submetida ao mesmo procedimento do item 3.1., com a finalidade de examinar ao microscópio ótico, as micorrizas formadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento de ectomicorrizas em "plantlets" de *E. urophylla*, de *E. grandis* e de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) em cultura axênica.

Após o tratamento para tubo-de-ensaio, na fase inicial de incubação aconteceu morte de cerca de 40%, 15% e 8% das "plantlets" de *E. grandis*, *E. urophylla* e do híbrido, respectivamente. Esse fator ocorreu devido às diferenças na qualidade do sistema radicular existente entre as "plantlets" das três espécies e também devido à contaminação microbiana. Quanto à contaminação microbiana, cerca de 5% dos tubos foram descartados devido a esse problema. Os contaminantes foram basicamente fungos do gênero *Penicillium*, *Monilia* e *Aspergillus*. Embora considerados como saprófitas, eles tornaram-se virulentos e muito agressivos, em razão da condição muito tenra das "plantlets" e do excesso de nutrientes disponíveis.

As "plantlets" nos tubos-de-ensaio morriam no máximo até cinco dias após a contaminação, apresentando sintomas de tombamento, resultantes de podridão úmida das raízes e parte do caule.

As "plantlets", quando da inoculação apresentaram o sistema radicular muito diferente de acordo com a espécie. As "plantlets" do híbrido possuíam o sistema radicular bem formado, com várias raízes longas por planta, contendo várias ramificações secundárias, vigorosas, com grande quantidade de pelos absorventes. Essas raízes apresentaram crescimento rápido, na época em que foram transplantadas para os tubos-de-ensaio. Contrariamente, se observou no sistema radicular de *E. grandis*. Geralmente formou-se uma raiz por planta, raramente duas, dificilmente apresentaram ramificações, tendiam ao formato cilíndrico, finas, quebradiças, com poucos pelos absorventes e comprimento muito menor do que as raízes do híbrido. Após a transferência para os tubos-de-ensaio, essas raízes apresentaram crescimento muito lento. As raízes de *E. urophylla* mostraram um comportamento intermediário, se aproximando do híbrido.

O comportamento do sistema radicular das três espécies hospedeiras, juntamente com a velocidade de crescimento dos isolados de *P. tinctorius* induziram um desenvolvimento particular na colonização micorrízica, na primeira leitura, como mostram os resultados do primeiro ensaio, na Tabela 1.

Tabela 1. Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos), em "plantlets" de *E. urophylla*, de *E. grandis* e de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) por *Pisolithus tinctorius*, em meio de cultivo com carbono orgânico disponível, 15 dias após a inoculação.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s			Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	híbrido	
E4	13,5	15,5	26,9	18,6
E6	2,5	6,2	7,8	5,5
RVE82-1	2,1	9,1	37,7	16,3
RVE851	11,2	5,0	29,3	15,2
E7	0,0	1,8	1,3	1,0
RVE854	14,2	3,9	15,4	11,2
Média	7,25	6,9	19,7	

Através dos resultados da primeira leitura torna difícil tirar conclusões a respeito da susceptibilidade das espécies hospedeiras aos isolados de *P. tinctorius*. O híbrido apresentou a maior porcentagem de colonização micorrízica, *E. grandis* a menor e *E. urophylla*, intermediária. Isso correspondeu à qualidade e velocidade de crescimento dos sistemas radiculares, os quais entraram em contato com hifas fúngicas mais rápido, mais lento e intermediário, respectivamente.

te (Tabela 1). Dentro de cada espécie hospedeira pode-se observar que os isolados, que formaram micorrizas em maiores quantidades foram geralmente, aqueles que possuíam maior taxa de crescimento, independente da agressividade. Isso porque eles entraram em contato mais rapidamente com as raízes dos hospedeiros. Como o isolado E7 possuía a menor taxa de crescimento, ele induziu a menor porcentagem de colonização micorrízica. Já os isolados RVE 82-1, E4, RVE 854 e RVE 851 formaram a maior porcentagem de colonização micorrízica, porque apresentaram a maior taxa de crescimento micelial em meio de cultura.

No segundo ensaio, com avaliação aos 30 dias após a inoculação, todos os isolados haviam colonizado todo o substrato. Desta forma foi possível verificar o comportamento dos isolados de *P. tinctorius* nas três espécies hospedeiras.

Tabela 2. Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em "plantlets" de *E. urophylla*, de *E. grandis* e de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) por *Pisolithus tinctorius*, em meio de cultivo com carbono orgânico disponível, 30 dias após a inoculação.

Isolados de	H o s p e d e i r o s			Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	Híbrido	
<i>P. tinctorius</i>				
E4	76,1	31,4	95,8	67,7
E6	74,1	18,6	93,4	62,0
RVE82-1	77,4	22,1	93,6	64,4
RVE851	89,1	13,9	91,9	64,9
E7	84,9	30,0	88,7	67,8
RVE854	75,0	5,6	93,2	57,9
Média	79,4	20,3	92,8	

Como as raízes do híbrido possuíam excelentes ramificações e taxa de crescimento, muitos ápices radiculares estavam aptos à colonização, quando do transplante e muitos outros foram formados após essa operação. Assim, com a colonização total do substrato, todos os ápices se tornaram micorrízicos. Esse aspecto é mostrado na Tabela 2, onde se pode observar a alta porcentagem de cortes de raízes micorrízicas. Na maioria dos tratamentos, acima de 90% dos cortes de raízes observados ao microscópio apresentavam-se micorrízicos.

Contrariamente pode ser observado para as raízes de *E. grandis*. Elas apresentaram baixa velocidade de crescimento e praticamente não possuíam ramificações quando da inoculação e após essa operação, ramificações nas raízes ocorreram somente em cerca de 20% das "plantlets". Com isso poucos ápices radiculares foram produzidos. Desta forma, grande parte da área radicular não estava susceptível à infecção e conseqüentemente ocorreu pouco aumento de micorrizas, após a colonização de todo o substrato (Tabela 2). Em todos os tratamentos em *E. grandis*, a maioria das secções de raízes estavam não micorrízicas e correspondia à porção mais velha de raiz, formada anteriormente ao contato com o fungo e já resistente à infecção.

Comportamento intermediário foi mostrado para *E. urophylla*, mas se aproximando mais dos resultados do híbrido. Naquela espécie hospedeira, o sistema radicular era de boa qualidade e crescimento, com vários ápices radiculares. Assim, quando todo o substrato foi colonizado, na segunda leitura, todos os ápices radiculares entraram em contato com os isolados do fungo simbiote e alta porcentagem de micorrizas se desenvolveu, com no mínimo 74% de cortes micorrízicos.

Se se compara o comportamento micorrízico dos seis isolados fúngicos em cada hospedeiro, é possível notar que existiu diferenças entre eles, destacadamente em *E. grandis* (Tabela 2). Nesse hospedeiro, os melhores isolados foram E4 e E7. Também o isolado RVE 82-1 apresentou razoável colo-

nização micorrízica. Contrariamente, o isolado RVE 854 induziu baixa colonização, mostrando pouca afinidade para *E. grandis*, com apenas 5,6% de cortes micorrízicos. Os demais isolados tiveram comportamento intermediário. Nos outros dois hospedeiros, híbrido ou *E. urophylla*, todos os seis isolados apresentaram porcentagens de colonização aproximadas, com pequena variação entre eles, que poderiam estar dentro do erro experimental.

Os resultados do segundo ensaio deixaram bem claro que o hospedeiro mais susceptível é o híbrido, seguido de perto por *E. urophylla* e bem mais distante está *E. grandis*, com 92,8%, 79,4% e 20,3% de cortes micorrízicos, respectivamente.

É difícil distinguir se essas diferenças de susceptibilidade foram devidas ao número de ápices radiculares, proporcionalmente formados pelos hospedeiros ou a resistência à infecção. Provavelmente os dois fatores estejam envolvidos, principalmente o último.

Os resultados de RVE 854 em *E. grandis* mostraram que apesar do maior potencial de inóculo resultante do maior vigor no crescimento micelial desse isolado, a sua colonização micorrízica foi muito inferior àquela dos demais isolados (Tabelas 2 e 3). Contrariamente, observou-se para o isolado E4, com maior porcentagem de colonização micorrízica nessa espécie hospedeira.

A proporção de colonização micorrízica se estabilizou entre 15 e 30 dias após a inoculação para o híbrido. Pelos resultados pode ser verificado que, após a avaliação do segundo ensaio, não mais se registrou aumento na porcentagem de cortes micorrízicos. Para o hospedeiro *E. urophylla* ocorreu pequeno aumento na porcentagem de micorrizas entre as avaliações do segundo e terceiro ensaios (Tabelas 2 e 3). Entretanto, entre 30 e 45 dias após a inoculação, esse aumento foi bem maior para *E. grandis*. Como até a avaliação do segundo ensaio, todo o substrato estava colonizado, o pequeno e grande aumentos verificado para *E. urophylla* e *E. grandis*, respectivamente indicam que, após o contato hifas-raízes até a formação de micorriza característica foi mais demorado em *E. grandis*. Esses aspectos provavelmente foram consequência da diferença de susceptibilidade à infecção micorrízica, que existiu entre os hospedeiros. Embora os sistemas radiculares dos hospedeiros estivessem em contato com os isolados do fungo simbiote, a formação de micorrizas foi mais rápida no híbrido, um pouco menos rápida em *E. urophylla* e mais lenta em *E. grandis*.

No terceiro ensaio, os resultados mostraram que, o comportamento dos isolados nos hospedeiros confirmou aquele observado no segundo ensaio (Tabela 3).

Tabela 3. Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em "plantlets" de *E. urophylla*, de *E. grandis* e de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) por *Pisolithus tinctorius*, em meio de cultivo com carbono orgânico disponível, 45 dias após a inoculação.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s			Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	Híbrido	
E4	90,7	38,1	95,5	74,7
E6	66,1	41,4	82,6	63,3
RVE82-1	84,8	37,6	88,6	70,3
RVE851	85,7	56,2	91,8	77,9
E7	86,7	55,3	78,3	73,4
RVE854	86,2	28,0	90,5	68,2
Média	83,4	42,7	87,8	

As porcentagens de cortes micorrízicos foram muito próximas para as "plantlets" do híbrido e de *E. urophylla*, para os seis isolados de *P. tinctorius*. É provável que as "plantlets" de cada hospedeiro não sejam susceptíveis igualmente a todos os isolados de *P. tinctorius*. Esse mascaramento da agressividade dos isolados deve ter sido devido ao alto potencial de inóculo, resultado da elevada concentração de hifas desenvolvidas no substrato rico em energia. DUDDRIDGE (1986a)

observou aumento na agressividade no inóculo de *Suillus grevil*lei em várias espécies hospedeiras de diferentes famílias botânicas, em consequência da inclusão de glucose no meio de síntese. VAN DER PLANK (1963) afirma que alto potencial de inóculo mascara a diferença de susceptibilidade que não seja muito grande existente entre hospedeiros.

No entanto, em *E. grandis* foi possível destacar com nitidez, o comportamento para colonização micorrízica de alguns isolados. Isso, provavelmente seja devido a maior resistência de *E. grandis* a infecção, em relação aos outros dois hospedeiros.

Alguns trabalhos têm relatado a colonização ectomicorrízica em "plantlets" de *Eucalyptus* spp. com *P. tinctorius* (AUER et alii, 1985; MALAJCZUK & HARTNEY, 1986, POISSONNIER, 1986), ou por outro fungo ectomicorrízico (REYNOIRD & STRULLU, 1986) e em clones de outras espécies com outros fungos (FORTIN & PICHÉ, 1980; PARK, 1971). No entanto nenhum abordou aspectos fisiológicos ou estruturais da associação simbiótica, apenas se restringiram a mostrar a presença ou ausência da colonização.

Os resultados mostraram que, o ordenamento dos isolados fúngicos no segundo ensaio diferiu daquele observado no terceiro ensaio, quanto à colonização micorrízica. A provável causa desse fato seja a grande desuniformidade na qualidade do sistema radicular, que existiu entre "plantlets"

de uma mesma espécie. Um tratamento que tivesse uma ou duas "plantlets" com bom sistema radicular desloca a média para cima ou vice-versa. Mas mesmo assim foi possível notar a tendência de comportamento dos hospedeiros e isolados fúngicos.

Diferenças qualitativas entre ectomicorrizas formadas em *E. urophylla* e no híbrido não foi possível de ser distinguidas ao microscópio ótico. No entanto, em ectomicorrizas de *E. grandis* foi possível separar com nitidez diferenças, em relação aos outros dois hospedeiros. Ectomicorrizas formadas por E4 e RVE 82-1 se caracterizaram por apresentar manto bem espesso, com hifas bem adensadas, alta frequência e maior espessamento da rede-de-Hartig. Enquanto os isolados RVE 854 e RVE 851 produziram manto menos espesso, com hifas menos adensadas, menor frequência e menor espessamento da rede-de-Hartig. Essas características foram mais evidentes nas combinações espécie hospedeira-isolado fúngico menos compatíveis. PALM & STEWART (1984) observaram que a formação de rede-de-Hartig menos espessa por *Suillus* spp. em *Pinus* sp. ocorreu nas combinações de menor afinidade. DUDDRIDGE (1986a) mostrou que a redução no desenvolvimento ou desenvolvimento irregular da rede-de-Hartig são características em interações entre simbiossiontes pouco compatíveis.

A presença de rede-de-Hartig nos cortes micorrízicos somente se fez notar nas células epidérmicas, tangen

ciando as células da hipoderme. Alguns trabalhos mostraram que, em *Eucalyptus* sp., a rede-de-Hartig se restringiu às células corticais externas. GRENVILLE et alii (1986) e MASSICOTE et alii (1987) relataram que vários isolados de *P. tinctorius* formaram micorrizas em plântulas de *E. pilularis*, com rede-de-Hartig penetrando somente nas células epidérmicas, não indo além de tangenciar a parede da hipoderme. Resultado semelhante foi encontrado por NYLUND & UNESTAM (1982) estudando ectomicorrizas formadas por *Hidnangium carmeum*, *Hebelena crustuliniforme* e *Amanita muscaria* em *E. diversicolor*, *E. camaldulensis*, *E. marginata* e *E. microcorys*. Entretanto ASHTON, (1976) verificou que, em ectomicorrizas formadas por *Mesophellia arenaria* em *E. regnans*, a penetração da rede-de-Hartig pode ser profunda e atingir camadas celulares mais internas do cortex.

Os cortes observados ao microscópio mostraram que, as raízes micorrízicas possuíam maior diâmetro, em relação às raízes das "plantlets" não inoculadas. HARLEY & SMIDTH (1983f) afirmaram que essa característica ocorre normalmente em micorrizas de *Eucalyptus* spp. e se deve principalmente ao aumento no diâmetro radial das camadas de células externas das raízes. GRENVILLE et alii (1986) comprovaram que, células epidérmicas de *E. pilulares* foram radialmente alongadas, quando colonizadas por *P. tinctorius*. CHILVERS & PRYOR (1985) constataram que o diâmetro das raízes micorrízicas de *Eucalyptus* spp. foi cerca de dobro do diâmetro das raízes não micorrízicas. GODBOUT & FORTIN (1985) relataram que a elonga-

ção radial das células epidérmicas parece ocorrer somente, quando a rede-de-Hartig está confinada à camada epidérmica . Segundo os autores, quando as hifas penetram o córtex, nenhuma elongação radial das células epidérmicas se observou em micorrizas de *Populus* sp. formadas por *P. tinctorius*.

Além disso foi observado que, as células epidérmicas das micorrizas apresentaram orientação oblíqua. (Figura 3). HARLEY & SMITH (1982) afirmaram que, a orientação oblíqua está relacionada com a pressão envolvida na maior elongação das células da medula, do que sobre àquelas do córtex e da epiderme e a consequente pressão no manto fúngico . CHILVERS & PRYOR (1965) ressaltaram que, a elongação das células epidérmicas, combinada com a formação da rede-de-Hartig tornaram-se benéficas para a simbiose, uma vez que aumentaram a área de contato, ao longo da raiz, entre planta e hifas fúngicas, por um fator de 5 a 10 vezes, em relação a micorrizas somente superficiais.

O método de inoculação utilizado nos três ensaios, para estudos em cultura axênica mostrou mais vantajoso, do que aquele usado por MALAJCZUK & HARTNEY (1986), para inoculação de "plantlets" de *Eucalyptus* sp.. Os autores constataram que, após duas semanas à inoculação, as hifas de *P. tinctorius* mataram as "plantlets", por abafamento.

Figura 1. Ectomicorrizas formadas em "plantlet" de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) em meio orgânico, 30 dias após a inoculação com o isolado E4 de *Pisolithus tinctorius*.

Figura 2. Secção transversal de micorriza em "plantlet" de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*), 15 dias após a inoculação com o isolado E4 de *Pisolithus tinctorius*, em meio orgânico (aumento 90 x).

4.2. Desenvolvimento de ectomicorrizas em plântulas de *E. urophylla* e *E. grandis* em cultura axênica, em meio orgânico.

Alguns dos resultados dos ensaios desse item apresentaram a mesma tendência verificada nos resultados do item anterior.

Novamente se nota que os isolados RVE 854, RVE 851 e RVE 821 foram aqueles que apresentaram maiores porcentagens de colonização micorrízica. (Tabela 4). Isso acontece, exatamente devido a maior velocidade de crescimento desses isolados, que os coloca mais rapidamente em contato com as raízes. Por razões contrárias, o isolado E7 induziu a menor colonização micorrízica.

A porcentagem de cortes micorrízicos no primeiro ensaio, em plântulas de *E. urophylla* e *E. grandis* foi muito superior ao observado em "plantlets" das mesmas espécies. Embora sejam materiais genéticos diferentes, esse fator, provavelmente teve menor influência sobre o diferencial dos resultados, pois ele foi mascarado pelo alto potencial de inóculo. A principal e provável razão para a referida diferença micorrízica, se deveu basicamente às diferenças na qualidade e velocidade de desenvolvimento radicular, que existiram entre "plantlets" e plântulas. Como as plântulas eram dotadas de sistema radicular com maior número de ápices e muito maior taxa de crescimento ocorreu contato com as hifas fúngicas mais precocemente.

Tabela 4. Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* por *Pisolithus tinctorius*, em meio de cultivo com carbono orgânico disponível, 15 dias após a inoculação.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s		Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	
RVE854	79,0	58,0	68,8
RVE851	63,5	36,9	50,2
RVE82-1	61,8	37,7	49,9
E6	59,2	44,2	51,7
E4	40,9	33,9	37,4
E7	15,4	3,1	9,3
Média	53,3	35,7	

Se se compara as porcentagens de cortes micorrízicos entre as duas espécies de plântulas no primeiro ensaio, os resultados indicaram número muito superior para *E. urophylla* (Tabela 4). Provavelmente duas causas explicariam esse fato. A primeira é de natureza genotípica. *Eucalyptus grandis* seria menos susceptível à infecção e acarretaria como consequência, um maior período de tempo para a formação de micorriza típica, a partir do momento em que ocorre a infecção. Dessa forma, na leitura aos 15 dias após a inoculação, gran-

de parte do sistema radicular em contato com as hifas fúngicas, ainda não teria sido transformada em ectomicorrizas características. A segunda causa, igualmente importante, é o vigor inicial do sistema radicular das plântulas de *E. urophylla*. Como consequência, raízes de *E. grandis* apresentaram menor crescimento, que levou à demanda de maior período de tempo para entrar em contato com hifas e também à formação de menor número de ápices. Com o decorrer do tempo, o vigor do sistema radicular das duas espécies se aproximou.

No segundo ensaio, com avaliação aos 30 dias após a inoculação, todo o substrato havia sido colonizado por todos os isolados de *P. tinctorius*. Os resultados revelaram a alta porcentagem de micorrizas formadas com todos os isolados nas duas espécies hospedeiras, com no mínimo 90% de cortes micorrízicos mostrando que houve aumento na porcentagem de cortes micorrízicos em relação a leitura aos 15 dias (Tabela 5). Isso implica que, a grande maioria dos ápices radiculares teriam se transformados em micorriza. A exceção se faz notar para o isolado E7 em *E. grandis*. Esse resultado, provavelmente seja devido à baixa velocidade de crescimento do isolado fúngico E7 e ao maior período de tempo para que ocorra formação de micorriza típica, após a infecção em *E. grandis*. Desta forma, quando se fez a avaliação do segundo ensaio, muitos ápices radiculares, provavelmente infectados, ainda não tinham sido transformados em ectomicorrizas típicas.

Nos resultados do demais tratamentos, nota-se uma aproximação do número de cortes micorrízicos, com pequenas variações, que podiam ter sido, perfeitamente de origem do caso (Tabela 5). Isso leva mais uma vez a mostrar que, o alto potencial de inóculo, resultante do vigoroso crescimento de *P. tinctorius* no meio orgânico mascarou a diferença de susceptibilidade existente entre as duas espécies hospedeiras.

Tabela 5. Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* por *Pisolithus tinctorius*, em meio de cultivo com carbono orgânico disponível, 30 dias após a inoculação.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s		Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	
RVE854	94,4	92,3	93,3
RVE851	93,8	97,2	95,5
RVE82-1	93,7	91,2	92,4
E6	93,1	95,1	94,1
E4	91,1	93,8	92,4
E7	92,4	85,3	90,4
Média	93,0	92,9	

A proporção máxima de aumento da colonização de ápices radiculares ocorreu até a avaliação do segundo ensaio, 30 dias após a inoculação. Isso ficou evidenciado pela repetição dos resultados do segundo ensaio, na avaliação do terceiro ensaio (Tabela 6). A exceção se fez notar para o isolado E7, em *E. grandis*, por razões já anteriormente expli cadas.

Vale ressaltar, que embora todos os ápices ra diculares estivessem infectados, quando da avaliação do ter ceiro ensaio, os cortes observados ao microscópio ótico não foram 100% micorrízicos. Isso pode ser devido a dois fatores a extensão do sistema radicular resistente à infecção, forma da até ocorrer o contato fungo-raiz e aos ápices radiculares que embora infectados, ainda não apresentavam ectomicorrizas típicas.

Tabela 6. Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* por *Pisolithus tinctorius*, em meio de cultivo com carbono disponível, 45 dias após a inoculação.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s		Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	
RVE845	92,5	92,9	92,7
RVE851	95,1	93,0	94,0
RVE82-1	95,7	89,6	92,6
E6	96,8	94,7	95,7
E4	94,7	94,4	94,5
E7	95,5	91,6	93,5
Média	95,0	92,7	

O outro fator a considerar é que, nas avaliações, a variável dependente usada foi a porcentagem de cortes micorrízicos apresentando manto característico. Segundo HARLEY & SMITH (1983), a formação de manto não implica necessariamente que ocorrerá a formação de rede-de-Hartig, uma vez que o manto pode ser formado e se expandir para sítios de raízes resistentes à penetração de hifas.

Muitos trabalhos mostraram o sucesso no desenvolvimento de ectomicorrizas em plântulas de coníferas forma

das por *P. tinctorius*, sob condições axênicas (FINLAY & READ, 1986; FORTIN et alii, 1980; HUNG & CHIEN, 1979; MARX, 1969; SUGGS & GRAND, 1972). No entanto, para plântulas de *Eucalyptus* spp. poucos estudos foram publicados. O desenvolvimento ectomicorrízico formado por *P. tinctorius*, em cultura axênica foi relatado por CHILVERS & GUST (1982a), em *E. st. johnii*; por MALAJCZUC et alii (1982), em *E. marginata*; por MASSICOTTE et alii (1987) em *E. pilularis*, por VIEIRA (1984), em *E. grandis*.

Sob o ponto de vista qualitativo, secções micorrízicas observadas ao microscópio ótico mostraram nenhuma diferença entre aquelas desenvolvidas em "plantlets" e em plântulas. Todas as características observadas nos cortes micorrízicos de "plantlets", tais como espessura e densidade de hifas do manto, de acordo com a combinação isolado fúngico-espécie hospedeira, mudanças nas células epidérmicas e na rede-de-Hartig, se repetiram nos ensaios com plântulas.

Quanto à espessura de raízes micorrízicas, CHILVERS & PRYOR (1965) citaram que, raízes de plântulas de eucalipto podem aumentar o raio de 55-80 μm , quando estão em simbiose ectomicorrízica. DUDDRIDGE (1986b) afirmou que, em ectomicorrizas de *E. grandis*, a redução da frequência da rede-de-Hartig foram características em interações entre simbiosiontes com menor compatibilidade.

Outro caráter bem marcante verificado nas micorrizas formadas por *P. tinctorius* nas espécies de *Eucalyptus*

testadas foi a alta resistência à tração, comparado com as raízes não micorrízicas da testemunha, em razão da grande es pessara do manto.

Tanto os ápices de raízes de primeira ordem, como os ápices de raízes de ordens superiores foram igualmente colonizados por *P. tinctorius*.

4.3. Desenvolvimento de ectomicorrizas em plântulas de *E. urophylla* e *E. grandis* em cultura axênica, em meio inorgânico.

Os resultados dos três ensaios mostraram diferenças muito significativas entre os isolados de *P. tinctorius* na colonização micorrízica dos hospedeiros (Tabelas 7, 8 e 9).

No primeiro ensaio, as médias da colonização ec tomicorriza nos dois hospedeiros indicaram que, os isolados E4 e RVE 82-1 foram os mais agressivos. Eles induziram as maiores colonizações, com 43,2% e 28,8% de área radicular coloni zada, respectivamente. Contrariamente pode ser observado para os isolados RVE 854 e RVE 851, que levaram as menores taxas de infecção, com 20,0% e 21,6%, respectivamente. Os demais isolados tiveram comportamento intermediário (Tabela 7).

Se se comparar a colonização micorrízica entre os isolados dentro de cada espécie hospedeira pode se detec-

tar grandes diferenças estatísticas (Tabela 7). Em *E. urophylla*, o isolado E4 mostrou a mais alta afinidade (62,5%) em bora sem diferença significativa para os isolados RVE 82-1 e RVE 851. Os demais isolados não diferiram, estatisticamente entre si. Entretanto, em *E. grandis*, provavelmente devido a sua maior resistência à infecção, a ordem do comportamento dos isolados foi diferente. A mais alta colonização micorrízica ocorreu para os isolados E4 e RVE 82-1, com 23,8% e 20,0% de área radicular colonizada respectivamente; a mais baixa foi verificada para os isolados RVE 854 e RVE 851 com 7,5% e 4,3% de superfície radicular colonizada, respectivamente e os demais isolados se constituindo num bloco intermediário.

Tabela 7. Formação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada)* em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* por *Pisolithus tinctorius*, em meio de cultivo sem carbono orgânico disponível, 30 dias após a inoculação.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s		Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	
E4	62,5 Aa	23,8 Ab	43,1 A
RVE82-1	37,5 ABa	20,0 ABb	28,8 AB
E7	35,0 Ba	12,5 ABCb	23,8 B
E6	26,3 Ba	15,0 ABCb	20,6 B
RVE854	32,5 Ba	7,5 BCb	20,0 B
RVE851	38,8 ABa	4,3 Cb	21,6 B
Média	38,8 a	13,9 b	

C.V. (%) 18,1

* Médias de hospedeiros dentro de isolados seguidas pelas mesmas letras minúsculas e médias de isolados dentro de hospedeiros seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem entre si (Tukey-5%).

Ainda na primeira avaliação, as porcentagens médias de área radicular para os isolados fúngicos, em cada espécie hospedeira, mostraram que *E. urophylla*, com 38,8% de

área radicular colonizada foi significativamente, mais susceptível do que *E. grandis*, que apresentou 13,9% de superfície radicular colonizada.

No segundo ensaio (Tabela 8), com avaliação aos 50 dias após a inoculação, os resultados demonstraram que, ocorreram algumas mudanças no comportamento dos isolados de *P. tinctorius*, se se comparar com os resultados do primeiro ensaio (Tabela 7), com avaliação aos 30 dias após a inoculação. As médias dos isolados fúngicos nos dois hospedeiros indicaram que, a porcentagem de área radicular ectomicorrízica aumentou para os isolados E4, RVE 82-1, E7 e E6, mas reduziu para os isolados do RVE 854 e RVE 851. Esses resultados revelaram que, as micorrizas formadas pelos quatro isolados se perpetuaram e ocorreu redução na proporção de raízes não micorrízicas. No entanto, as micorrizas formadas pelos dois isolados se estabilizaram ou se perpetuaram a uma taxa de bem baixa, de modo que a proporção de raízes não micorrízicas tinha aumentado.

Tabela 8. Formação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada)* em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* por *Pisolithus tinctorius*, em meio de cultivo sem carbono orgânico disponível, 50 dias após a inoculação.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s		Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	
E4	85,0	60,0	72,5 a
RVE82-1	50,0	27,5	38,8 b
E7	65,0	18,0	41,5 b
E6	70,0	27,5	48,7 ab
RVE854	21,3	16,3	18,9 c
RVE851	17,5	6,3	11,9 c
Média	51,5 a	25,9 b	
C.V. (%) 23,2			

* Médias de hospedeiros e médias de isolados seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si (Tukey-5%).

Para os dois hospedeiros, o isolado E4 apresentou a maior média de área radicular colonizada com 72,5%, embora não diferisse, estatisticamente de E6 (Tabela 8). Também apresentaram boas médias de colonização, os isolados RVE 82-1 e E7. Os isolados RVE 854 e RVE 851 foram os piores com médias de

18,3% e 11,9% de área radicular colonizada, respectivamente . A mesma condição é encontrada, quando se compara a colonização entre os isolados dentro de cada espécie hospedeira.

Nos primeiros 12 dias após a inoculação, as hifas dos isolados de *P. tinctorius* cresceram utilizando as reservas nutritivas presentes nos discos de meio de cultura, que acompanharam o inóculo. Por essa razão, a taxa de crescimento micelial, nesse intervalo de tempo foi próxima àquela verificada em meio de cultura. Como consequência, os isolados RVE 854 e RVE 851 colonizaram maior volume de substrato e apresentaram maior colonização micorrízica. No entanto, a partir de cerca de 15 dias após a inoculação começaram a ocorrer mudanças. A taxa de crescimento micelial desses dois isolados cai rapidamente e os demais isolados, embora sofresse redução em sua taxa, ainda continuaram com razoável crescimento, até em torno dos 20 dias após a inoculação. Essa característica evidencia a maior exigência nutricional dos isolados RVE 854 e RVE 851. Como consequência, aos 30 dias após inoculação, quando se fez a avaliação do primeiro ensaio, os isolados RVE 854 e RVE 851, ainda demonstraram razoável colonização micorrízica. No entanto, os demais isolados, devido ao maior período de crescimento utilizando reservas nutritivas do disco de meio de cultura e a sua maior afinidade para os hospedeiros apresentaram colonização micorrízica superior.

Esses fatores provavelmente foram a causa da ocorrência de interação verificada entre isolados de *P. tinc-*

torius e as espécies hospediras (Tabela 7).

A partir de cerca de 25 dias após a inoculação, os discos de meio de cultura veiculando o inóculo, praticamente tinham secado, não mais servindo de fonte nutricional. A partir dessa fase, os isolados de *P. tinctorius* teriam que sobreviver, obrigatoriamente, em simbiose. A partir desse momento, começou a ser possível detectar diferenças visuais na afinidade dos isolados fúngicos para plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis*.

No segundo e terceiro ensaios, após 20 dias à inoculação, até a avaliação era possível separar, com bastante nitidez, a olho nu, a afinidade dos isolados em cada espécie hospedeira. Nas raízes que cresciam próximas à superfície interna dos tubos-de-ensaio foi observado o desenvolvimento de feixes de hifas fúngicas paralelos e juntos a elas. Esse fenômeno ocorreu tanto em raízes novas, quanto em raízes mais velhas, onde os ápices radiculares foram transformados em micorrizas. Isso mostrou que as hifas se nutriram e eram estimuladas por exsudatos radiculares. Foi bastante frequente, na avaliação desses ensaios, a presença de raízes longas, com todos os ápices transformados em micorrizas, nas combinações com maior compatibilidade.

A nitidez desses aspectos foi muito maior em *E. urophylla* do que em *E. grandis*. Ela aumentou de acordo com a afinidade do isolado para o hospedeiro e à medida que avan-

çava o período de incubação, sendo observado somente para os isolados E4, RVE 82-1. E6 e E7. Quanto maior a afinidade do isolado, maior foi a presença de feixes hifais acompanhando as raízes e maior foi a porcentagem de desenvolvimento ectomicorrízico.

Analisando os resultados das tabelas oito e no ve nota-se claramente, que o isolado que apresentou maior afinidade para com os hospedeiros, com maior porcentagem de área radicular colonizada foi E4. Em seguida vieram os isolados RVE 82-1, E7 e E6. Os isolados RVE 854 e RVE 851 foram os piores, com baixa colonização micorrízica.

O estímulo de exsudados radiculares para atração e crescimento de hifas de fungos ectomicorrízicos foi constatado por vários pesquisadores. GRENVILLE et alii (1986) e MASSICOTE et alii (1987) verificaram que preferencialmente no sentido longitudinal, raízes jovens e raízes longas de *E. pilularis* produziram exsudados, que atraíam hifas de *P. tinctorius*. Resultados similares foram encontrados por FORTIN et alii (1980) e KOTTKE & OBERWINKLER (1986) inoculando *P. tinctorius* e *Cenococcum graniforme* em *Pinus strobus* e *Piloderma croceum* (*Corticium bicolor*) em *Picea abies*, respectivamente.

Para os isolados RVE 854 e RVE 851 não se verificou estímulo dos exsudados radiculares. A partir do momento que exauriu a fonte nutricional originada dos discos de meio de cultura veiculados com o inóculo, as hifas fúngicas

passaram a apresentar baixa taxa de crescimento junto às raízes. Como consequência, na avaliação do segundo e terceiro ensaios, a porcentagem de micorrizas foi inferior, do que no primeiro ensaio. Isso ocorreu em razão do maior crescimento do sistema radicular, em relação ao crescimento das micorrizas.

Pelo menos dois fatores envolvidos na baixa afinidade entre os hospedeiros e os isolados RVE 854 e RVE 851 foram bem evidenciados: a alta exigência nutricional dos dois isolados não permitiram que, eles crescessem junto ao sistema radicular utilizando os exsudatos e a necessidade de alta densidade de hifas em contato com as raízes para ocorrer a infecção micorrízica. A formação de micorrizas por esses isolados se restringiu, praticamente nas raízes, que se desenvolveram próximo ao local de deposição do inóculo, onde existiu maior concentração de hifas. Para os demais isolados, tais fatos não ocorreram e era necessário apenas poucos filamentos hifais junto as raízes, para que ocorresse a infecção, notadamente para E4 e RVE 82-1.

Em meio de síntese orgânico, como no item 4.2., esses fatores discutidos anteriormenre foram mascarados pelo alto potencial de inóculo, não sendo possível detectar nitidamente, diferenças na agressividade dos isolados.

Comparando o comportamento das duas espécies hospedeiras, os resultados mostraram que, em *E. urophylla* formou-se o dobro de ectomicorrizas em relação a *E. grandis* com

51,2% e 25,9% de área radicular colonizada, respectivamente (Tabela 8). KRISHNA et alii (1983) mostraram que diferentes níveis de colonização ectomicorrízica entre genótipos de um mesmo hospedeiro poderia ser devido a diferenças na taxa de crescimento dos fungos simbiotes através do tecido cortical das raízes ou poderia ser parcialmente relacionado ao balanço de substâncias inibidoras produzidas em resposta a infecções, como fenóis e fitoalexinas.

Vários trabalhos foram desenvolvidos para explicar as possíveis causas da resistência de hospedeiros a infecções ectomicorrízicas. A maioria deles trataram sobre a resistência indutiva, envolvendo a produção de compostos fenólicos pelo hospedeiro. Reações do hospedeiro com acúmulo de compostos fenólicos, na epiderme e hipoderme, resultante da infecção ectomicorrízica foi observado em *E. marginata* e *E. diversicolor* (MALAJCZUK et alii, 1987) e em *E. fastigata* (HARLEY & SMITH, 1982; LING-LEE, 1987). Esses trabalhos não mostraram até que ponto, os compostos fenólicos estavam envolvidos na resistência à infecção ectomicorrízica, pois em todos eles os autores relataram a ocorrência de colonização. No entanto, quando plântulas de *Eucalyptus* spp. foram inoculadas com espécies de fungos ectomicorrízicos incompatíveis, o acúmulo de compostos fenólicos, nas células epidérmicas e corticais aconteceu em grande quantidade (MALAJCZUK et alii, 1982). Em outras espécies hospedeiras, como *Pinus* spp. (PALM & STEWART, 1984), *Pseudotsuga* sp. (HARLEY & SMITH, 1982), o acúmu-

lo de compostos fenólicos nas células epidérmicas e corticais poderia reduzir ou impedir a infecção ectomicorrízica por isolados de espécies fúngicas supostamente compatíveis. No entanto, PICHE et alii (1981) não encontraram nenhuma diferença entre compostos fenólicos em raízes micorrízicas e não micorrízicas de *Pinus strobus* infectados por *P. tinctorius*. Eles concluíram que os compostos fenólicos em ambas as raízes foram inerentes à planta hospedeira e não foram produzidos como reação ao fungo micorrízico. Alguns trabalhos têm mostrado que, o acúmulo de compostos fenólicos em raízes de *Eucalyptus* spp. e *Pseudotsuga menziesii* elicitados por infecção de fungos micorrízicos foram tóxicos a fitopatógenos e não aos próprios fungos simbiotes (SYLVIA & SINCLAIR, 1983a; SYLVIA & SINCLAIR, 1983b). HARLEY & SMITH (1982) afirmaram que, o genótipo do hospedeiro pode ser um fator determinante importante na resposta à infecção micorrízica, analogamente como acontece na simbiose *Rhizobium*-leguminosa. Eles esclarecem que, um ponto fundamental é que, uma reação inicial pode ser a produção de compostos fenólicos na epiderme e no córtex, quando a planta hospedeira entra em contato com fungos incompatíveis.

Outro fator que poderia ter influenciado a colonização ectomicorrízica foi a origem dos isolados de *P. tinctorius*. Os isolados RVE 854 e RVE 851 foram obtidos de basidiocarpos coletados em espécies de *Eucalyptus* diferentes daquelas utilizadas nos experimentos. Houve a possibilidade

que, esses isolados seriam mais adaptados para as espécies hospedeiras de origem. Essa característica foi demonstrada largamente em *P. tinctorius* (DIXON et alii, 1984; MARX et alii, 1984; MITCHELL, 1984).

Comparando-se os resultados dos três ensaios nota-se que, à medida que aumentou o período de incubação, mais evidente foi se tornando o ordenamento dos isolados fúngicos, quanto à afinidade para os hospedeiros (Tabelas 7, 8 e 9). No terceiro ensaio, em ambos os hospedeiros é possível separar nitidamente, três classes de isolados bem escalonadas: alta afinidade (E4), média afinidade (RVE 82-1, E7, e E4) e baixa afinidade (RVE 854 e RVE 851). Esses resultados revelaram que, existe alta variabilidade entre os isolados testados, para colonização micorrízica nos dois hospedeiros.

A melhor adaptação de isolados de fungos ectomicorrízicos para determinadas espécies de um gênero hospedeiro foi bem documentada na literatura. GRENVILLE et alii (1986) relataram que cinco isolados de *P. tinctorius* diferiram quanto ao período de tempo necessário para infectar, colonizar e formar ectomicorrizas típicas em *E. pilularis*. MALAJCZUK & HARTNEY (1986) e VIEIRA (1984) verificaram que, de vários isolados de *P. tinctorius* testados para colonização micorrízica em *Eucalyptus* spp. apenas alguns responderam positivamente. Resultados análogos a esses foram encontrados por MARX & BRYAN (1970), MOLINA (1979b), TRAPPE (1977) e DIXON et alii (1984), MOLINA (1979a) estudando a formação de ectomicorri-

zas por vários isolados de *P. tinctorius* em *Pinus* spp. e em *Quercus* spp., respectivamente. TRAPPE (1987) afirmou que, a extrema variabilidade de *P. tinctorius*, apresentando uma infinidade de ecotipos oferece oportunidade para manejo das micorrizas, com seleção de isolados para caracteres específicos, que melhoram o desenvolvimento do hospedeiro, através de combinações mais eficientes. O autor sugeriu que, antes da produção do inóculo, a seleção de isolados é a etapa mais importante num programa de produção de inoculante.

No terceiro ensaio, os resultados mostraram que não houve grandes variações em relação ao segundo (Tabela 9). Nota-se que, a porcentagem de colonização ectomicorrízica aumentou em *E. urophylla* para os isolados E4 e RVE 82-1. Em *E. grandis* ela se estabilizou, com os resultados do 2º ensaio se repetindo no 3º. Para os isolados RVE 854 e RVE 851 verificou-se que, em *E. urophylla* existiu redução na proporção do sistema radicular micorrizado.

Tabela 9. Formação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada)* em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* por *Pisolithus tinctorius* em meio de cultivo sem carbono orgânico disponível, 70 dias após a inoculação.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s		Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	
E4	92,5	60,0	73,3 a
RVE82-1	56,3	27,5	41,9 b
E7	57,5	24,5	41,0 b
E6	57,5	30,0	43,8 b
RVE854	8,8	15,0	11,9 c
RVE851	15,0	12,0	13,7 c
Média	47,9 a	28,3 b	

C.V. (%) 22,7

*Médias de hospedeiros e médias de isolados seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si (Tukey 5%).

No tratamento E4 - *E. urophylla*, em algumas repetições, a colonização micorrízica chegou a 100%, com todos os ápices radiculares transformados em micorrizas.

Embora os resultados do 2º e 3º ensaios não mos

trassem nenhuma interação entre os isolados de *P. tinctorius* e as espécies de *Eucalyptus*. (Tabelas 8 e 9), ela já foi constatada por MITCHELL et alii (1984), estudando a simbiose em *Quercus* spp. com o mesmo fungo.

Secções das micorrizas observadas ao microscópio ótico mostraram que, aquelas formadas em meio inorgânico foram diferentes daquelas formadas em meio orgânico.

A espessura do manto das micorrizas formadas em meio orgânico foi muito superior em relação àquelas formadas em meio inorgânico. Apesar da redução, o manto micorrízico desenvolvido em meio inorgânico foi de boa espessura. Além disso, a rede-de-Hartig, no meio inorgânico mostrou-se mais espessa e desenvolvida, embora não ultrapassando a hipoderme. Muitos pesquisadores constataram que, as várias etapas da associação ectomicorrízica, como crescimento de hifas, formação de manto e penetração nos tecidos foram distorcidas em condições onde açúcar externo estava presente (ALEXANDER & HOGBERG, 1986; DUDDRIDGE, 1986b; GODBOUT & FORTIN, 1985; PALM & STEWART, 1984; SUMMERBELL, 1987; THOMAS & JACKSON, 1979). Todos eles são unânimes em afirmar que, na presença de açúcar externo, a espessura do manto foi muito superior.

No entanto, as outras características parecem estar na dependência dos simbiossiontes envolvidos. THOMAS & JACKSON (1979) constataram que nenhuma rede-de-Hartig desenvolvia na associação de *Picea sitchensis* com *Thelephora terrestris*.

tris e *Laccaria laccata* na presença de açúcar externo. Já HARLEY & SMITH (1982) afirmaram que, em determinados sistemas ricos em carboidratos, a rede-de-Hartig foi mais desenvolvida. PALM & STEWART (1984) relataram que, em ectomicorrizas sintetizadas sob altas concentrações de glucose é comum a não formação de rede-de-Hartig. Mudanças dramáticas, com o aparecimento de distorções, como penetração intracelular, espessamento e aposições na parede e pronunciada resposta fenólica foram produzidos nas associações ectomicorrízicas de *Populus tremuloides* com várias espécies de fungos inclusive *P. tinctorius* e de *Larix Kaempferi*, *Pinus sylvestris*, *Betula pubescens* e *Alloca suarina inophloia* com *Suillus gravillei*, somente na presença de glucose (DUDDRIDGE, 1986a; GODBOUT & FORTIN, 1985). Segundo DUDDRIDGE (1986a), essas reações dos hospedeiros foram prováveis mecanismos de defesa, em razão do aumento na agressividade dos fungos simbiontes.

Alguns outros aspectos dos resultados nas Tabelas 7, 8 e 9 ainda carecem de ser discutidos. Os coeficientes de variação foram altos. Isso foi em consequência da grande variação na porcentagem de colonização, que existiu entre as repetições de um mesmo tratamento. Esse fator parece ser comum em experimentos envolvendo ectomicorrizas. Vários pesquisadores relataram esse problema em seus trabalhos (MARX et alii, 1984; MITCHELL et alii, 1984; MOLINA, 1979b ; PARK, 1971).

A quantidade de ectomicorrizas formadas, provavelmente ficaram aquém do potencial de compatibilidade existente entre os isolados de *P. tinctorius* e os hospedeiros testados, principalmente para os isolados com maior exigência nutricional. Isso porque as plântulas foram incubadas sob baixa intensidade luminosa e se estiolaram, ocorrendo, como consequência menor disponibilidade de carboidratos provenientes da fotossíntese, nas raízes, para o fungo.

Comparando os resultados da porcentagem de formação de micorrizas, dos três ensaios desse item, com a taxa de crescimento dos seis isolados de *P. tinctorius*, em meio de cultura MNM verifica-se que, não existe relação entre as duas variáveis. MARX (1981) e MARX & KENNY (1982) relataram que não existe nenhuma relação consistente entre taxa de crescimento em cultura pura e grau de desenvolvimento de micorrizas por *P. tinctorius*. No entanto, GRENVILLE et alii (1986) verificaram que, isolados de *P. tinctorius* com maior afinidade para formar micorrizas em *E. pilularis* foram os que apresentaram maior taxa de crescimento em cultura pura. ZAK (1973) afirma que, além do crescimento vegetativo, características como, variação da cor da colônia, textura do crescimento hifal e outras diferenças morfológicas entre isolados fúngicos parecem não refletir nas ectomicorrizas formadas por eles. THEODOROU & BOWEN (1971) mostraram que, o crescimento de colônias de *Rhizopogon luteolus* em meio de cultura foi de valor muito limitado para prever o comportamento em simbiose com *Pinus radiata*.

Foi constatada, principalmente no terceiro ensaio, a presença de cordões miceliais irradiando das micorrizas para o substrato. Essa característica tornou mais evidenciada para os isolados com maior afinidade em *E. urophylla*, notadamente E4 e RVE 82-1.

Um fator que, provavelmente contribuiu para um pequeno mascaramento dos resultados, reduzindo a diferença de colonização entre os dois hospedeiros teria sido a limitação, no sentido radial, no crescimento das raízes e fungos . O tubo-de-ensaio direcionou o crescimento de parte do sistema radicular, impedindo a irradiação, o que facilitou o contato com o fungo.

A técnica de inoculação em meio inorgânico mostrou-se eficiente para escalonar a afinidade dos seis isolados de *P. tinctorius* em *E. urophylla* e em *E. grandis*, como também para verificar a diferença de susceptibilidade entre os hospedeiros. Segundo MARX & KENNEY (1982), a primeira e importante etapa, em qualquer programa de inoculação de plântulas é a seleção dos fungos simbiotes. De acordo com os autores, a especificidade é um traço fisiológico essencial a ser considerar no processo de seleção. Sob essa ótica, foi possível comprovar nitidamente que a técnica utilizada para os três ensaios prestou-se bem para detectar esse caráter, na simbiose entre os isolados de *P. tinctorius* e *E. urophylla* e *E. grandis*.

4.4. Desenvolvimento de ectomicorrizas em "plantlets" de *E. urophylla*, de *E. grandis* e de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) inoculadas através da técnica do papel sanduiche

Durante a produção do inóculo, os isolados E7 e E6 apresentaram mudanças na taxa de crescimento e estrutura da colônia micelial. O isolado E7 mudou para crescimento rápido, igualmente ao isolado RVE 854 e o isolado E6 passou a comportar-se contrariamente, com crescimento lento. Além disso, o isolado E6 manifestou crescimento com colônia apresentando baixa densidade micelial e com setores.

Essas características não se tornaram problemas na produção do inóculo, uma vez que, durante o período de incubação, toda a superfície dos semi-discos de celulose foi tomada pelas hifas dos isolados de *P. tinctorius*.

Os resultados do primeiro ensaio mostraram que, em todos os tratamentos houve formação de micorriza, com manto característico, até 12 dias após a inoculação (Tabela 10).

Tabela 10. Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em "plantlets" de *E. urophylla*, de *E. grandis* e de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) por *Pisolithus tinctorius* através da técnica do papel sanduiche, 12 dias após a inoculação.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s			Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	Híbrido	
RVE854	28,3	3,9	27,2	19,9
E4	85,6	5,6	24,9	38,7
RVE82-1	71,1	4,2	22,2	32,5
E7	69,6	3,0	19,5	30,7
RVE851	56,0	4,1	16,7	25,6
E6	76,6	3,5	12,2	30,8
Média	64,5	4,0	20,5	

Para os hospedeiros *E. urophylla* e o híbrido torna-se difícil discutir os resultados sob o ponto de vista quantitativo, porque a colonização micorrízica foi muito afetada por resíduo do meio de enraizamento, que impediu o contato das hifas com as raízes. Isso aconteceu em razão da grande quantidade de meio de enraizamento cobrindo muitas raízes, que as acompanhou na operação de transferência das "plantlets" para as placas-de-Petri. Esse problema foi mais acentuado no

híbrido, devido ao maior volume do seu sistema radicular. Como consequência, os resultados da Tabela 10 indicaram que, a porcentagem de secções micorrízicas no híbrido foi menor, do que em *E. urophylla*, com 20,5% e 64,5%, respectivamente, embora aquela espécie possuísse maior número de ápices radiculares.

Tal fato não ocorreu com as raízes de *E. grandis*, devido a sua arquitetura diferente.

Mesmo assim, como as raízes de *E. urophylla* e do híbrido possuíam vários ápices radiculares e rápido crescimento, ainda houve formação de micorrizas em porcentagens muito superiores em relação a *E. grandis*.

Em *E. grandis*, na maioria das "plantlets", o sistema radicular não possui a ramificação, detendo apenas um ápice radicular. Em consequência apenas pequena extensão da raiz se transformou em micorriza. Como toda a raiz foi seccionada, tornou-se baixa a porcentagem de cortes micorrízicos (4,0%). Associado a esse problema, ainda existe o fator da maior resistência à infecção micorrízica em *E. grandis*, já discutida em ensaios anteriores.

Nesse ensaio, também foi bastante frequente, a ocorrência cortes com manto em formação, levando à dúvida na decisão de considerá-lo.

Qualitativamente foi possível detectar algumas

diferenças entre as micorrizas formadas nos três hospedeiros. Embora secções de raízes apresentassem manto típico em alta frequência, o fungo praticamente ainda não havia penetrado totalmente. Em *E. urophylla* e no híbrido, a presença de rede-de-Hartig típica era baixa e muito rara em *E. grandis*.

As raízes das "plantlets" dos três hospedeiros apresentavam grande quantidade de pelos absorventes em formação, nos ápices, quando da inoculação. Nessas regiões aconteceu formação de micorrizas, que paralizaram o desenvolvimento dos pelos radiculares. A ocorrência de cortes micorrízicos apresentando pelos radiculares se degenerando, era frequente. Resultados semelhantes a esses foram encontrados por MASSICOTTE et alii (1987).

Doze dias após a inoculação, na primeira avaliação, já foi possível detectar nitidamente a presença do alargamento radial das células epidérmicas. Segundo MASSICOTTE et alii (1987), células epidérmicas de *Eucalyptus* spp. apresentaram essa resposta rapidamente, quando infectadas por fungos ectomicorrízicos,

No segundo ensaio, os resultados se aproximaram mais da realidade, com menor interferência de fatores externos (Tabela 11). A colonização micorrízica praticamente não aumentou em *E. grandis*, pois era de 4,0% no primeiro ensaio e passou para 4,6% no segundo. Esse comportamento foi em decorrência da baixa taxa de crescimento das raízes do hospedeiro. O crescimento das raízes foi muito pequeno e consequentemen

te novas micorrizas não foram formadas e as já formadas não se alastraram.

Tabela 11. Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em "plantlets" de *E. urophylla*, de *E. grandis* e de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) por *Pisolithus tinctorius* através da técnica do papel sanduiche, 24 dias após a inoculação.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s			Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	Híbridos	
RVE854	72,2	3,5	65,1	46,9
E4	80,7	6,2	67,0	51,3
RVE82-1	75,6	5,5	79,8	53,6
E7	74,5	4,6	50,0	43,0
RVE851	77,0	3,8	86,7	55,8
E6	76,2	4,1	58,7	46,3
Média	76,0	4,6	67,9	

Como as raízes de *E. urophylla* e do híbrido apresentaram alta taxa de crescimento, a proporção de micorrizas aumentou bastante entre a primeira e segunda avaliações. A maioria dos ápices radiculares cresceram e se livraram dos resíduos do meio de enraizamento, que os cobria. Em raízes

de *E. urophylla*, que veicularam menos meio de enraizamento, por serem em menor número, não mais houve interferência na formação micorrízica. Na segunda avaliação, 24 dias após a inoculação, todos os ápices radiculares estavam em contato com as hifas dos isolados de *P. tinctorius* e a porcentagem de cortes micorrízicos foi no mínimo de 72,2%.

Por essa razão, em *E. urophylla* a porcentagem de cortes micorrízicos se aproximou ao registrado no segundo ensaio do item 1.

Embora o substrato para os ensaios desse item tenha sido diferente daquele do item 1., o alto potencial de inóculo se aproximou entre eles. Por essa razão, as diferenças de susceptibilidade dos hospedeiros e da agressividade dos isolados de *P. tinctorius* foram mascaradas. Todos os isolados apresentaram em torno de 76,0%, 4,6% e 67,9% de cortes micorrízicos em *E. urophylla*, em *E. grandis* e no híbrido, respectivamente no segundo ensaio.

Para o híbrido, na segunda avaliação, ainda persistiu a influência do resíduo do meio de enraizamento, na colonização micorrízica. Essa foi em muito menor intensidade, pois a diferença entre as médias da porcentagem de cortes micorrízicos entre *E. urophylla* e o híbrido passou de 44,0 na primeira avaliação para 8,1 na segunda avaliação. O efeito do resíduo do meio de enraizamento se torna, ainda mais claro, se se compara os resultados da Tabela 11, com àqueles da

Tabela 2. Era de se esperar, que as porcentagens de cortes micorrízicos para isolados fúngicos se aproximassem, como aconteceu em *E. urophylla*. No entanto, para o híbrido e *E. grandis* a formação micorrízica foi inferior usando a técnica do papel sanduiche. Também, pelo mesmo motivo, a média das micorrizas no híbrido foi inferior à média em *E. urophylla*, tanto no primeiro quanto no segundo ensaios, com 64,5% e 76,0% e 20,5 e 67,9%, respectivamente. Mas, mesmo no segundo ensaio, no híbrido, a maioria dos ápices radiculares estavam micorrízicos, como mostra a Figura 3.

Quanto ao hospedeiro *E. grandis* é possível observar que, no segundo ensaio, o percentual de micorrizas formadas foi muito inferior àquele registrado na Tabela 2. Isso se deveu ao fato de que, no substrato turfa-vermiculita, o desenvolvimento radicular dessa espécie foi muito superior, em relação ao substrato da técnica do papel sanduiche. Esse efeito também fez-se notar nas raízes de *E. urophylla* e do híbrido, mas em pequena intensidade. Por isso, ele poderia também ser adicionado ao efeito do meio de enraizamento residual presentes nas raízes.

Quanto ao aspecto qualitativo das micorrizas na segunda avaliação, 15 dias após a inoculação verificou-se grande aumento na frequência da rede-de-Hartig em todos os hospedeiros. Também já foi possível detectar diferenças entre as micorrizas formadas por alguns isolados. Para os isolados E4 e RVE 82-1, em *E. urophylla* e no híbrido, o manto

Figura 3. Ectomicorrizas formadas em "plantlet" de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*), 24 dias após a inoculação com o isolado E4 de *Pisolithus tinctorius* usando a técnica do papel sanduiche.

mostrou-se mais espesso, com hifas mais compactas e maior frequência da rede-de-Hartig. Nas micorrizas em todos os tratamentos, a rede-de-Hartig formada não ultrapassou a hipoderme. MASSICOTTE et alii (1987) verificou que, a hipoderme em *E. pilularis* possui lamelas de suberinas e se transforma numa barreira à penetração de hifas de *P. tinctorius*.

4.5. Desenvolvimento de ectomicorrizas em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* inoculadas através da técnica do papel sanduiche.

Na avaliação do primeiro ensaio, os resultados mostraram que, a maior parte do sistema radicular das plântulas de ambos os hospedeiros havia se transformada em micorrizas com manto característico, após 12 dias à inoculação, com no mínimo 65,2% de cortes micorrízicos (Tabela 12). Embora, grande parte das secções micorrízicas apresentasse manto típico, a presença de rede-de-Hartig foi baixa em *E. urophylla* e rara em *E. grandis*, mostrando que o fungo, praticamente ainda não havia penetrado. Isso evidencia que, primeiro ocorre a formação de manto, para depois se formar a rede-de-Hartig. Essa ordem de sequência de eventos foi comprovada por HORAN et alii (1988), na colonização ectomicorrízica de *E. globulus* subsp. *bicospata* por *P. tinctorius*. No entanto, NYLUND & UNESTAN (1982) observaram que, em plântulas *Picea abies* infectadas por *Piloderma croceum* [*Corticium bicolor*], a formação

de manto verdadeiro só se iniciou após a penetração de hifas no córtex.

Tabela 12. Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* por *Pisolithus tinctorius* através da técnica do papel sanduiche, 12 dias após a inoculação.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s		Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	
E4	88,4	83,7	86,0
E7	88,1	87,5	87,8
RVE82-1	82,2	65,2	73,1
E6	80,5	80,6	80,6
RVE851	73,2	82,3	77,8
RVE854	66,4	68,4	67,4
Média	79,8	78,0	

A presença de cortes de raízes com manto em formação, que poderia trazer dúvidas na leitura foi pequena. HORAN et alii (1988) mostraram que, no primeiro dia após a inoculação de plântulas de *E. globulus* subsp. *bicostata* com *P. tinctorius* existiu evidência da interação. Até quatro dias após a inoculação, todos os fatores básicos de uma ectomicor

riza estavam presentes e posterior a esse período, apenas ocorria aumento na densidade do manto e maior penetração da rede-de-Hartig. Vinte dias após a inoculação tinha ocorrido a formação de micorriza na sua forma característica. BACHI (1988) observou que, 14 dias após a inoculação de *E. grandis* com *P. tinctorius* houve a formação de ectomicorrizas típicas, com manto e rede-de-Hartig bem desenvolvidos. Em *Pinus strobus*, após 5 dias à inoculação com *P. tinctorius* existiu formação de ectomicorrizas típicas, com manto e rede-de-Hartig bem desenvolvidos (FORTIN et alii, 1980).

Sob o ponto de vista quantitativo, o comportamento dos isolados em cada hospedeiro, nos dois ensaios foi muito próximo, com ligeira superioridade em *E. urophylla*. Isso mostra novamente, o efeito do alto potencial de inóculo, mascarando a diferença de susceptibilidade entre os hospedeiros. Análise análoga pode ser desenvolvida para o comportamento de cada isolado nos dois hospedeiros.

Tabela 13. Formação de micorrizas (% de cortes micorrízicos) em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* por *Pisolithus tinctorius* através da técnica do papel sanduiche, 24 dias após a inoculação.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s		Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	
E4	94,7	96,4	95,6
E7	86,9	81,8	84,4
RVE82-1	92,5	87,7	90,1
E6	95,3	84,9	90,1
RVE851	91,3	92,1	91,7
RVE854	84,0	80,3	82,2
Média	90,8	87,2	

Comparando-se os resultados do 1º ensaio com os do 2º ensaio verifica-se que, àqueles do 2º ensaio foram superiores em ambos hospedeiros. E comparando os resultados do 2º ensaio, com àqueles da 2ª leitura do item 4.2. verifica-se que eles são bem próximos. Isso mostrou que, alguns ápices radiculares, quando da primeira avaliação, embora infectados, não apresentaram manto típico. Essa característica foi registrada com maior evidência para os isolados RVE 854 e RVE 851. Novamente foi confirmada a menor afinidade desses dois isolados para hospedeiros, principalmente para *E. grandis*.

GRENVILLE et alii (1986) mostraram que, o tempo de formação de ectomicorriza típica em *E. pilularis*, após a inoculação com *P. tinctorius* pode variar de seis a nove dias, dependendo do isolado.

Outro aspecto denotado pelos resultados foi o comportamento do isolado RVE 854. Esse isolado para induzir alta colonização micorrízica necessita de maior concentração de hifas, além de ser mais exigente em nutrientes e possuir menor atração por exsudatos radiculares, como ficou evidenciado nos ensaios dos itens 4.2. e 4.3.. Entretanto, na técnica do papel sanduiche, as hifas fúngicas tiveram que crescer a partir dos semi-discos de celulose, para depois entrar em contato com as raízes do hospedeiro. Pode ser provável que, esses fatores seriam os responsáveis pela menor colonização micorrízica apresentada pelo isolado RVE 854. Tais restrições não ocorreram em turfa-vermiculita com meio orgânica

Na avaliação do segundo ensaio, visualmente todos os ápices radiculares estavam colonizados, inclusive aqueles das raízes primárias. A confirmação foi mostrada pelos resultados na Tabela 13, que se aproximaram daqueles das Tabelas 5 e 6. Resultados semelhantes foram relatados por BACHI (1988), em plântulas de *E. grandis* inoculadas por *P. tinctorius*, usando a técnica do papel sanduiche. No entanto, CHILVERS et alii (1986), através da técnica do papel sanduiche verificaram que, duas semanas após a inoculação de *P. tinctorius* e *P. involutus* em *E. globulus* subsp. *bicostata*, somen-

te, entre 40 e 80% dos ápices radiculares haviam se transformados em micorrizas. Também observaram que, as raízes primárias em todos os tratamentos não foram infectadas.

Semelhantemente ao encontrado no ensaio do item 4.4., na avaliação do segundo ensaio foi confirmado aumento na espessura do manto e na frequência, espessura e penetração da rede-de-Hartig. Outros aspectos qualitativos das ectomicorrizas também foram constatados, como presença de pelos radiculares atrofiados e alargamento radial das células epidérmicas.

Os isolados E4, RVE 82-1, E7 e E6 revelaram maior agressividade nos hospedeiros, pois nas micorrizas formadas por eles foi observado manto mais espesso e compactado e maior frequência da rede-de-Hartig. Essas características se tornaram mais evidentes na primeira avaliação, aos 12 dias após a inoculação e facilmente detectada em *E. urophylla*.

Quanto à formação de manto era difícil detectar diferenças entre os isolados ou susceptibilidade entre os hospedeiros. No entanto, se quantificasse a presença e/ou frequência da rede-de-Hartig, para avaliar colonização micorrízica entre e dentro de cada grupo de simbioses seria bem provável que se detectasse diferenças entre eles, que não foram encontradas.

HORAN et alii (1988) enfatizam que, a técnica do papel sanduiche é vantajosa em relação a outras técnicas

de síntese de ectomicorrizas em cultura axênica, porque a associação ocorre em recipiente transparente, permite inocular grande número de raízes simultaneamente e há contato imediato entre fungo e raiz. Por essa razão eventos sequenciais, que ocorrem durante a formação de ectomicorrizas podem ser prontamente observados em qualquer intervalo de tempo.

4.6. Perpetuação de ectomicorrizas em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* inoculadas pela técnica do papel sanduiche e transplantadas para o solo esterilizado.

As plântulas na época do transplante apresentavam o sistema radicular com elevada colonização ectomicorrízica. Geralmente possuíam uma raiz primária bem desenvolvida, com cerca de um a três primórdios secundários.

Os resultados do primeiro ensaio mostraram que, na maioria dos tratamentos, não se observou a perpetuação das micorrizas, após o transplante para solo esterilizado (Tabela 14). Somente em quatro tratamentos foi constatada a presença de poucos ápices radicularês de segunda e terceira ordens caracterizando colonização micorrízica típica de *P. tinctorius*. Dos isolados testados, somente com três deles (E4, E7 e RVE 82-1) aconteceu desenvolvimento micorrízico pós-transplante. Esses isolados corresponderam àqueles que apresentaram maior capacidade de colonização micorrízica nos ensaios *in vitro* em meio inorgânico, no ítem 3.3.. Provavelmente, mesmo sob condições adversas, devido à alta afinidade desses isolados pa-

ra os hospedeiros, principalmente em *E. urophylla*, ainda aconteceu desenvolvimento hifal do fungo, acompanhando algumas raízes. Nos demais tratamentos, com o desenvolvimento das raízes no solo, todas as micorrizas formadas *in vitro* entraram em senescência e desapareceram.

Tabela 14. Perpetuação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada) em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* inoculadas com *Pisolithus tinctorius* através da técnica do papel sanduiche e avaliação aos 80 dias após o transplante para solo esterilizado

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s		Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	
E4	1,2	1,2	1,2
E7	1,7	0,0	0,8
RVE82-1	0,8	0,0	0,4
E6	0,0	0,0	0,0
RVE851	0,0	0,0	0,0
RVE854	0,0	0,0	0,0
Média	0,5	0,2	

Alguns fatores poderiam explicar as causas da não perpetuação das ectomicorrizas nos hospedeiros em solo

previamente esterilizado. A primeira delas foi evidenciada pela baixa afinidade de alguns isolados para os hospedeiros. *In vitro*, onde as condições foram ótimas para a simbiose, os isolados RVE 854 e RVE 851 revelaram pouca colonização em *E. urophylla* e menos ainda em *E. grandis*. Outro fator, que certamente esteja envolvido é a diferença existente entre o crescimento radicular e o alastramento das micorrizas. Alguns trabalhos têm mostrado que, em raízes primárias e em muitas raízes secundárias, os ápices cresciam muito mais rapidamente, do que as micorrizas e os fungos ectomicorrízicos (CHILVERS & GUST, 1982a; MARKS & FOSTER, 1973). Por essa razão as raízes escaparam da infecção e colonização ectomicorrízicas. CHILVERS & GUST (1982b) observaram que todos os ápices primários e muitos ápices secundários de raízes de *E. st. johnii* não foram colonizados por fungos ectomicorrízicos. Também, CHILVERS et alii (1986) relataram que, mesmo na presença de hifas de *P. tinctorius* e *P. involutus*, raízes primárias de *E. globulus* subsp. *bicostata* não foram infectados. Da mesma forma poderia ter contribuído para a ausência ou baixa perpetuação micorrízica, o choque nutricional sofrido pelos isolados fúngicos. Na fase *in vitro*, embora *P. tinctorius* tivesse formado ectomicorriza nos hospedeiros, as hifas estavam ligadas a uma fonte nutricional artificial. Com o transplante para o solo, a fonte nutricional foi cortada bruscamente e o fungo teria que se nutrir utilizando somente os fotossintetizados. PONS et alii (1986) mostraram que, o cres

cimento micelial de *P. tinctorius* foi susceptível à mudança brusca na fonte de carbono nutricional, embora ambas fossem utilizadas como fonte de energia. NYLUND & UNESTAM (1982) in dicaram que, o choque nutricional afetou significativamente, o inóculo de *P. tinctorius*. Associado a esse fator, menor quantidade de fotossintetizados estavam à disposição do fungo simbiote durante e logo após o choque nutricional, porque as plântulas passaram por baixa intensidade luminosa in vi-tro e ficaram sob sombreamento, um período após o transplan-
te.

Há de se ressaltar ainda, que as plântulas fo-
ram transplantadas com o papel-de-filtro aderido às raízes. No solo, o papel de filtro foi colonizado por fungos saprofí-
ticos, celulolíticos, principalmente *Trichoderma* sp. e *Penicil-
lium* sp.. Esses microrganismos poderiam ter contribuído para a redução da perpetuação das micorrizas, por meio de antago-
nismo aos isolados de *P. tinctorius* e/ou induzindo resistên-
cia à infecção micorrízica nos hospedeiros. Vários pesquisa-
dores relataram que, a presença de microrganismos saprofíti-
cos no solo pode afetar o fungo simbiote e reduzir ou ini-
bir a colonização micorrízica (MARX, 1980a; BOWEN & THEODO-
ROU, 1973).

Tabela 15. Perpetuação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada) em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* inoculadas com *Pisolithus tinctorius* através da técnica do papel sanduiche e avaliação aos 120 dias após o transplante para solo esterilizado.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s		Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	
E4	3,8	2,5	3,2
E7	0,0	0,0	0,0
RVE82-1	3,0	2,5	2,9
E6	0,0	0,0	0,0
RVE851	1,2	0,0	0,6
RVE854	0,0	0,0	0,0
Média	1,3	0,8	

Na avaliação do segundo ensaio, os resultados da Tabela 15 mostraram que, ocorrem poucas mudanças em relação aos resultados da Tabela 14. É possível observar ligeiro aumento na colonização micorrízica para os isolados E4 e RVE 82-1, revelando que esses isolados possuíam maior capacidade de associar aos hospedeiros, principalmente em *E. urophylla*. Isso indicou que, estava havendo uma pequena tendência na

perpetuação das ectomicorrizas formadas por esses isolados . Nos demais tratamentos, com excessão do RVE 851- *E. urophylla*, nenhuma micorriza foi visualizada. O desenvolvimento de micorriza nesse tratamento, no segundo ensaio, provavelmente aconteceu devido a uma maior rusticidade desse isolado fúngico, aos fatores inibidores da perpetuação. No primeiro ensaio pode ser provável, que nesse tratamento tivesse existido alguma colonização, mas não perceptível a olho nu.

Para os isolados E4 e RVE 82-1, apesar da presença de fatores desfavoráveis à colonização, mas devido à alta afinidade para os hospedeiros, ainda ocorreu desenvolvimento micorrízico, ligeiramente superior em *E. urophylla*.

Na testemunha dos dois ensaios, constituída de plântulas não inoculadas, não foi encontrado nenhum traço de qualquer colonização micorrízica.

Com a formação de raízes de terceira ordem e ordens superiores, provavelmente a velocidade de perpetuação das ectomicorrizas, até então desenvolvidas, se acelere e após determinado tempo, a colonização micorrízica seja bem superior.

4.7. Perpetuação de ectomicorrizas em "plantlets" de *E. urophylla*, de *E. grandis* e de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) inoculadas em cultura axênica e transplantadas para solo esterilizado.

No primeiro ensaio, que englobou "plantlets" incubadas 45 dias após a inoculação, a grande maioria delas (cerca de 80%) morreram logo após o transplante para solo esterilizado. Por essa razão tornou-se impossível desenvolver a avaliação da colonização micorrízica e esse ensaio foi descartado.

No segundo ensaio, que envolveu "plantlets" incubadas 60 dias após a inoculação, aconteceu a morte de muitos hospedeiros (cerca de 40%), mas como havia transplantado o dobro do necessário, foi possível obter o número de plantas suficientes em cada tratamento. A redução do número de plantas mortas teria sido em consequência do maior período de incubação e ao período de exposição ao sol, que tornaram as "plantlets" mais rústicas.

A morte das "plantlets", geralmente ocorreu cerca de 6-10 dias após o transplante para o solo previamente esterilizado e foi em consequência do ataque de fungos saprófitas, basicamente *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Trichoderma* spp.. Embora considerados saprófitos, esses fungos se tornaram danosos, com alta agressividade para as "plantlets", causando podri-

dão de todo o sistema radicular e parte aérea. Isso aconteceu em consequência do alto teor de açúcares no bloco de turfa-vermiculita-raízes transferido para o solo, dos ferimentos causados no sistema radicular durante a retirada das "plantlets" dos tubos-de-ensaio e do extremo estado de tenacidade das "plantlets". REYNOIRD & STRULLU (1986) verificaram que, necroses nas "plantlets", juntamente com a má qualidade do sistema radicular foram os principais fatores responsáveis pelas altas perdas registradas na etapa de transplante de "plantlets" de eucalipto de tubos-de-ensaio para o substrato turfa-vermiculita, em casa-de-vegetação.

Os resultados da Tabela 16 indicaram que, somente para os isolados E4, RVE 82-1 e RVE 851 ocorreu perpetuação das micorrizas formadas *in vitro*, mas mesmo assim em baixa intensidade com no máximo 10% de colonização. As micorrizas formadas *in vitro* pelos isolados RVE 854, E6 e E7, nos três hospedeiros não apresentaram nenhum desenvolvimento em solo previamente esterilizado. Após o transplante elas entraram em senescência e desapareceram.

Na época do transplante, o sistema radicular das "plantlets" apresentava alto grau de colonização micorrizica, semelhante àquele, que foi observado no terceiro ensaio do item 3.1..

As explicações para as causas envolvidas na senescência e desaparecimento das ectomicorrizas e a não

perpetuação são várias e algumas delas coincidem com àquelas envolvidas na degenerescência das ectomicorrizas nos ensaios do item 3.6.. No transplante, todo o substrato turfa-vermiculita do tubo-de-ensaio umidecido com meio orgânico, juntamente com o sistema radicular das "plantlets" foram transferidos para o solo esterilizado. Como consequência ocorreu uma explosão de microrganismos saprofíticos, principalmente fungos do tipo *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* colonizando esse substrato. Provavelmente, esses fungos inibiram a formação de novas ectomicorrizas, à medida que o sistema radicular se desenvolvia. Vários pesquisadores comprovaram a inibição da colonização ectomicorrízica por microrganismos saprofíticos, através do seu efeito antagônico. ASHTON (1976) e MARX & ROSS (1970) observaram que *Penicillium* sp. inibiu a formação de ectomicorrizas em plântulas de *P. taeda* por *Thelephora terrestris* e em *E. regnans* por *Mesophelia arenaria*, respectivamente. SUMMERBELL (1987) relatou que, de 10 espécies de *Trichoderma* testadas, quatro inibiram o desenvolvimento ectomicorrízico de *Laccaria bicolor* em *Picea mariana* em solo esterilizado. Também observou que, esses saprófitas colonizaram vigorosamente, solo fumigado. MARX et alii (1984) mostraram que, o inóculo de *P. tinctorius* veiculado em turfa-vermiculita reduziu drasticamente a eficiência em *Pinus* spp., quando os resíduos de açúcares não foram retirados por lavagem, em razão da explosão de microrganismos saprófitos. Segundo BOWEN & THEODOROU (1973), *Penicillium* sp. e *Pseudomonas* fluorescente inibi-

biram a colonização ectomicorrízica por vários fungos em *Pinus* sp. De acordo com MARX et alli (1976) e RUEHLE (1983), o fator mais importante na perpetuação de ectomicorrizas em solos não esterilizados é a presença de microrganismos competidores.

Associado ou não ao efeito antagônico, os microrganismos saprofíticos, também poderiam estar elicitando aumento de resistência à colonização micorrízica nas "plantlets" de *E. urophylla*, de *E. grandis* e do híbrido. A propriedade, que microrganismos possuem, para induzir resistência no hospedeiro a fitopatógenos foi amplamente comprovada (DELL & WALLACE, 1981; SYLVIA & SINCLAIR, 1983a; SYLVIA & SINCLAIR, 1983b). SYLVIA & SINCLAIR (1983b) observaram que *Trichoderma harzianum* e *Pseudomonas cepacia* elicitarão pesados acúmulos de compostos fenólicos no córtex de raízes de plantas de *Pseudotsuga menziesii*, em substrato com meio de cultura M NM.

Outros fatores, que poderiam estar contribuindo para reduzir ou impedir a perpetuação micorrízica seriam a resistência constitutiva dos hospedeiros, principalmente em *E. grandis*; o choque e "stress" nutricionais sofridos pelo fungo simbiote e menor quantidade de fotossintetizados disponíveis para o fungo simbiote, logo após o transplante para solo esterilizado. Esses fatores também estavam envolvidos nos ensaios do item 4.6., onde foram discutidos mais detalhadamente.

A qualidade do sistema radicular, certamente estaria contribuindo para a pequena ou ausente perpetuação micorrízica. O sistema radicular das "plantlets" era muito pior, em relação às plântulas e após o transplante para solo esterilizado apresentou baixa ramificação e desenvolveu pequeno número de novos ápices radiculares.

Outro efeito, que certamente afetou o desenvolvimento micorrízico no solo esterilizado, contribuindo para a baixa colonização foi o excesso de umidade verificado em determinados períodos, durante a condução do ensaio. O solo nos vasos passou várias vezes por períodos de dois a 5 dias de chuvas torrenciais, que causaram encharcamento. DIXON et alii (1985) mostraram que irrigações diárias de tubetes, contendo plântulas micorrízicas de *Quercus velutina* e *Q. alba* por *P. tinctorius* reduziram significativamente as micorrizas, enquanto que irrigações a cada dois dias não o fez.

Apesar dos fatores adversos, as micorrizas formadas *in vitro* se perpetuaram para alguns isolados fúngicos, embora em baixa intensidade, mas nitidamente detectadas a olho nu.

Tabela 16. Perpetuação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada) em "plantlets" de *E. urophylla*, de *E. grandis* e de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) inoculadas *in vitro* com *Pisolithus tinctorius* em meio de cultivo com carbono orgânico disponível e avaliação aos 90 dias após o transplante para solo esterilizado.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s			Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	Híbrido	
RVE82-1	10,1	1,7	6,7	6,1
E4	4,5	0,0	5,0	3,2
RVE851	0,0	3,3	0,0	1,1
RVE854	0,0	0,0	0,0	0,0
E7	0,0	0,0	0,0	0,0
E6	0,0	0,0	0,0	0,0
Média	2,4	0,8	1,9	

Na testemunha constituída de "plantlets" não inoculadas não foi detectado qualquer tipo de ectomicorriza.

Os resultados mostraram que, os isolados RVE 82-1 e E4 desenvolveram colonização micorrízica, principalmente em *E. urophylla* e no híbrido (Tabela 16). Na maioria das repetições envolvendo esses tratamentos foi encontrado

alguma colonização micorrízica característica de *P. tinctorius*. No tratamento RVE 82-1 - *E. urophylla* ocorreu repetição com até 30% de colonização micorrízica. Esses dois isolados, nos ensaios *in vitro* revelaram maior afinidade para esses hospedeiros. MALAJCZUK & HARTNEY (1986) observaram abundante perpetuação de ectomicorrizas em "plantlets" de *E. camaldulensis* inocuadas *in vitro* com *P. tinctorius* e transferidas com raiz nua para o substrato areia-turfa.

Em *E. grandis*, o desenvolvimento micorrízico foi muito baixo, bem inferior àquele verificado nos outros dois hospedeiros.

Provavelmente, com o passar do tempo, com o aparecimento de maior número de ápices radiculares, essas ectomicorrizas aumentariam em nível muito superior ao encontrado.

Quando da avaliação, praticamente todo o resíduo energético do substrato transplantado acompanhando as raízes provavelmente teria sido consumido pelos microrganismos saprofíticos, pois a população desses estava drasticamente reduzida. Assim, o seu efeito deletério à colonização micorrízica, provavelmente teria sido reduzido. Dessa forma a perpetuação das micorrizas até então presentes seria menos prejudicada e seu desenvolvimento se tornaria mais acelerado.

4.8. Perpetuação de ectomicorrizas em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* inoculadas em meio orgânico e transplantadas para solo esterilizado.

Os resultados do primeiro ensaio mostraram o efeito primário negativo da presença de açúcares na perpetuação de ectomicorrizas em solo esterilizado (Tabela 17). Esses resultados apresentaram-se à semelhança daqueles do ensaio do item 4.7.. Em ambos os ensaios não se verificou nenhuma perpetuação micorrízica para os isolados RVE 854, E6 e E7 e baixa para os isolados RVE 82-1, E4 e RVE 851, com no máximo 8,3% de colonização radicular.

Na época do transplante para o solo esterilizado, o sistema radicular de todas as plântulas inoculadas revelaram alta colonização ectomicorrízica, próxima àquela registrada na Tabela 5 do item 5.2.. Isso mostra que, para aqueles isolados, que não apresentaram perpetuação micorrízica nos hospedeiros, as micorrizas formadas *in vitro*, após o transplante para o solo previamente esterilizado entraram em senescência e desapareceram.

Os resultados já revelaram que *E. urophylla* foi mais susceptível do que *E. grandis*. Essa propriedade se torna mais clara, quando se observa os resultados da Tabela 18, onde ocorreu 8,6% e 1,5% de colonização micorrízica, respectivamente.

Isso vem confirmar os resultados verificados *in vitro*, que mostraram ser E4 e RVE 82-1 os isolados mais agressivos e *E. urophylla* a espécie mais susceptível.

Tabela 17. Perpetuação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada) em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* inoculadas *in vitro* com *Pisolithus tinctorius* em meio de cultivo com carbono orgânico disponível e avaliação aos 60 dias após o transplante para solo esterilizado.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s		Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	
RVE82-1	8,3	0,0	4,2
E4	1,5	0,0	0,8
RVE851	1,0	2,5	1,8
E7	0,0	0,0	0,0
RVE854	0,0	0,0	0,0
E6	0,0	0,0	0,0
Média	1,8	0,8	

Outro aspecto a destacar foi a presença de colonização micorrízica para o isolado RVE 851 nos dois hospedeiros, apesar da sua menor afinidade, evidenciada nas Tabelas 8 e 9. Nos resultados dos ensaios dos itens 4.6. e 7.7.,

esse isolado, também apresentou alguma perpetuação micorrízica. É provável que, apesar da menor afinidade para os hospedeiros, esse isolado apresenta elevada adaptação ecológica, que o levaria a resistir as condições adversas.

Comparando os resultados da perpetuação ectomicorrízica em "plantlets" (Tabela 16) e em plântulas (Tabela 17) inoculadas *in vitro* em meio orgânico verifica-se que, eles se aproximaram. Isso revela que, provavelmente, os fatores envolvidos na redução ou eliminação da perpetuação de ectomicorrizas foram os mesmos para os ensaios nos itens 4.7. e 4.8., ou seja: antagonismo microbiano, resistência induzida nos hospedeiros e "stress" nutricional ao fungo simbiote e encharcamento do solo. Essas causas estão discutidas mais detalhadamente no item 4.7.. Alguns trabalhos têm mostrado o efeito negativo sobre colonização ectomicorrízica por *P. tinctorius* dos altos teores de açúcar, mesmo em hospedeiros altamente micotróficos como *Pinus* spp. e *Quercus* spp. (DIXON et alii, 1984; MARX et alii, 1984). Por outro lado, outros pesquisadores relataram sucesso na colonização ectomicorrízica por *P. tinctorius*, tanto em plântulas de espécies hospedeiras mais micotróficas (DIXON et alii, 1981b; MARX et alii, 1984), quanto em plântulas de espécies hospedeiras menos micotróficas como *Eucalyptus* spp. (CHILVERS et alii, 1986; GARBAYE et alii, 1988; VIEIRA, 1984), usando inóculo acompanhado com altos teores de açúcar.

Esses trabalhos deixaram evidências que, além da interferência do alto teor de açúcares no inóculo, existem outros fatores tão ou mais importantes, como agressividade do inóculo, material genético do hospedeiro, condições climáticas, nutrientes no substrato etc., os quais estão sempre em interação.

Comparando os resultados do primeiro ensaio (Tabela 17) com àqueles do segundo ensaio (Tabela 18) verificou-se que, os tratamentos E7 - *E. urophylla*, E4 - *E. grandis* e RVE 82-1 - *E. grandis* apresentaram desenvolvimento ectomicorrízico somente no segundo ensaio. Provavelmente, na avaliação desses tratamentos, no primeiro ensaio estava ocorrendo a presença de micorrizas em baixa porcentagem, as quais não foram detectadas pela visualização a olho nu.

Analisando os resultados da Tabela 18, em relação àqueles do item 4.7., onde em ambos se realizaram as avaliações 90 dias após o transplante para solo esterilizado, comprova-se maior colonização micorrízica nos primeiros. Isso aconteceu tanto na quantidade de micorrizas, quanto no número de tratamentos. Além de serem materiais genéticos diferentes, a principal causa de tais diferenças, provavelmente foi a desigualdade na qualidade do sistema radicular, que existiu entre "plantlets" e plântulas. Plântulas exibiram sistema radicular de melhor qualidade, com maior número de ramificações e com maior taxa de crescimento. Com isso, maior

número de ápices radiculares foram produzidos mais rapidamente e mais precocemente podiam ser colonizadas pelo fungo simbiote.

Tabela 18. Perpetuação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada) em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* inoculadas *in vitro* com *Pisolithus tinctorius* em meio de cultivo com carbono orgânico disponível e avaliação aos 90 dias após o transplante para solo esterilizado.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s		Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	
RVE82-1	25,0	6,2	15,6
E4	7,5	1,3	4,4
RVE851	17,5	1,2	9,3
E7	1,3	0,0	0,7
RVE854	0,0	0,0	0,0
E6	0,0	0,0	0,0
Média	8,6	1,5	

Apesar da baixa porcentagem de colonização verificada na avaliação aos 60 dias para o tratamento RVE 82-1 - *E. urophylla*, aos 90 dias houve perpetuação com 25% de coloni

zação micorrízica, um nível considerado razoável. Vários trabalhos, onde se usou inoculação de *P. tinctorius* em *Pinus* ou em *Quercus* foram relatados que, ao nível de 25% de colonização ectomicorrízica existiu algum efeito benéfico significativo para os hospedeiros (DAUGHTRIDGE et alii, 1986; EKWEBELAN & REID, MITCHELL et alii, 1984).

É possível também notar, mais nitidamente no segundo ensaio, que a eficiência para colonização micorrízica do isolado RVE 82-1 foi superior ao isolado E4. Em condições *in vitro*, situação inversa foi constatada. Isso mostra o maior poder de competição ou adaptação ecológica do isolado RVE 82-1.

Na testemunha dos dois ensaios, constituída de plântulas não inoculadas não se notou qualquer tipo de ectomicorriza.

Após 40-50 dias do transplante para solo esterilizado, a população dos fungos saprofíticos colonizadores do substrato deve ter caído rapidamente, em razão da exaustão da fonte de energia pelo consumo microbiano e pela lixiviação da água de irrigação. Esse fator, provavelmente favoreceu a perpetuação das micorrizas, que até então resistiram as condições adversas e foram observadas no segundo ensaio.

4.9. Perpatuação de ectomicorrizas em plântulas de *E. urophylla*, de *E. grandis* inoculadas em cultura axênica, em meio inorgânico e transplantadas para solo esterilizado.

Os resultados da avaliação aos 60 dias revelaram que, as micorrizas formadas *in vitro*, em meio inorgânico, se perpetuaram para todos os isolados fúngicos, depois do transplante para solo esterilizado. Confirmando ao verificado nos ensaios anteriores, *E. urophylla* mostrou-se significativamente mais susceptível, do que *E. grandis* e apresentaram médias de 21,7% e 15,0% de colonização micorrízica, respectivamente. Comportamento semelhante, também foi mostrado se se compara o desenvolvimento de cada isolado nas duas espécies hospedeiras. Para todos eles, *E. grandis* continuou mais resistente à infecção micorrízica. Diferenças significativas entre espécies hospedeiras de um mesmo gênero, a determinados isolados de *P. tinctorius* foi verificado por MARX et alii (1984) em *Pinus* spp., por DIXON et alii (1981b) e por MITCHELL et alii (1984) em *Quercus* spp..

As médias de cada isolado nas duas espécies hospedeiras indicaram que, os melhores foram RVE 82-1 e E4, que apresentaram 30,0% e 29,4% de colonização micorrízica, respectivamente, embora não diferissem estatisticamente dos isolados E6 e E7. Estes por sua vez não diferiram significativamente dos isolados RVE 854 e RVE 851.

Se se analisa o desenvolvimento micorrízico de cada isolado dentro de cada espécie hospedira verifica-se novamente, que os isolados RVE 82-1 e E4 foram os melhores com 36,3% de colonização em *E. urophylla* e 23, 8% e 22,5% de colonização em *E. grandis*, respectivamente. Alguns trabalhos têm relatado o sucesso no desenvolvimento ectomicorrízico entre *P. tinctorius* e *Eucalyptus* spp., em solo esterilizado, após a inoculação das plântulas *in vitro*, ou no próprio solo (GARBAYE et alii, 1988; HEINRICH et alii, 1988; MALAJCZUK et alii, 1982; VIEIRA & PERES, 1988a; VIERIA & PERES, 1988b). No entanto sob outras condições, pesquisadores não conseguiram induzir o desenvolvimento ectomicorrízico em *Eucalyptus* sp (BACCHI, 1988; MALAJCZUK et alii, 1975; YOKOMIZO & KRUGNER, 1983/85b).

Tabela 19. Perpetuação de micorrizas. (% de superfície radicular colonizada)* em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* inoculadas *in vitro* com *Pisolithus tinctorius*, em meio de cultivo sem carbono orgânico disponível e avaliação aos 60 dias após o transplante para solo esterilizado.

Isolados de <i>P. tinctorius</i>	H o s p e d e i r o s		Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	
RVE82-1	36,3	23,8	30,0 a
E4	36,3	22,5	29,4 a
E6	22,5	15,0	18,8 ab
E7	21,3	17,5	19,4 ab
RVE854	10,0	5,0	7,5 b
RVE851	10,0	6,3	8,1 b
Média	22,7 a	15,0 b	

C.V. (%) 29,6

* Médias de hospedeiros e médias de isolados seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si (Tukey-5%).

Aos 90 dias, em alguns tratamentos ocorreu aumento na colonização micorrízica e em outros permaneceu em torno do mesmo valor (Tabelas 19 e 20). Também, a ordem no

comportamento de alguns isolados se modificou, com E6 e E7 passando para uma classe intermediária, RVE 854 e RVE 851 para uma classe inferior e RVE 82-1 e E4 permanecendo como os melhores. A porcentagem de colonização micorrízica desenvolvida para os quatro primeiros isolados se estabilizou ou reduziu. Isso não significou que, o desenvolvimento ectomicorrízico tenha se estabilizado ou reduzido. É que a velocidade do crescimento do sistema radicular foi superior ao desenvolvimento micorrízico. Nas condições em que foram conduzidos os ensaios, esses isolados apresentaram baixa afinidade para os hospedeiros, notadamente RVE 854 e RVE 851. Esses dois isolados foram os que, apresentaram o pior comportamento, com a mais baixa colonização micorrízica. Os resultados evidenciam a necessidade de seleção de isolados de *P. tinctorius* para uso em inoculações.

Para todos os isolados, nos dois ensaios, a colonização micorrízica foi sempre, estatisticamente superior em *E. urophylla*. Esse comportamento confirmou os resultados **in vitro** do ensaio 3.4., em que *E. grandis* mostrou ser mais resistente à infecção ectomicorrízica por *P. tinctorius*. Vários trabalhos relataram a especialização fisiológica de isolados de *P. tinctorius*, com a ocorrência de ecotipos mais adaptados para espécies hospedeiras. Em *Eucalyptus* essa característica fisiológica foi constatada por GARBAYE **et alii** (1988), MALAJCZUK & HARTINEY (1986); VIEIRA (1984) e VIEIRA & PERES (1988a), em *Pinus* foi constatada por MARX **et alii**

(1984), MOLINA (1979b) e em *Quercus* por DIXON et alii (1981b), MITCHELL et alii (1984).

Comparando se as médias do desenvolvimento dos isolados em cada espécie hospedeira nos dois ensaios, observa-se que, *E. urophylla* foi significativamente mais susceptível, notadamente no segundo ensaio, onde apresentou cerca do dobro de colonização micorrízica (32,7%) em relação a *E. grandis* (15,6%). Mas no tratamento RVE 82-1 - *E. urophylla*, a colonização micorrízica chegou a 63,7%. GRAND & HARVEY (1982) afirmaram que, colonização micorrízica entre 75 e 100% do sistema radicular é considerada excelente, entre 59-74% é considerada boa, entre 24-49% é considerada moderada e entre 1-24% é considerada pobre. No entanto HARLEY & SMITH (1982) sustentaram que, a intensidade de colonização micorrízica necessária para induzir resposta benéfica, significante depende da espécie hospedeira. DIXON et alii (1985), DIXON et alii (1984); MARX et alii (1984) e MARX & KENNEY (1982) relataram que, plântulas de *Pinus* e *Quercus* só eram beneficiadas, quando no mínimo 50% e 30-40% do sistema radicular estivesse com colonização ectomicorrízica, respectivamente. Mas, EKWEBELAM & REID (1983) observaram que, plântulas de *Pinus contorta* apresentaram resposta benéfica, significativa com 7,04% de colonização micorrízica com *P. tinctorius*. E também DAUGHTRIDGE et alii (1986) mostraram que, plântulas de carvalho com menos de 1,5% de colonização ectomicorrízica por *P. tinctorius* manifestou estímulo significativo, no crescimento. Para

Eucalyptus ainda não existem estudos, que tratam do limiar ec tomicorrízico, que induz ganhos significativos para o hospedeiro.

Tabela 20. Perpetuação de micorrizas (% de superfície radicular colonizada)* em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* inoculads in vitro com *Pisolithus tinctorius* em meio de cultivo sem carbono orgânico disponível e avaliação aos 90 dias após o transplante para solo esterilizado.

Isolados de	H o s p e d e i r o s		Média
	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	
<i>P. tinctorius</i>			
RVE82-1	67,7	38,8	51,3 a
E4	61,3	27,5	39,4 ab
E6	22,5	11,3	16,9 bc
E7	25,0	12,1	18,6 bc
RVE854	11,2	5,0	8,1 c
RVE851	12,5	8,8	10,3 c
Média	32,7 a	15,6 b	

C.V. (%) 29,8

*Médias de hospedeiros e médias de isolados seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si (Tukey-5%).

Comparando os resultados das Tabelas 19 e 20 com aqueles das Tabelas 8 e 9 do item 4.3. verifica-se que, nos ensaios em solo esterilizado, a porcentagem de colonização ectomicorrízica foi reduzida. Essa redução era esperada, pois em condições não controladas, o efeito de vários fatores ambientais, microbianos e do solo se interage e afeta o desenvolvimento ectomicorrízico. Mas mesmo assim, a técnica de inoculação *in vitro*, na ausência de carbono orgânico disponível mostrou-se eficiente, uma vez que houve continuação de bom desenvolvimento micorrízico nas plântulas, após a transferência para solo, simulando condições de viveiro. MALAJCZUK & HARTNEY (1986) e MARX & KENNEY (1982) relataram que, as inoculações efetuadas *in vitro* foram superiores aos métodos correntes, usando inóculo micelial misturado ao substrato de plantio, porque existe maior possibilidade de sucesso na perpetuação micorrízica, após a transferência do hospedeiro para viveiro. Segundo os autores, a razão do êxito se deve à ausência de competição e/ou antagonismo microbiano do solo, na formação micorrízica *in vitro*. Além disso, eles citam que, o inóculo micelial introduzido no solo tem falhado devido aos danos sofridos por manipulações com trituração, lavagem, secamento e incorporação ao solo e devido à adverdidade de temperatura e umidade do solo entre a inoculação e a infecção das raízes.

Tanto as micorrizas desenvolvidas no primeiro ensaio, quanto às desenvolvidas no segundo ensaio se

concentraram nos 2/3 superiores do sistema radicular dos hospedeiros. A maior colonização foi registrada no terço superior, nos ápices radiculares de terceira ordem em diante. No terço inferior do sistema radicular, praticamente não existiu infecção micorrízica e nas ramificações mais longas, que corresponderam àsquelas de menor ordem, não se observou nenhuma ectomicorriza. CHILVERS & GUST (1982a) e CHILVERS & GUST (1982b) apontaram que, ectomicorrizas formadas por *P. tinctorius* em *E. st. johnii* ocorreram quase que, totalmente nas raízes de terceira ordem em diante, localizadas principalmente na metade superior do sistema radicular. De acordo com os autores, as raízes primárias e muitas secundárias escaparam à colonização, em razão do rápido crescimento, superior ao do fungo. Segundo MARKS & FOSTER (1973), raízes durante o período de alta taxa de crescimento escapam à infecção ectomicorrízica.

Dois outros fatores, provavelmente teriam influenciado na colonização micorrízica nos dois ensaios. O primeiro relaciona-se ao sombreamento, que as plântulas foram submetidas logo após o transplante para solo esterilizado. As plântulas, durante o período de incubação *in vitro* estavam sob baixa intensidade luminosa e apresentavam sintomas de estiolamento. Quando foram transplantadas, o fungo micorrízico foi colocado em condições hostís e se tivesse altas quantidades de fotossintetizados disponíveis, possuiria um arranque inicial melhor e certamente teria apresentado maior

colonização micorrízica. ASHTON (1976) mostrou que, o aumento da colonização ectomicorrízica em *E. regnans* acompanhou o aumento da intensidade luminosa.

Outro fator diz respeito à arquitetura do sistema radicular de *E. grandis* e de *E. urophylla*. As raízes de *E. grandis*, no solo previamente esterilizado apresentaram marcadamente, crescimento no sentido vertical, se aprofundando mais no solo, em relação às raízes de *E. urophylla*. Essa é uma característica, que dificulta o contato fungo-raiz e provavelmente contribuiu para a menor colonização em *E. grandis*. RUEHLE (1983) relatou que, a orientação para crescimento na vertical de raízes laterais de *Pinus taeda* reduziu significativamente, a expansão de ectomicorrizas formadas por *P. tinctorius*, no sistema radicular. De acordo com o autor, esta é uma propriedade indesejável para um sistema radicular, quando se pensa em ectomicorrizas.

Comparando os resultados nas Tabelas 19 e 20, que mostraram alta colonização micorrízica, com aqueles nas Tabelas 17 e 18, que mostraram baixa colonização fica nitidamente evidenciado, que a presença de açúcares reduziu drasticamente a perpetuação ectomicorrízica nas plântulas de *E. urophylla* e *E. grandis*. Vários trabalhos têm revelado o sucesso da inoculação de hospedeiros em solo esterilizado ou não, com inóculo micelial de fungos ectomicorrízicos produzidos em meio orgânico (BECKJORD & MCINTOSH, 1984; DIXON et alii,

1984; MARX et alii, 1975; YOKOMIZO & KRUGNER 1983/85b). Mas o inóculo foi lavado em água para retirada do excesso de açúcares. Alguns pesquisadores observaram que, essa técnica era inadequada para inoculação de *Eucalyptus* sp. (YOKOMIZO & KRUGNER, 1983/85b; BACCHI, 1988), mas VIEIRA & PERES (1988a) e VIEIRA & PERES (1988b) obtiveram sucesso usando-a em espécies de hospedeiro do mesmo gênero.

A testemunha constituída de plântulas não inoculadas, não apresentou qualquer tipo de colonização ectomicorrízica.

As plântulas em todos os tratamentos não manifestaram sintomas visuais de deficiência nutricional.

Outro aspecto, que se destacou nas Tabelas 19 e 20 foi o alto coeficiente de variação, 29,6% e 29,8%, encontrados na análise estatística dos resultados. Esse problema resultou da grande desuniformidade de colonização verificado entre as repetições de um mesmo tratamento. Essa é uma questão muito comum encontrada em trabalhos de pesquisa com ectomicorrizas (MALAJCZUK & HARTNEY, 1986; MARX et alii, 1984; MOLINA, 1979b; PARK, 1971), Como consequencia ocorreu maior diferença mínima significativa, tornando mais difícil encontrar diferença significativa entre os tratamentos.

Para os isolados E4 e mais destacadamente para o RVE 82-1, que apresentaram maior agressividade observou-se

a presença de grande quantidade de cordões miceliais colonizando o solo na região das raízes micorrízicas. Essa característica foi marcadamente superior em *E. urophylla*. Para os demais isolados, E7, E6, RVE 851 e RVE 854 registrou-se apenas a ocorrência de poucos cordões miceliais, que possuíam menores extensão, diâmetro e vigor. A capacidade para produzir cordões miceliais, sob várias condições é uma característica altamente desejável, a ser considerada para seleção de isolados de fungos ectomicorrízicos (HARLEY & SMITH, 1982), pois significa adaptabilidade ecológica (TRAPPE, 1977). Segundo BOWEN (1973), MARX & KENNEY (1982) e PICHÉ & FORTIN (1982) esse caráter está ligado à atividade fisiológica das ectomicorrizas em relação à absorção de minerais, especialmente fosfato e à translocação de compostos carbônicos. De acordo com esses pesquisadores, esse traço apresenta grande variação entre fungos ectomicorrízicos. HARLEY & SMITH (1982) citam que, em *Pinus radiata* a extensão dos cordões miceliais no solo estava diretamente relacionada com a rapidez de absorção de fosfato e sua translocação até as acículas. Essa expansão no solo chegou a 20 cm de distância, além do ponto de inoculação de *P. tinctorius* em *P. taeda* (RUEHLE, 1983). CHILVERS & GUST (1982b), CHILVERS & PRYOR (1965) e FINLAY & READ (1986) relataram que, a produção de cordões miceliais conferem grande vantagem competitiva para fungos ectomicorrízicos, aumentando o potencial de inóculo secundário e o potencial de sobrevivência, tornando-os colonizadores mais vigorosos das

raízes. CHILVERS & GUST (1982a) constataram grande quantidade de infecções secundárias em raízes de *E. st. johnii* induzidas por cordões hifais ou rizomorfias originadas de ectomicorrizas vizinhas. Segundo BOWEN & THEODOROU (1973), outro aspecto funcional da colonização do solo por cordões miceliais inclui a ligação de partículas do solo, melhorando assim a sua estrutura e as propriedades associadas.

Quanto ao aspecto qualitativo, secções observadas ao microscópio ótico revelaram que, as micorrizas desenvolvidas em solo esterilizado, nos dois ensaios possuíam rede-de-Hartig com frequência, espessamento e profundidade semelhante ao registrado nos ensaios dois e três do item 4.3.. Essas características foram mais pronunciadas em *E. urophylla*, do que em *E. grandis*, principalmente envolvendo os isolados RVE 82-1 e E4. O manto apresentou-se com boa espessura, mas nitidamente inferior à daquele formado em micorrizas desenvolvidas em meio orgânico e com hifas bem adensadas. Embora não tão nitidamente como em meio orgânico, foi possível detectar que, a espessura do manto expressou-se ligeiramente menor em *E. grandis*.

A importância do manto na fisiologia das ectomicorrizas foi tratada por vários pesquisadores. BOWEN (1973) relatou que, as características de absorção em muitos casos, não são àqueles das raízes, mas parcial ou totalmente àquelas do manto do fungo simbiote, dependendo da sua espessura e compactação. De acordo com HARLEY & MECREADY (1950), a ab-

sorção de fosfato através do manto pode ser de cinco a oito vezes a absorção da raiz mais a rede-de-Hartig.

Bowen & Theodorou* citados BOWEN (1973) demonstraram que a absorção de fosfato estava diretamente relacionada com a espessura do manto.

Apesar da baixa afinidade dos isolados RVE 854 e RVE 851 para os hospedeiros utilizados nos ensaios, eles foram isolados de basidiocarpos em plantações de eucalipto. Isso significa que, esses isolados possuem maior afinidade para as espécies de *Eucalyptus* sp. e *E. tinctorius*, respectivamente, das quais foram coletados os basidiocarpos, ou eles possuem adaptabilidades ecológicas superiores, que os permitem sobreviver em simbiose.

Mais estudos ainda necessitam ser desenvolvidos abrangendo maior número de isolados de *P. tinctorius* originados de diferentes espécies de *Eucalyptus* e sítios e testá-los em várias espécies de hospedeiro, com a finalidade de selecionar as melhores combinações. Estudos futuros devem ser conduzidos para quantificar os possíveis efeitos benéficos da associação ectomicorrízica *in vitro* e em solo esterilizado. Posteriormente verificar a habilidade dos isolados fúngicos selecionados, para infectar e promover o crescimento de hospedeiros em condições de solo de viveiro e de campo definiti-

*BOWEN, G.D. & THEODOROU, C. Studies on phosphate uptake by mycorrhizas. Proc. Int. Union. Forest Res. Organ. 14 th, 1967. vol. 5, pg. 116.

vo. Necessário se torna conduzir estudos para conhecer e quantificar a influência de fatores externos na simbiose, como: substratos, nutrientes; além da necessidade de conhecer melhor a influência de fatores internos constitutivos e indutivos, dos hospedeiros como; fenôis e outras barreiras químicas e físicas. Outro trabalho, que se faz necessário será o desenvolvimento de técnicas, que tornem a inoculação das "plantlets" mais rápida. Provavelmente isso pode ser feito substituindo o substrato agarizado no meio de enraizamento por outros, que permitem o desenvolvimento radicular das "plantlets" e ectomicorrizas, concomitantemente.

Figura 4. Ectomicorrizas em plântulas de *E. urophylla* inoculada *in vitro* com o isolado RVE 82-1 de *Pisolithus tinctorius*, 90 dias após o transplante para solo esterilizado.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que:

- a. *E. urophylla* foi mais susceptível do que *E. grandis* à colonização ectomicorrízica pelos seis isolados de *P. tinctorius* testados.
- b. a presença de carbono orgânico disponível no meio de síntese mascarou a agressividade dos isolados fúngicos, nivelando-a.
- c. em cultura axênica sem carbono orgânico disponível, os isolados E4, RVE 82-1 foram aqueles, que apresentaram maiores colonizações ectomicorrízicas e os isolados RVE 851 e RVE 854 foram os piores.
- d. em "plantlets" de *E. urophylla*, de *E. grandis* e do híbrido e em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* micorrizadas em substrato com carbono orgânico disponível e, transplantadas para solo previamente esterilizado, somente para os isolados RVE 82-1, E4, RVE 851 e E7 houve perpetuação das ectomicorrizas, mas em muito baixa intensidade.

e. em plântulas de *E. urophylla* e de *E. grandis* micorrizadas em substrato sem carbono orgânico e transplantadas para solo previamente esterilizado, a perpetuação ectomicorrízica o correu em alta intensidade para os isolados RVE 82-1 e E4, em baixa intensidade para os isolados RVE 854 e RVE 851 e num nível intermediário para os isolados E7 e E6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, I.J. & HOGBERG, P. Ectomycorrhizas of tropical angiospermous trees. *New Phytologist*, 102: 541-549, 1986.
- ALVAREZ, I.F. & TRAPPE, J.M. Effects of application rate and cold soaking pretreatment of *Pisolithus* spores on effectiveness as nursery inoculum on western conifers. *Canadian Journal Forest Research*, 13: 533-537, 1983.
- ANTIBUS, R.K.; CROXIDALE, J.G.; MILLER, O.K.; LINKINS, A.D.. Ectomycorrhizal fungi of *Salix rotundifolia*. III. resynthesized mycorrhizal complexes and their surface phosphatase activities. *Canadian Journal of Botany*, 59: 2458-2465, 1981.
- ASTON, D.H. Studies on the mycorrhizal of *Eucalyptus regnans*. F. Muell. *Aust. J. Botany*, 24: 723-741, 1976.
- AUER, C.G.; GONÇALVES, A.N.; KRUGNER, T.L. Indução da associação micorrízica entre *Pisolithus tinctorius* e *Eucalyptus urophylla* através de cultura de tecido. In: I REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS. Lavras, 1985. Anais. p. 60.

- BACCHI, L.M.A. Desenvolvimento ectomicorrízico em mudas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* inoculadas com *Pisotithus tinctorius* em viveiro comercial. Piracicaba, 1988. 81p (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BARROS, H.F.; BRANDI, R.M; REIS, M.S. Micorriza em eucalipto. *Revista Árvore*, Viçosa, 2(2): 130-140, 1978.
- BECKJORD, P.R. & MCINTOSHI, M.S. Growth and fungal persistence by *Quercus rubra* inoculated with ectomycorrhizal fungi and planted on a clear-cutting and strip mine. *Canadian Journal of Botany*, 62: 1571-1574, 1984.
- BENECKE, U & GOBL, F. The influence of different mycorrhizae on growth, mutation and gas-exchange of *Pinus mugo* seedlings. *Plant and Soil*, 40: 21-32, 1974.
- BOWEN, G.D. Mineral nutrition of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. *Ectomycorrhizae - their ecology and physiology*. Madison, Wisconsin, 1973. p. 151-205.
- BOWEN, G.D. & THEODOROU, C. Growth of ectomycorrhizal fungi around seeds and roots. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. *Ectomycorrhizae - their ecology and physiology*. Madison, 1973. p.105-150.

BRYAN, P.W.; HEMMING, H.G.; MCGOWAN, J.C. Origin of a toxicity to mycorrhiza in wareham heath. *Nature*, 155: 637, 1945.

CHILVERS, G.A. Host range of some eucalypt micorrhizal fungi. *Australian Journal of Botany*, 21: 103-11, 1973.

CHILVERS, G.A.; DOUGLASS, P.A.; LAPEYRIE, F.F. A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. *New Phytologist*, 103: 397-402, 1986.

CHILVERS, G.A. & GUST, L.W. Comparisons between the growth rates of mycorrhizas, uninfected roots and a mycorrhizal fungus of *Eucalyptus* *st. johnii* R.T. BAK. *New Phytologist*, 91: 453-466, 1982 a.

CHILVERS, G.A. & GUST, L.W. The development of mycorrhizal populations on pot-grown seedlings of *Eucalyptus* *st. johnii* R.T. BAK. *New Phytologist*, 90: 677-699, 1982 b.

CHILVERS, G.A. & PRYOR, L. D.. The structure of eucalypt mycorrhizas. *Australian Journal of Botany*, 13: 245-259. 1965.

DALPÉ, Y. Axenic synthesis of ericoid mycorrhiza in *Vaccinium angustifolium* AIT. by *Oidiodendron* species. *New Phytologist*, 103: 391-396, 1986.

- DAUGHTRIDGE, A.T.; PALLARDY, S.G.; GARRETT, H.G.; SANDER, I. L. Growth analysis of mycorrhizal and non mycorrhizal black oak (*Quercus velutina* ALM) seedlings. *New Phytologist*, 103: 473-480, 1986.
- DELL, B. & WALLACE, I.M. Surface root system of *Eucalyptus marginata* Sm.: anatomy of nonmycorrhizal. *Australian Journal of Botany*, 29: 565-577, 1981.
- DIXON, R.K.; BEHRNS, G.T.; GARRETT, H.E.; COX, G.S.; SANDER, I.L. Synthesis of ectomycorrhizae on container-grown oak seedlings. *Southern Journal of Applied Forestry*, 9(2): 95-99, 1985.
- DIXON, R.K.; GARRETT, H.E.; COX, G.S. Container-and nursery-grown and ectomycorrhizal development following outplanting on an Ozark clear-cut. *Canadian Journal Forest Research*, 11: 492-496, 1981 a.
- DIXON, R.K.; GARRETT, H.E.; COX, G.S.; MARX, D.H.; SANDER, I. L. Inoculation of three *Quercus* species with eleven isolates of ectomycorrhizal fungi. I. inoculation success and seedling growth relationships. *Forest Science*, 30(2): 364-372, 1984.

DIXON, R.K.; WRIGHT, G.M.; GARRETT, H.E.; COX, G.S.

Container-and nursery-grown black oak seedlings inoculated with *Pisolithus tinctorius*: growth and ectomycorrhizal development during seedling production period. *Canadian Journal Forest Research*, 11: 487-491, 1981 b.

DUDDRIDGE, 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*, 103: 457-464, 1986 a.

DUDDRIDGE, J.A. The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. IV. Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevillei* (KLOTZSCH) SING. and a number of ectomycorrhizal hosts in vitro in the presence of exogenous carbohydrate. *New Phytologist*, 103: 465-471, 1986b.

EKWEBELAM, S.A. & REID, C.P.P. Effect of light, nitrogen fertilization, and mycorrhizal fung on growth and photosynthesis os lodgepole pine seedlings. *Canadian Journal Forest Research*, 13: 1099-1106, 1983

- FINLAY, R.D. & READ, D.J. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants I. Translocation of ^{14}C -labelled carbon between plants interconnected by a common mycelium. *New Phytologist*, 103: 143-156, 1986.
- FORTIN, J.A.; PICHÉ, Y.; LACONDE, M. Technique for the observation of early morphological changes during ectomycorrhiza formation. *Canadian Journal of Botany*, 58: 361-365, 1980.
- GARBAYE, J.; DELWAULLE, J.C.; DIANGANA, D. Growth response of eucalyptus in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. *Forest Ecology and Management*, 24: 151-157, 1988.
- GODBOUT, C. & FORTIN, J.A. Synthesized ectomycorrhizae of aspen: fungal genus level of structural characterization. *Canadian Journal of Botany*, 63: 252-262, 1985.
- GONÇALVES, A.N. The growth and developmental physiology of *Eucalyptus* in cell and tissue culture systems. Ohio, 1975. 210 p. (M.S. - Ohio State University).
- GONÇALVES, A.N. Reversão a juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE "in vitro". Piracicaba, 1982. 97 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- GRAND, L.F. Distribution, plant associates and variation in of *Pisolithus tinctorius* in the United States. *Mycologia*, 68: 672-678, 1976.
- GRAND, L.F. & HARVEY, A.E. Quantitative measurement of ectomycorrhizae on plants roots. In: SCHENCK, N.C. Methods and principles of mycorrhizal research. St. Paul, Minnesota, 1982. p. 157-165.
- GRENVILLE, D.J.; PETERSON, R.L.; ASHFORD, A.E. Synthesis in growth pouches of mycorrhizae between *Eucalyptus pilularis* and several strains of *Pisolithus tinctorius*. *Australian Journal of Botany*, 34: 95-102, 1986.
- HACSKAYLO, E. Pure culture synthesis on pine mycorrhiza in terra-lite *Mycologia*, 45: 971-975, 1953.
- HARLEY, J.L. & MCREADY, C.C. Uptake of phosphate by excised mycorrhizal roots of beech. *New Phytologist*, 49: 388, 1950.
- HARLEY, J.L. & SMITH, S.E. *Micorrizal symbiosis*. London, Academic Press, 1982. 483 p.

HEINRICH, P.A.; MULLIGAN, D.R.; PATRICK, J.W. The effect of ectomycorrhizas on the phosphorus and dry weight acquisition of *Eucalyptus* seedlings. *Plant and Soil* 109: 147-149, 1988.

HEINRICH, P.A. & PATRICK, J.W. Phosphorus acquisition in the soil-root system of *Eucalyptus pilularis* Smith seedlings. II the effect of ectomycorrhizas on seedling phosphorus and dry weight acquisition. *Australian Journal Botanical*, 34: 445-454, 1986.

HILE, N. & HENNEN, J.L. In vitro culture of *Pisolithus tinctorius* mycelium. *Mycologia*, 61: 195-198, 1969.

HORAN, D.P.; CHILVERS, G.A.; LAPEYRIE, F.F. Time sequence of the infection process in eucalypt ectomycorrhizas. *New Phytologist*, 109: 451-458, 1988.

HUNG, L.L. & CHIEN, C.Y. Two new mycorrhizal synthesis: *Pisolithus tinctorius* and *Suillus bovinus* with Taiwan red pine. *Mycologia*, 71: 202-206, 1979.

- IMAÑA, J. & PRADO JR., A.C. Efeito do fungo *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker no desenvolvimento inicial de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, Manaus, 1978. Silvicultura, São Paulo, 14: 347-349, 1979. Edição Especial.
- KOPE, H.H. & WARCUP, J.H. Synthesized ectomycorrhizal associations of some australian herbs and shrubs. *New Phytologist*, 104: 591-599, 1986.
- KOTTKE, I. & OBERWINKLER, F. Root-fungus interaction observed on initial stages mantle formation and Hartig net establishment in mycorrhizas of *Amanita muscaria* on *Picea abies* in pure culture. *Canadian Journal of Botany*, 64: 2348-2354, 1986.
- KRISHNA, K.R.; SHETTY, K.G.; DART, P.J.; ANDREWS, D.J. Genotype dependent variation in mycorrhizal colonization and response to inoculation of pearl millet. *Plant and Soil*, 86: 113-123, 1983.
- KRUGNER, T.L. Ectomicorrizas: Caracterização, produção de inóculo e inoculação. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, Lavras, 1985, p. 138-141.
- LAMPKY, S.A. & LAMPKY, J.R. *Pisolithus* in central Florida. *Mycologia*, 65: 1211-1213, 1973.

LAPEYRIE, F.F. & BRUCHET, G. Some factors influencing viability of ectomycorrhizal fungal inoculum. *New Phytologist*, 100: 585-593, 1985.

LAPEYRIE, F.F. & CHILVERS, G.A. An endomycorrhiza-ectomycorrhiza succession associated with enhanced growth of *Eucalyptus dumosa* seedlings planted in a calcareous soil. *New Phytologist*, 100: 93-104, 1985.

LING-LEE; CHILVERS, M.; ASHFORD, A.E. A histochemical study of phenolic materials in mycorrhizal and uninfected roots of *Eucalyptus fastigata* Deane and Maiden. *New Phytologist*, 78: 313-328, 1977.

MALAJCZUK, N.; DELL, B.; BOUGHER, N.L. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus* III. Superficial ectomycorrhizas initiated by *Hysterangium* and *Cortinarius* species. *New Phytologist*, 105(3): 421-428, 1987.

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*, 16: 199-206, 1986.

MALAJCZUK, N.; MCCOMB, A.J.; LONERAGAN, J.F. Phosphorus uptake and growth of mycorrhizal and uninfected seedlings of *Eucalyptus calophylla* R.Rr. *Aust. J. of. Botany*, 23: 231-238, 1975.

MALAJCZUK, N.; MOLINA, R.; TRAPPE, J.M. Ectomycorrhizal formation in *Eucalyptus*. I. Pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with *Pinus radiata*. *New Phytologist*, 91: 467-482, 1982.

MALAJCZUK, N.; MOLINA, R.; TRAPPE, J.M. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*. II. the ultrastructure compatible and incompatible mycorrhizal fungi and associated roots. *New Phytologist*, 96: 43-53, 1984.

MARKS, G.C. & FOSTER, R.C. Structure, morphogenesis, and ultrastructure of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. *Ectomycorrhizae - their ecology and physiology*. Madison, 1973. p. 2-42.

MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. 1. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, Saint Paul, 59: 153-163, 1969.

- MARX, D.H. Growth of ectomycorrhizal and nonmycorrhizal short leaf pine seedlings in soil with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 63(1): 18-23, 1973.
- MARX, D.H. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Microbiology*, 23(3): 217-223, 1977.
- MARX, D.H. Role of mycorrhizae in forestation of surface mines. In: PROC. TREES FOR RECLAMATION, Lexington, Kentucky, 1980a. p. 109-116.
- MARX, D.H. Ectomycorrhizal fungus inoculations: a tool for improving forestation practices. In: MIKOLA, P. TROPICAL MYCORRHIZA RESEARCH. Oxford, London. 1980 b. 270 p.
- MARX, D.H. Variability in ectomycorrhizal development and growth among isolates of *Pisolithus tinctorius* as affected by source, age, and reisolation. *Can. J. Res.*, 11: 168-174, 1981.
- MARX, D.H. & BRIAN, W.C. Pure culture synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on different conifer hosts. *Canadian Journal of Botany*, 48: 639-643, 1970.

- MARX, D.H. & BRYAN, W.C. The significance of mycorrhizae trees. *Australian Journal of Botany*, 22: 107-117, 1974.
- MARX, D.H. & BRYAN, W.C. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. *Forest Science*, 21(3): 245-254, 1975.
- MARX, D.H.; BRYAN, W.C.; CORDELL, C.E. Growth and ectomycorrhizal development of pine seedlings in nursery soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. *Forest Science*, 22(1): 91-100, 1976.
- MARX, D.H.; CORDELL, C.E.; KENNEY, D.S.; MEXAL, J.G.; ARTMAN, 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 seedlings. *Forest Science*, monograph 25. p. 1-101, 1984.
- 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. & ROSS, E.W. Aseptic synthesis of ectomycorrhizae on *Pinus taeda* by basidiospores of *Thelephora terrestris*. *Canadian Journal of Botany*, 48: 197-198, 1970.

- MASSICOTTE, H.B.; PETERSON, R.L.; ASHFORD, A.E. Ontogeny of *Eucalyptus pilularis* - *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. I. light microscopy and scanning electron microscopy. Canadian Journal of Botany, 65: 1927-1939, 1987.
- MEYER, F.H. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae - their ecology and physiology. Madison, 1973. p. 79-105.
- MEYER, F.H. Physiology of mycorrhiza. Ann. Rev. Plant Physiology, 25: 567-586, 1974.
- MIKOLA, P. Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practice. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae - their ecology and physiology. Madison, 1973. p. 383-416.
- MITCHELL, R.J.; COX, G.S.; DIXON, R.K.; GARRETT, H.E.; SANDER, I.C. Inoculation of three *Quercus* species with eleven isolates of ectomycorrhizal fungi. II. foliar nutrient content and isolate effectiveness. Forest Science, 30(3): 563-572, 1984.
- MOLINA, R. Pure culture synthesis and host especificity of red alder mycorrhizae. Canadian Journal of Botany, 57: 1223 - 1228, 1979 a.

- MOLINA, R. Ectomycorrhizal inoculation of containerized douglas-fir and lodgepole pine seedlings with six isolates of *Pisolithus tinctorius*. *Forest Science*, 25(4): 585-592, 1979 b.
- MOLINA, R. Ectomycorrhizal specificity in the genus *Alnus*. *Canadian Journal of Botany*, 59: 325-334, 1981.
- MOLINA, R. & PALMER, J.G. Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fung. In: SCHENCK, N.C. *Methods and principles of mycorrhizal research*. St. Paul, 1982, p. 115-129.
- MULLETTE, K.J. Studies of eucalypt micorrhizas. I. a method of mycorrhiza induction in *Eucalyptus gumnifera* (Gaertn). Hochr. by *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch. *Australian Journal of Botany*, 24: 193-200, 1976.
- MULLIGAN, D.R. & PATRICK, J.W. Phosphorus and carbon economies of ectomycorrhizal seedlings of *Eucalyptus pilularis* Smith. *Australian Journal Plant Physiology*, 12: 669-79, 1985.
- NYLUND, J.E. & UNESTAM, T. Structure and physiology of ectomycorrhizae. I. the process of mycorrhiza formation in norway spruce in vitro. *New Phytologist*, 91: 63-79, 1982.

- PALM, M.E. & STEWART, E.L. In vitro synthesis of mycorrhizae between presumed specific and nonspecific *Pinus* + *Suillus* combinations. *Mycologia*, 76(4): 579-600, 1984.
- PARK, J.Y. Inoculation of rooted basswood cuttings with ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany*, 49: 1291-1292, 1971.
- PICHÉ, Y. & FORTIN, J.A. Development of mycorrhizae, extramatrical mycelium and sclerotia on *Pinus strobus* seedlings. *New Phytologist*, 91: 211-220, 1982.
- PICHÉ, Y.; FORTIN, J.A.; LA FONTAINE, J. Cytoplasmic phenols and polysaccharide in ectomycorrhizal and nonmycorrhizal short roots pine. *New Phytologist*, 88: 695-703, 1981.
- POISSONNIER, M. Mycorrhization "in vitro" de clones D' *Eucalyptus*. In: ANNALES DE RECHERCHES SYLVICOLES. Association Forêt Cellulose. Paris. 1986. p. 81-93.
- PONS, S.; MUDGE, K.W.; NEGM, F.B. Effect of manitol on the in vitro growth, temperature optimum, and subsequent ectomycorrhizal infectivity of *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Botany*, 64: 1812-1816, 1986.

- PRYOR, L.D. Chlorosis and lack of vigour in seedlings of Renatherous species of *Eucalyptus* caused by lack of mycorrhiza. In: PROCEEDINGS OF THE LINNEAN SOCIETY OF NEW SOUTH WALES; Vol LXXXI, Parte 1, julho, 1956. p. 91-97.
- REYNOIRD, J.P. & STRULLU, D.G. Obtention d'ectomycorrhizes chez des plants d'*Eucalyptus* cultivés in vitro. *Biologie et Forêt*, 13(1): 33-38, 1986.
- RIDGE, E.H. & THEODOROU, C. The effect of soil fungination on microbiol recolonization and mycorrhizal infections. *Soil. Biol. Biochem.*, 4: 295, 1972.
- RIFFLE, J.W. & MARONEK, D.M. Ectomycorrhizal inoculation procedures for greenhouse and nursery studies. In: SCHENK, N.S. *Methods and principles of mycorrhizal research*. St. Paul, 1982. p. 147-155.
- RONALD, P. & SODERHALL, K. Phenylalanine ammonia lyase and peroxidase activity in mycorrhizal and nonmycorrhizal short roots of scots pine, *Pinus sylvestris* L. *New. Phytologist*, 101: 487-494, 1985.
- ROTH, P.S. Indução de poliploidia em clones de *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE. Piracicaba, 1984. 79 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- RUEHLE, J.L. The relationship between lateral-root development and spread of *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae after planting of container-grown loblolly pine seedlings. *Forest Science*, 29(3): 519-526, 1983.
- SAMSON, J. & FORTIN, J.A. Ectomycorrhizal fungi of *Larix laricina* and the interspecific and intraspecific variation in response to temperature. *Canadian Journal of Botany*, 64: 3020-3028, 1986.
- SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 1(3): 231-233, 1975.
- 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, 1985. *Anais*. p. 59.
- STRULLU, D.G.; GRELLIER, B.; MARCINIAK, D.; LETOUZÉ, R. Micropropagation of chestnut and conditions of mycorrhizal synthesis in vitro. *New Phytologist*, 102: 95-101, 1986.

- SUGGS, E.G. & GRAND, L.F. Formation of mycorrhizae in monoaxenic culture by pine (*Pinus serotina*). *Canadian Journal of Botany*, 50: 1003-1007, 1972.
- SUMMERBELL, R.C. The inhibitory effect of *Trichoderma* species and other soil microfungi on formation of mycorrhiza by *Laccaria bicolor* in vitro. *New Phytologist*, 105: 437-448, 1987.
- SYLVIA, D.M. & SINCLAIR, W.A. Suppressive influence of *Laccaria laccata* on *Fusarium oxysporum* and on douglas-fir seedlings. *Phytopathology*, 73(3): 384-389, 1983a.
- SYLVIA, D.M. & SINCLAIR, W.A. Phenolic compounds and resistance to fungal pathogens induced in primary roots of douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Phytopathology*, 73(3): 390-397, 1983b.
- THEODOROU, C. & BOWEN, G.D. The influence of temperature on the mycorrhizal associations of *Pinus radiata* D.DON. *Australian Journal of Botany*, 19: 13-20, 1971.
- THOMAS, G.W. & JACKSON, R.M. Sheating mycorrhizas of nursery grown *Picea sitchensis*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 73(1): 117-125, 1979.

- TRAPPE, J.M. Pure culture synthesis of douglas-fir mycorrhizae whit species of *Hebeloma*, *Suillus*, *Rhizopogon*, and *A. straeus*. *Forest Science*, 13(2): 121-129, 1967.
- TRAPPE, M.J. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Ann. Review Phytopathology*, 15: 203-222, 1977.
- VAN DER PLANK, J.E. *Plant diseases: epidemics and control*. New York, Academic Press, 1963. 348p.
- VIEIRA, R.F. Efeito de fatores edáficos associados ao cerrado no crescimento de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) coker e Couch em meio de cultura e na infecção micorrízica de *Eucalyptus grandis* W. Hill Ex. Maiden em condições controladas. Viçosa, 1984. 84 p. (M.S. - Universidade Federal de Viçosa).
- VIEIRA, R.F. & PERES, J.R.R. Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para *Eucalyptus grandis*. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 12: 231-235, 1988a.
- VIEIRA, R.F. & PERES, J.R.R. Definição do teor de fósforo no solo para máxima eficiência da associação ectomicorrízica em *Eucalyptus grandis*. *Revista Bras. Ci. Solo*, 12: 237-241, 1988b.

WARRINGTON, S.J.; BLACK, H.D.; COONS, L.B. Entry of *Pisolithus tinctorius* hyphae into *Pinus taeda* roots. *Canadian Journal of Botany*, 59: 2135-2139, 1981.

YOKOMIZO, N.K.S. & KRUGNER, T.L. *Pisolithus tinctorius* Coker et Couch e ectomicorrizas em espécies de *Eucalyptus* L'Heritier. *Silvicultura em São Paulo*, 17/19: 1-8, 1983/85a.

YOKOMIZO, N.K.S. & KRUGNER, T.L. Avaliação comparativa dos efeitos de ^{As}isolados de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch em mudas de espécies de *Pinus* e *Eucalyptus*. *Silvicultura em São Paulo*, 17/19: 23, 1983/85b.

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

ZAK, B. Pure culture synthesis of bearberry mycorrhizae. *Canadian Journal of Botany*, 54: 1297-1305, 1976.

APÊNDICE 1 - Composição do meio de cultivo dos explantes

	mg/l
1. NH_4NO_3	800,0
2. KNO_3	1000,0
3. KH_2PO_4	170,0
4. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236,0
5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250,0
6. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
Na_2EDTA	37,3
7. H_3BO_3	6,2
8. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25
9. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,03
10. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,7
11. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
12. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,0
13. Kl	0,75
14. Meso inositol.....	100,0
15. Tiamina.....	5,0
16. Piridoxina.....	0,5
17. Ácido nicotínico.....	0,5
18. Pantotenato de cálcio.....	1,0
19. Sacarose.....	30.000,0
20. Ágar.....	6.000,0

APÊNDICE 2 - Composição da solução de Sarruge

	mg/l
1. KH_2PO_4	136,0
2. KNO_3	505,5
3. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1181,0
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	493,0
5. $\text{Fe EDTA} - \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24,0
6. H_3BO_3	2,8
7. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,8
8. ZnCl_2	0,1
9. $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,04
10. $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,02

APÊNDICE 3 - Composição do meio de cultivo 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	1/2 1,2ml
8. NaCl.....	0,025
9. Tiamina.....	0,0001

APÊNDICE 4 - Composição de FAA (Formol-ácido acético-álcool)

	ml
1. Álcool 50%.....	900
2. Formol.....	50
3. Ácido acético.....	50