

DESENVOLVIMENTO ECTOMICORRÍZICO EM MUDAS DE *Eucalyptus grandis*
E *Eucalyptus urophylla* INOCULADAS COM *Pisolithus tinctorius*
EM UM VIVEIRO COMERCIAL

LILIAN MARIA ARRUDA BACCHI

Orientador: Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Uni-
versidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo-Brasil
Outubro - 1988

Bacchi, Lilian Maria Arruda
B116d Desenvolvimento ectomicorrízico em mudas de
Eucalyptus grandis e Eucalyptus urophylla inocu-
ladas com Pisolithus tinctorius em um viveiro
comercial. Piracicaba, 1988.
81p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

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

CDD 634.9734

DESENVOLVIMENTO ECTOMICORRÍZICO EM MUDAS DE *Eucalyptus grandis*
E *Eucalyptus urophylla* INOCULADAS COM *Pisolithus tinctorius*
EM UM VIVEIRO COMERCIAL

LILIAN MARIA ARRUDA BACCHI

Aprovada em: 15.12.1988

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Tasso Leo Krü^gner

ESALQ/USP

Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves

ESALQ/USP

Dr.^a Siu Mui Tsai

CENA/USP



Prof. Dr. Tasso Leo Krü^gner

Aos meus pais
e meus irmãos,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Tasso Leo Krü^gner, pela orientação recebida.

- À Champion Papel e Celulose Ltda., pelo acesso e auxílio na instalação dos ensaios, em viveiro de Mogi Guaçu.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de estudo.

- Ao Colega João Batista Vida, pelas sugestões e colaboração na obtenção de fotografias.

- Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, professores, colegas e funcionários, pelo apoio recebido.

- A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Í N D I C E

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Associações micorrízicas em eucalipto.....	4
2.1.1. Ectomicorrizas	4
2.1.2. Ecto x endomicorrizas	8
2.1.3. Efeitos da associação micorrízica sobre o hospedeiro	10
2.1.4. Associação ectomicorrízica <i>Pisolithus tinctorius</i> - <i>Eucalyptus</i> spp.....	12
2.2. Tipos de inóculo ectomicorrízico	14
2.3. Fatores importantes à formação de ectomicorrizas	17
2.3.1. Considerações gerais	17
2.3.2. Características do fungo simbiote...	22
2.3.3. Características do inóculo.....	25
2.3.4. Esterilização do substrato.....	27
2.3.5. Fertilização	28
2.3.6. Fungicidas e inseticidas.....	30

	Página
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Avaliação do crescimento micelial de <i>Pisolithus tinctorius</i> em cultura pura.....	34
3.2. Avaliação da viabilidade do inóculo produzido em meio líquido	35
3.3. Avaliação da compatibilidade fungo-hospedeiro	36
3.4. Avaliação da presença de ectomicorrizas em amostras de um viveiro comercial.....	38
3.5. Inoculação de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Eucalyptus urophylla</i>	39
3.6. Inoculação de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> com 45 dias de idade	41
3.6.1. Mudas "de verão"	41
3.6.2. Mudas "de inverno"	43
3.7. Inoculação de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> com 75 dias	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. Avaliação do crescimento micelial de <i>Pisolithus tinctorius</i> em cultura pura	46
4.2. Avaliação da viabilidade do inóculo produzido em meio líquido	47
4.3. Avaliação da compatibilidade fungo-hospedeiro	48

	Página
4.4. Avaliação da presença de ectomicorrizas em amostras de viveiro comercial	51
4.5. Inoculação de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Eucalyptus urophylla</i> com o fungo <i>P. tinctorius</i>	51
5. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Origem dos isolados de <i>Pisolithus tinctorius</i> avaliados quanto ao crescimento micelial	35
Tabela 2 - Crescimento de <i>Pisolithus tinctorius</i> em meio MMN, com 19 dias de incubação.....	47
Tabela 3 - Viabilidade do inóculo micelial de <i>Pisolithus tinctorius</i> , triturado em liquidificador durante 10 segundos.....	49
Tabela 4 - Desenvolvimento micorrízico em cortes de raízes de <i>Eucalyptus grandis</i> inoculadas com <i>P. tinctorius in vitro</i>	49
Tabela 5 - Efeito de <i>Pisolithus tinctorius</i> sobre o desenvolvimento radicular de <i>Eucalyptus grandis in vitro</i>	50
Tabela 6 - Desenvolvimento micorrízico em raízes de mudas de <i>E. grandis</i> , amostradas em um viveiro comercial	51
Tabela 7 - Desenvolvimento micorrízico em raízes de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>E. urophylla</i> , com 170 dias de idade, inoculadas com <i>Pisolithus tinctorius</i>	53
Tabela 8 - Efeito da inoculação de <i>P. tinctorius</i> sobre o crescimento de mudas de <i>E. grandis</i> e <i>E. urophylla</i> ; após 170 dias a semeadura	54

Tabela 9 - Desenvolvimento micorrízico em raízes de mudas de <i>E. grandis</i> , com 90 dias de idade, inoculadas com suspensão de micélio de <i>P. tinctorius</i> aos 45 dias.....	56
Tabela 10 - Desenvolvimento micorrízico em raízes de mudas de <i>E. grandis</i> , com 130 dias de idade, inoculadas com suspensão de micélio de <i>P. tinctorius</i> aos 45 dias.....	56
Tabela 11 - Efeito da inoculação de suspensão de micélio de <i>P. tinctorius</i> sobre o desenvolvimento de mudas "de verão" de <i>E. grandis</i> com 90 dias de idade, inoculadas aos 45 dias	57
Tabela 12 - Efeito da inoculação de suspensão de micélio de <i>P. tinctorius</i> sobre o desenvolvimento de mudas "de inverno" de <i>E. grandis</i> , com 130 dias de idade, inoculadas aos 45 dias.....	57
Tabela 13 - Efeito da inoculação de suspensão de micélio de <i>P. tinctorius</i> sobre o desenvolvimento de mudas de <i>E. grandis</i> , com 160 dias de idade, inoculadas aos 75 dias... ..	59
Tabela 14 - Desenvolvimento micorrízico em raízes de mudas de <i>E. grandis</i> , com 160 dias de idade, inoculadas com suspensão de micélio de <i>P. tinctorius</i> aos 75 dias.....	59

DESENVOLVIMENTO ECTOMICORRÍZICO EM MUDAS DE *Eucalyptus grandis*
E *Eucalyptus urophylla* INOCULADAS COM *Pisolithus tinctorius*
EM UM VIVEIRO COMERCIAL

Autora: LILIAN MARIA ARRUDA BACCHI

Orientador: Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER

RESUMO

Mudas de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* foram inoculadas com o fungo *Pisolithus tinctorius*. As mudas foram produzidas em tubetes, contendo uma mistura de vermiculita e turfa, e receberam as práticas culturais de um viveiro comercial. O inóculo constou de micélio do fungo crescendo sobre vermiculita/turfa umedecida com meio MMN. Não foi observada a formação de ectomicorrizas típicas, e embora com tendência a maior crescimento, as mudas inoculadas não apresentaram desenvolvimento significativamente superior. Plantas de *E. urophylla* apresentaram maior percentagem de raízes com manto do que mudas de *E. grandis*.

Mudas de *E. grandis* com 45 e 75 dias, foram inoculadas com uma suspensão de fragmentos de micélio, e conduzidas em viveiro comercial. As mudas inoculadas com 45 dias mostraram uma maior percentagem de raízes com manto fúngico, constituído por hifas com grampo-de-conexão. Não foi

observado aumento significativo no crescimento de mudas com a inoculação.

Amostras de mudas de *E. grandis* retiradas do mesmo viveiro não apresentaram indícios de infecção ectomicorrízica aos 30, 60 e 90 dias de idade.

A viabilidade da suspensão de fragmentos de micélio foi confirmada em meio-de-cultura.

Os dois isolados de *P. tinctorius*, usados no presente trabalho, se mostraram capazes de formar ectomicorriza em condições axênicas.

ECTOMYCORRHIZAL DEVELOPMENT OF *Eucalyptus grandis* AND
Eucalyptus urophylla SEEDLINGS INOCULATED WITH
Pisolithus tinctorius UNDER NURSERY CONDITIONS

Author: LILIAN MARIA ARRUDA BACCHI

Adviser: Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER

SUMMARY

Seedlings of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* were inoculated with *P. tinctorius*. They were grown in containers with vermiculite + peat mixture, receiving the routine nursery treatment. The ectomycorrhizal fungus inoculum was prepared in a mixture of vermiculite and peat moss moistened with MMN solution. There was no typical ectomycorrhizal formation and significant effects on plant growth. However it could be observed in inoculated seedlings a tendency for an increase in growth. Plants of *E. urophylla* showed a higher percentage of roots with fungal mantle compared to *E. grandis*.

Forty five day-old seedlings of *E. grandis* inoculated with triturated mycelium showed higher percentage of roots with fungal mantle than the control. It was not observed any significant increase of growth of inoculated plants.

A sample of seedlings taken from a commercial nursery showed no ectomycorrhizal development on the *E.grandis* seedlings.

The viability of triturated mycelium was confirmed by plating it on MMN.

The two isolates of *P. tinctorius* used in this study showed capacity to form ectomycorrhizal on eucalypt seedlings under axenic conditions.

1. INTRODUÇÃO

Alguns gêneros de essências florestais requerem associação micorrízica obrigatoriamente, não se estabelecendo o plantio das mesmas na ausência do fungo simbiote. Alguns destes gêneros são *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* e *Quercus*. Outros gêneros, denominados ectomicorrízicos facultativos, podem se estabelecer na ausência destes fungos, como é o caso de *Cupressus*, *Betula*, *Alnus* e *Eucalyptus* (MEYER, 1973).

Diversas espécies de *Eucalyptus* spp. têm sido encontradas em associação com fungos ectomicorrízicos (PRYOR, 1956; CHILVERS & PRYOR, 1965; WARCUP, 1980). No Brasil, os fungos *Pisolithus tinctorius* e *Scleroderma* sp. são os mais frequentemente encontrados em talhões de *Eucalyptus* spp. (BARROS *et alii*, 1978; SCHWAN, 1984; CARVALHO *et alii*, 1987). O efeito destes fungos sobre o hospedeiro ainda não é bem conhecido.

Em situações onde as micorrizas não ocorrem, qualquer ação que resulte em seu desenvolvimento deverá aumentar o crescimento da planta ou mesmo, em casos extremos, tornar viável o estabelecimento da mesma quando de outra maneira este não seria possível (SCHENCK, 1981; JACKSON & MA-

SON, 1984). Mais frequentemente há a situação na qual com os métodos normais de plantio e cultivo, associações micorrízicas se desenvolvem mas não com os fungos que dão benefício máximo. Também pode haver um atraso considerável antes que as micorrizas se estabeleçam. Se um fungo simbiote, mais efetivo, pode ser introduzido com sucesso e se pode assegurar que a associação se desenvolva precocemente na planta, então a inoculação deverá resultar em benefícios.

No caso de *Eucalyptus*, a importância da inoculação artificial foi reportada por GARBAYE *et alii* (1988), e necessita ser testada para as condições brasileiras.

A inoculação de mudas de *Eucalyptus* spp., com fungos ectomicorrízicos, tem tido sucesso principalmente sob condições axênicas ou de assepsia parcial (CHILVERS *et alii*, 1986; GRENVILLE *et alii*, 1986; POISSONNIER, 1987). Em viveiro, as inoculações muitas vezes não têm resultado no desenvolvimento de micorrizas ou em resposta da planta (VIEIRA, 1984; YOKOMIZO & KRUGNER, 1983/1985b).

A produção de mudas no setor florestal vem evoluindo nos últimos anos, com melhoria da qualidade e redução dos custos. A mudança do sistema de sacos plásticos para tubetes reduziu a necessidade de área e mão-de-obra, diminuindo o custo final da muda (MORO *et alii*, 1988).

Entre as vantagens do uso de tubetes para a

produção de mudas de espécies florestais, estão a boa qualidade do sistema radicular, menores riscos de contaminações com agentes fitopatogênicos e a possibilidade de uma inoculação micorrízica controlada. Para tanto é necessária uma combinação substrato-fertilização-técnica de inoculação adequada, aproveitando a vantagem do sistema radicular restrito, que possibilita a localização do inóculo (CHEVALIER, 1985).

O presente trabalho teve como objetivos principais:

- testar a eficiência de diferentes tipos e doses de inóculo vegetativo, de diferentes isolados de *Pisolithus tinctorius*, no estabelecimento de ectomicorrizas em mudas de eucalipto, alterando o mínimo possível o sistema comercial de produção de mudas por tubetes;

- observar o efeito da inoculação em diferentes estágios de desenvolvimento da planta, sobre a quantidade de ectomicorrizas formadas em mudas de eucalipto e o desenvolvimento das mesmas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Associações micorrízicas em eucalipto

2.1.1. Ectomicorrizas

Em levantamentos realizados por WARCUP (1980), na Austrália, cerca de 90 espécies, de 13 famílias, se mostraram associadas a fungos ectomicorrízicos, e entre elas, 26 espécies de *Eucalyptus*.

PRYOR (1956) atribuiu as falhas no plantio de eucalipto no Hemisfério Norte à deficiência micorrízica. Inoculando o fungo *Scleroderma* sp. em solo esterilizado, o autor observou uma melhor coloração e um maior crescimento das plantas, comparadas ao controle. Além disso, pôde ser constatado que algumas espécies de *Eucalyptus*, principalmente aquelas pertencentes ao grupo *Renanthera*, foram altamente dependentes da associação, enquanto *Eucalyptus bicosata* não sofreu os efeitos da mesma.

Todas as 152 espécies de *Eucalyptus*, testadas por CHILVERS & PRYOR (1965), se mostraram capazes de formar micorriza, embora plantas individuais, algumas vezes, se

apresentassem não infectadas. Segundo BAKSHI (1966), todas as espécies de eucalipto, na Austrália, mostraram possuir micorriza, independente do grupo a que pertenciam.

Em pesquisa realizada na Índia, por SINGH e KUMAR (1966), *Eucalyptus tereticornis* e *E. citriodora* mostraram abundante presença de ectomicorrizas, enquanto em *E. grandis*, embora presente, a associação não se mostrou frequente.

Oito tipos de ectomicorrizas, encontradas originalmente em florestas nativas de *Eucalyptus* spp., foram descritos por CHILVERS (1968), baseado, principalmente, na organização do tecido do manto e na estrutura das rizomorfias associadas. O autor não se preocupou em identificar o fungo, ou os fungos possivelmente associados a cada tipo descrito.

Um fungo ectomicorrízico, não identificado, foi inoculado em espécies do subgênero *Monocalyptus*, *Eucalyptus dives*, *E. fastigata*, *E. pilularis* e *E. rossii*, e do subgênero *Symphyomyrtus*, *E. grandis*, *E. robusta*, *E. rudis* e *E. viminalis*, sem que fosse observada diferença significativa no número de plântulas infectadas, entre as espécies (CHILVERS, 1973).

Chilvers¹, citado por MALAJCZUK *et alii* (1975),

¹ CHILVERS, G.A. Mycorrhizas and the problem of association in *Eucalyptus* L'Herit. Aust. Natl. Univ., 1973. (Ph.D. Thesis).

observou a colonização de raízes de *Eucalyptus* por *Rhizogon luteolus* sem a formação de raízes micorrízicas.

MARX (1975) relata a ocorrência de abundante associação ectomicorrízica em talhões de *Eucalyptus globulus* de 3, 7 e 12 anos, em altitudes de 3170 a 3290 metros, no Perù.

Inoculando *Pisolithus tinctorius*, em culturas axênicas, CHILVERS (1973) obteve a formação de micorrizas em *Eucalyptus maculata*, *E. fastigata*, *E. sieberi*, *E. radiata*, *E. bridgesiana*, *E. st-johnii*, *E. polyanthemus* e *E. leucoxydon*. O autor observou pequena especificidade hospedeiro-simbionte dentro deste gênero. MALAJCZUK (1979) encontrou um desenvolvimento preferencial de ectomicorrizas em hospedeiro (*E. marginata* ou *E. calophylla*) do qual o fungo simbiote foi isolado. Os fungos inoculados foram *Boletus* sp., *Russula* sp., *Lactarius* sp. e *Ramaria* sp.

CHU-CHOU & GRACE (1981) observaram a associação de *Hymenogaster albus* com *Eucalyptus delegatensis*, *E. saligna*, *E. nitens*, *E. fastigata* e *E. regnans*. A inoculação de suspensão de esporos do fungo em plântulas de *E. saligna* provocou a formação de ectomicorriza de coloração marrom-dourada.

Em experimentos realizados por MALAJCZUK *et alii* (1982), *Laccaria laccata*, *Amanita muscaria*, *Hebeloma*

crustuliniforme, *Cenococcum geophilum*, *Pisolithus tinctorius*, *Paxillus involutus*, *Scleroderma laeve*, *Astraeus pteridis*, *Hydnangium carneum* e *Hymenogaster albellus* formaram ectomicorrizas com onze espécies de eucalipto, sendo que os dois últimos fungos se mostraram específicos para o gênero. As ectomicorrizas de eucalipto mostraram uma gama de características morfológicas, de uma simples raiz curta com manto a uma ramificação complexa. Foi constatado um acúmulo de compostos fenólicos nas células epidérmicas, que diferiu em função do fungo responsável pela colonização, particularmente entre fungos compatíveis e incompatíveis.

Segundo BARROS *et alii* (1978), os fungos ectomicorrízicos mais comumente encontrados em associação com *Eucalyptus* spp., no centro-leste e leste brasileiros, são *Pisolithus tinctorius* e *Scleroderma* spp.

YOKOMIZO & KRÜGNER (1983/85a) encontraram o fungo *Pisolithus tinctorius* associado a *Eucalyptus citriodora*, *E. grandis*, *E. saligna* e *E. viminalis*, em diversas regiões de São Paulo e Santa Catarina.

Em levantamentos realizados por SCHWAN (1984), na região de Viçosa, Minas Gerais, foram encontrados três tipos de ectomicorrizas, caracterizadas como tipo 1 (*Eucalyptus grandis* + *Scleroderma* sp.) em viveiro e tipos 2 (*Eucalyptus citriodora* + *Pisolithus tinctorius*) e 3 (*Eucalyptus robusta* + *Pisolithus tinctorius*) em florestas.

Em levantamentos, realizados por CARVALHO *et alii* (1987), na região de Alfenas, Minas Gerais, foi notada a presença de três fungos ectomicorrízicos associados a eucalipto, *Pisolithus tinctorius*, *Ramaria flavo-brunescens* e *Scleroderma* sp.

MALAJCZUK *et alii* (1987) estudaram a associação de *Eucalyptus marginata* e *E. diversicolor* com os fungos *Cortinarius* spp. e *Hysterangium inflatum*, que envolviam o sistema radicular das plantas. As raízes se apresentavam envoltas por hifas mal entrelaçadas que se difundiam através do solo, e seu aspecto lembrava o de raízes não colonizadas por fungos ectomicorrízicos. No entanto, em observações ao microscópio, os autores puderam constatar a presença de rede de Hartig bem desenvolvida, pela colonização de ambos os fungos. A associação foi denominada de "ectomicorriza superficial" e a hipótese de possuir capacidade de estimular o crescimento foi levantada.

2.1.2. Ecto x endomicorrizas

Uma sucessão endo-ectomicorriza pôde ser observada em experimentos realizados por LAPEYRIE & CHILVERS (1985). Aos dois meses de idade as plântulas inoculadas apresentaram, em média, 43,5% do comprimento da raiz infectada com endomicorriza e apenas 2,3% com ectomicorriza. Com 5 meses de idade as percentagens eram 19,5 e 9,0%, respectivamente.

CHILVERS *et alii* (1987) observaram uma reversão na relação de número de raízes com micorriza vesicular-arbuscular (MVA) e número de ectomicorrizas de 3:1, em plântulas de *Eucalyptus dumosa* com 2 meses, para 1:3 aos 5 meses. Segundo os autores, os fungos ectomicorrízicos demoram a iniciar a infecção, mas possuem uma colonização relativamente rápida e extensa, sendo melhor adaptados às relações simbióticas perenes.

CARVALHO & MUCHOVEJ (1987) estudaram a contribuição de alguns fungos endo e ectomicorrízicos para o crescimento de plantas de *Eucalyptus grandis* e o acúmulo de nutrientes nas mesmas. Após 4 meses puderam observar, para todos os parâmetros, a superioridade dos fungos ectomicorrízicos testados, *Pisolithus tinctorius* e *Paxillus involutus*, e um efeito depressivo dos fungos endomicorrízicos, *Gigaspora heterogama*, *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus macrocarpum* e *Glomus fasciculatum*.

Em experimentos conduzidos em casa-de-vegetação, por PEREIRA *et alii* (1987), diversas espécies de fungos endomicorrízicos se mostraram pouco eficientes na micorrização de *Eucalyptus grandis*. Mesmo a espécie capaz de colonização micorrízica, *Glomus clarum*, não influenciou o desenvolvimento das mudas.

2.1.3. Efeitos da associação micorrízica sobre o hospedeiro

Neumann¹, citado por MALAJCZUK *et alii* (1975), observou um aumento no crescimento de plântulas de *Eucalyptus camaldulensis* na presença de *Pisolithus tinctorius*, embora sem a formação de micorrizas, que atribuiu à atividade do fungo na rizosfera.

ASHTON (1976) observou que a associação micorrízica de *Eucalyptus regnans*, com diversas espécies de fungo, não se mostrou essencial a plântulas de até 3 meses, sob condições de altos níveis nutricionais e asséptica. Para SINGH & KUMAR (1966) a associação micorrízica, em eucalipto, pode não ser obrigatória durante os primeiros 2 ou 3 anos, embora seu estabelecimento nesta fase seja útil aos anos subsequentes.

MALAJCZUK (1979) observou que *Eucalyptus calophylla*, espécie resistente a *Phytophthora cinnamomi*, se apresentava com colonização ectomicorrízica mais intensiva do que *E. marginata*, suscetível ao patógeno.

IMAÑA & PRADO JÚNIOR (1979) obtiveram maior

¹ NEUMANN, R. Relationship between *Pisolithus tinctorius* (Mich ex Pers) Coker et Couch. and *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *Bull. Res. Counc. Isr. Sect. D. Bot.*, 7: 116-20, 1959.

altura de mudas e comprimento da superfície foliar de *Eucalyptus grandis*, inoculado com micélio de *Pisolithus tinctorius*. Não houve, no entanto, a formação de ectomicorriza típica, levando os autores a considerar uma associação endomicorrizica vesicular-arbuscular.

Segundo LAPEYRIE & BRUCHET (1983), a associação de *Eucalyptus delegatensis* com fungos ectomicorrízicos, se mostrou necessária ao estabelecimento da espécie em solos cálcicos na França. LAPEYRIE & CHILVERS (1985) observaram que *Eucalyptus dumosa* se comportou como uma espécie tolerante a solos cálcicos, somente com a inoculação de fungos micorrízicos. A inoculação foi feita através da adição de solo superficial contendo esporos de fungos simbiotes. Os tratamentos não inoculados mostraram uma contaminação com fungos endo e principalmente ectomicorrízicos, diferentes dos encontrados nas parcelas inoculadas, sem que as plantas apresentassem tolerância ao calcário.

VIEIRA (1984) obteve infecção das mudas de *Eucalyptus grandis*, apenas com um dos três isolados de *Pisolithus tinctorius* testados. Não foi observada, entretanto, uma associação simbiótica mutualística, sendo a altura, peso da matéria seca e concentração de diversos elementos na planta as mesmas para mudas micorrizadas e não micorrizadas.

Plântulas de *Eucalyptus pilularis*, com ectomicorrizas, se mostraram capazes de reter, no sistema radi-

cular, grande parte do fósforo absorvido, que era transferido para a parte aérea na falta de suprimento externo, conseguindo sobreviver em solos com deficiência deste mineral (MULLIGAN & PATRICK, 1985).

Segundo YOKOMIZO (1986), a associação de espécies de *Eucalyptus* com *Pisolithus tinctorius*, não apresenta efeitos sobre o desenvolvimento das mudas, em fase de viveiro.

GARBAYE *et alii* (1988) obtiveram um aumento na altura de mudas do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *E. kintoniana*, com a inoculação de *Pisolithus tinctorius* e *Sclerotinia texense*. No campo, este efeito só pôde ser notado 20 meses após o transplante, permanecendo a vantagem das plantas inoculadas aos 27 e 50 meses, embora nenhuma ectomicorriza devido a *P. tinctorius* tenha sido encontrada na ocasião.

2.1.4. Associação ectomicorrízica *Pisolithus tinctorius* - *Eucalyptus* spp.

A ectomicorriza formada na associação *Pisolithus tinctorius* - *Eucalyptus nova-anglica*, descrita por ROSE JÚNIOR *et alii* (1981), possuía coloração marrom a marrom dourada, forma monopodial ou ramiforme, manto com hifas fortemente entrelaçadas, rede de Hartig nas camadas externas do córtex e hifas com grampos de conexão frequentes.

As ectomicorrizas formadas por *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus* spp., segundo YOKOMIZO & KRÜGNER (1983/85a), eram do tipo ramiforme ou piramidal aberto, apresentando manto, rede de Hartig até as proximidades da endoderme e segmentos de hifas e rizomorfias se irradiando no solo.

Segundo CHILVERS & GUST (1982b), as raízes com ectomicorriza possuem um crescimento mais lento, porém mais persistente do que as não infectadas por *Pisolithus tinctorius*. Observaram que a infecção micorrízica por *Pisolithus tinctorius* promovia uma maior ramificação das raízes. Os autores não descartaram a hipótese do fungo crescendo sobre a superfície de raízes não infectadas causar o mesmo efeito.

MASSICOTE *et alii* (1987) observaram que plântulas de *Eucalyptus pilularis* apresentaram raízes laterais de primeira ordem disponíveis para a síntese de micorrizas em um período de 2 a 4 semanas após a germinação. Hifas de *Pisolithus tinctorius* induziram a formação de ectomicorriza com manto espesso, rede de Hartig, e com morfologia final dependente do estágio de alongamento das raízes laterais quando da colonização. Foi observado, também, que a presença do fungo ectomicorrízico aumentava a iniciação de raízes laterais.

2.2. Tipos de inóculo ectomicorrízico

A maior parte das técnicas de inoculação reportadas com fungos ectomicorrízicos envolve basidiomicetos em pinus e eucalipto. Alguns tipos de inóculos naturais e produzidos em laboratório, e diversos modos de aplicação destes têm sido usados durante anos. Muitas das técnicas têm tido sucesso, outras não (MARX & KENNEY, 1982).

Os tipos de inóculo ectomicorrízico, citados por TRAPPE (1977), são, inoculação espontânea através de propágulos residuais no solo ou esporos transportados de outros locais; incorporação de solo e húmus com propágulos em substrato de plantio; transplante de plântulas micorrízicas em canteiros de viveiros; esporocarpos, esporos ou escleródios; e, cultura micelial pura. MARX & KENNEY (1982), se referem, basicamente, aos mesmos tipos de inóculo, como inóculo de solo, inóculo de esporos e inóculo vegetativo.

Algumas técnicas de inoculação, descritas por RIFFLE & MARONEK (1982), são a inoculação difusa; localização do inóculo abaixo das sementes; mergulho de raízes em lama ou água contendo inóculo micorrízico; e peletização de sementes, encapsulando-as com basidiosporos do fungo ectomicorrízico.

O inóculo de solo de plantações e "stands" naturais contém uma mistura de fungos. Segundo RIFFLE & TINUS

(1982), uma das razões dos bons resultados obtidos com inóculo de solo é a possível introdução de mais de um fungo micorrízico, o que aumenta a chance de se ter ao menos um simbiote efetivo. Entretanto, a maior desvantagem no uso deste tipo de inóculo, como salientam os autores, é o risco de transmissão de doenças causadas por patógenos de solo. Por esta razão, o uso de inóculo de solo não pode ser usualmente recomendado.

MARX *et alii* (1976) introduziram artificialmente inóculo vegetativo, produzido em turfa/vermiculita umedecida com meio nutriente, e basidiosporos de *Pisolithus tinctorius* em solos de 3 viveiros, de pinus, nos Estados Unidos. Observaram que ectomicorriza formada por inóculo de basidiosporos não dominou o sistema radicular ou estimulou o crescimento de plântulas tanto quanto o inóculo vegetativo.

Segundo SMITH (1982) um inóculo líquido em frascos de cultura agitados formou uma biomassa em 6 dias que, de outra maneira, requereria 6 semanas em frascos para dos ou substrato sólido. Otimizando a taxa de crescimento em meio favorável para tanques de fermentação, e com formulação apropriada, de acordo com o autor, é possível se pensar em produção do fungo micorrízico *Pisolithus tinctorius* para uso comercial em florestas.

Os problemas apresentados pelo emprego de

inóculo produzido artificialmente, listados por KRÜGNER (1986), são crescimento lento ou ausência de crescimento de alguns basidiomicetos em meio de cultura, perda de viabilidade durante transporte e armazenamento, e, competição com outros microrganismos do solo diminuindo sua eficiência.

Um método simples de produção de micorrizas é descrito por MULLETTE (1976) e, possibilita que plantas micorrízicas sejam usadas em uma grande gama de experimentos, inclusive estudos controlados sobre nutrição de *Eucalyptus*. As plantas foram cultivadas em vaso Leonard sob condições estéreis ou não, em solo ou quartzo moído com solução nutriente. No quartzo estéril, a inoculação com corpo de frutificação moído de *Pisolithus tinctorius* induziu mais que 70% das plântulas de *Eucalyptus gummiifera* testadas a formar micorrizas de coloração amarelo mostarda. Em solo arenoso não estéril, nutricionalmente pobre, 92% das plantas inoculadas foram infectadas.

GRENVILLE *et alii* (1986) puderam observar a formação de ectomicorriza típica com a inoculação de cinco isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus pilularis*, sob condição de assepsia parcial, em sacolas plásticas e substrato de papel umedecido com solução nutriente. As micorrizas foram observadas após 6-9 dias da inoculação, sendo que o isolado mais eficiente na infecção das plântulas mostrou também um crescimento mais rápido em cultura pura.

Uma técnica simples e flexível de inoculação para sintetizar ectomicorriza em plântulas de eucalipto, foi desenvolvida por CHILVERS *et alii* (1986). A formação de micorriza é sob condições axênicas, em placas-de-petri, pelo método "paper-sandwich", e a associação se estabelece rapidamente, podendo ser visualizada a partir de 5 dias.

POISSONNIER (1987) cita alguns de seus trabalhos sobre micorrização *in vitro* de eucalipto. Após o enraizamento as plantas são transferidas, individualmente, para tubos com substratos aerados (vermiculita, perlita, celulose) embebidos em meio de Melin. O autor conseguiu uma eficiência de 26% para a inoculação de *Pisolithus tinctorius* nesta fase, e 25% para *Paxillus involutus*.

2.3. Fatores importantes à formação de ectomicorrizas

2.3.1. Considerações gerais

Segundo CHILVERS (1968) a síntese de micorriza em cultura pura, indica apenas a habilidade do fungo em infectar o hospedeiro, o que não significa que o fará no ambiente normal do solo. Em cultura pura, o fungo é suprido com alto potencial de inóculo, geralmente com micélio bem nutrido, os fatores de competição são excluídos e a planta cresce sob condições artificiais.

Os resultados dos trabalhos realizados por DUDDRIDGE (1986a; 1986b) demonstraram que a associação mi-

corrizica é muito influenciada pela quantidade de nutrientes do meio. Um aumento na agressividade do fungo, devido a presença de uma fonte de carbono prontamente assimilável, pode induzir uma associação compatível, e provocar a formação de micorriza em um hospedeiro que normalmente não seria colonizado pelo fungo.

As misturas artificiais de turfa-vermiculita, vêm sendo muito utilizadas como substrato, em viveiro, e embora não apresentem, em geral, fungos micorrízicos, suportam satisfatoriamente o desenvolvimento das plântulas com adubação apropriada. No entanto, inoculações deveriam ser feitas no sentido de assegurar uma boa formação ectomicorrízica após o transplante (TRAPPE, 1977).

YOKOMIZO & KRÜGNER (1983/85b) não obtiveram a formação de ectomicorrizas em *Eucalyptus citriodora* e *E. saligna*, com a infestação do solo com inóculo vegetativo e esporos de *Pisolithus tinctorius*, obtidos de povoamento de eucalipto. Segundo os autores a ausência de micorrizas típicas nas mudas foi resultado da incapacidade do fungo em se associar ao eucalipto na fase de viveiro ou das limitações da metodologia empregada. MULLETTE (1976) acredita que parte da falta de sucesso no estabelecimento de micorrizas em eucalipto experimentalmente, resulta da falha de determinação de condições ambientais satisfatórias para o estabelecimento da infecção.

Segundo LAPEYRIE & BRUCHET (1985), infecções ectomicorrízicas parciais ou mal sucedidas têm sido constantes em experimentos com fungos micorrízicos. Nenhum dos fungos ectomicorrízicos introduzidos em viveiro por GARBAYE *et alii* (1988), foi capaz de estabelecer uma simbiose estável e efetiva.

Segundo CHILVERS *et alii* (1986), os processos que vêm sendo usados para desenvolver ectomicorrizas em plântulas de pinus, têm resultado em poucas inoculações bem sucedidas em eucalipto. Os autores levantam a hipótese das falhas na formação de micorriza, estarem associadas à fase de pré-infecção, quando o fungo deve crescer radialmente e entrar em contacto com a raiz.

Para MARX & SCHENCK (1983) somente dois pré-requisitos parecem importantes ao sucesso da inoculação com *Pisolithus tinctorius*, em pinus, a fumigação efetiva do solo e um inóculo altamente viável.

Segundo DIXON *et alii* (1985), as práticas culturais normalmente utilizadas em viveiros comerciais, requerem modificações para a produção de mudas com ectomicorriza abundante. As misturas artificiais para substrato e as aplicações frequentes de fertilizantes solúveis concentrados podem, de acordo com MOLINA & TRAPPE (1982), minimizar ou retardar a formação ectomicorrízica.

Segundo JACKSON & MASON (1984) uma alta intensidade luminosa, solos com fertilidade moderada, ausência de déficit ou de excesso de umidade, solos moderadamente ácidos

e temperatura ligeiramente alta, favorecem o desenvolvimento de ectomicorrizas.

Alguns fatores, citados por CHEVALIER (1985), responsáveis pelo sucesso da inoculação são a qualidade e a quantidade de inóculo, o poder infectivo do fungo, o momento da inoculação, a localização do inóculo, a capacidade de sobrevivência do fungo no solo ou substrato, níveis baixos de fertilização, desinfecção do substrato, temperatura e umidade.

KHALIQUE & BEG (1976) observaram uma redução na frequência micorrízica, em *Eucalyptus camaldulensis*, em solo com 0,3% de salinidade, e ausência total com 1,5%.

A maioria dos fungos ectomicorrízicos desenvolvem-se com dificuldade em solos com déficit de água, e requerem um substrato adequadamente aerado (MEYER, 1974).

Segundo RUEHLE (1983), a orientação do sistema radicular resultante do uso de tubetes para a produção de mudas, é desaconselhável para o desenvolvimento ectomicorrízico após o transplante.

A percentagem de micorriza aumentou com o aumento da luminosidade e foi maior a níveis intermediários (62 ppm) de nitrogênio, conforme observado por EKWEBELAM & REID (1983), na associação de *Pinus contorta* e *Pisolithus tinctorius* ou *Suillus granulatus*. Um aumento na frequência micorrízica, em *Eucalyptus regnans*, com o aumento na intensidade luminosa já havia sido observado por ASHTON (1976).

SHWAN (1984) pode observar uma grande diferen

ça na percentagem de ectomicorrizas em 2 lotes de *Eucalyptus grandis*, no viveiro. O lote 01 (semeado em setembro/82) apresentou 31 a 48% das raízes com micorriza e o lote 02 (junho/83) 9 a 30%. Nos meses de setembro a novembro de 1983, no lote 02 ocorreu um aumento na infecção micorrízica, seguido por uma redução no mês de dezembro, possivelmente devido ao alto valor de precipitação associado à área plana e solo argiloso.

BETTIOL & KRÜGNER (1986), obtiveram um efeito negativo de diversas fontes de matéria orgânica sobre a formação de micorrizas por *Pisolithus tinctorius* e *Thelephora terrestris* em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. No entanto, houve tendência a um maior desenvolvimento das mudas na presença de matéria orgânica, pelo seu efeito direto sobre as mesmas.

Mudas de *Quercus velutina* e *Q. alba*, produzidas em recipientes de 45 polegadas cúbicas, com substrato de turfa-vermiculita (1:1), esterilizado, foram inoculadas com inóculo micelial de *Pisolithus tinctorius* antes da semeadura; e submetidas a práticas culturais diversas. A irrigação em dias alternados se mostrou mais favorável à infecção micorrízica do que a diária, assim como as temperaturas mais elevadas e os níveis de fertilização mais baixos. A densidade do inóculo mostrou também algum efeito sobre a percentagem de raízes laterais com micorriza, sendo obtido cerca de 4% a 1,2 pol³/tubete, 40% a 1,5 e 50% a 1,8 pol³ (DIXON et alii, 1985).

2.3.2. Características do fungo simbiote

Segundo MIKOLA (1973) para a inoculação de culturas puras ter sucesso, o fungo introduzido deve ser capaz de competir com a população microbiana natural do solo, e para sobressair-se a esta, grandes quantidades de inóculo devem ser aplicadas e as condições no solo devem favorecer o mesmo.

Segundo TRAPPE (1977), diversas características deveriam ser levadas em consideração na escolha de um fungo ectomicorrízico para inoculação. A resposta provocada no hospedeiro, a especificidade, o crescimento em cultura, a adaptabilidade ecológica, a tolerância a toxidez do solo, a absorção de nutrientes, a produção de reguladores de crescimento e a interação com outros organismos do solo são algumas das características nas quais diversas espécies de fungos podem diferir, e que determinam sua capacidade em formar micorriza.

Pisolithus tinctorius já foi encontrado em 33 países, de condições climáticas e solos diversos, em 46 espécies hospedeiras de diferentes gêneros, incluindo *Abies*, *Betula*, *Carya*, *Eucalyptus*, *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Quercus* e *Tsuga* (MARX, 1977).

Segundo GRAND (1976) a presença de *Pisolithus tinctorius* já foi constatada em 36 estados dos Estados

Unidos e em outros países como Austrália, Brasil, Canadá, China, França, Alemanha, Honduras, México, Nova Zelândia, Portugal, Porto Rico e África do Sul.

Segundo MARX *et alii* (1982) *Pisolithus tinctorius* tem diversas características que fazem com que seja indicado para aplicação prática, entre outras, sua propagação em laboratório, grande gama de hospedeiros, distribuição cosmopolita e adaptação a condições adversas de solo. Em trabalhos realizados por GARBAYE *et alii* (1988), *P. tinctorius* se mostrou muito eficiente, porém pouco competitivo, comparado aos fungos nativos.

Segundo TRAPPE (1977), a variação ecotípica dentro de um fungo micorrízico pode ser tão pronunciada como as diferenças entre espécies. Isolados de um fungo micorrízico podem diferir marcadamente em uma variedade de características. Assim, diferentes isolados de *Pisolithus tinctorius* podem apresentar diferentes capacidades em formar micorrizas em pinus.

MARX (1981) observou diferenças na capacidade de formar micorriza em *Pinus taeda*, de 21 isolados de *Pisolithus tinctorius*. O autor pôde constatar que o reisolamento aumentou significativamente o desenvolvimento micorrízico e, que a taxa de crescimento em cultura pura não apresentou relação com a capacidade de formar micorriza.

Segundo MOLINA & TRAPPE (1982), fungos que não crescem ou o fazem muito lentamente em cultura podem ser altamente especializados em sua relação simbiótica e beneficiar o hospedeiro de maneira considerável. Além disso, alguns fungos ectomicorrízicos perdem sua capacidade de formar micorriza após longos períodos em cultura.

CHILVERS (1973) não obteve a formação de ectomicorriza em plântulas de *Pinus radiata*, inoculadas com *Pisolithus tinctorius*, isolado em florestas de eucalipto e capaz de formar micorriza com *Eucalyptus st-johnii*.

Os isolados de *Pisolithus tinctorius* de pinus se mostraram com colônias mais vigorosas e escuras, com maior taxa de crescimento, do que aqueles de eucalipto (YOKOMIZO & KRÜGNER, 1983/85a). YOKOMIZO & KRÜGNER (1983/85b) observaram também especificidade de *Pisolithus tinctorius* quanto a seu hospedeiro, não obtendo a formação de ectomicorriza com a inoculação de um isolado de eucalipto em mudas de pinus.

GARBAYE *et alii* (1988) observaram diferença na capacidade de formar micorriza de dois isolados de *P. tinctorius*, obtidos em povoamentos de *Pinus* sp., inoculados em mudas de eucalipto. Segundo os autores, as condições do viveiro devem ter sido desfavoráveis a um dos isolados testados.

2.3.3. Características do inóculo

Em experimentos realizados por HUNG & TRAPPE (1983), micélio de *Pisolithus tinctorius* se mostrou menos tolerante a trituração do que os de *Hebeloma crustuliniforme*, *Cenococcum geophilum*, *Laccaria laccata* e *Suillus lakei*. Após 25 segundos de trituração, em baixa velocidade, o micélio de *Pisolithus tinctorius* não se apresentava viável.

Culturas de *Pisolithus tinctorius* em meio líquido, trituradas, mostraram maior viabilidade dos fragmentos de micélio com 3 semanas de idade (LAPEYRIE & BRUCHET, 1983).

LAPEYRIE & BRUCHET (1985) observaram que inóculo de *Pisolithus tinctorius*, em vermiculita + turfa, manteve uma boa viabilidade após 19 semanas armazenado a 4°C; enquanto que na mesma temperatura, inóculo de *Paxillus involutus* se mostrou pouco resistente a períodos de armazenamento maiores que uma semana. A 24°C a qualidade do inóculo declinou rapidamente para os dois fungos.

Para o caso de inóculo de *Pisolithus tinctorius*, produzido em meio líquido, LAPEYRIE & BRUCHET (1985) encontraram um rápido declínio na viabilidade do mesmo com o aumento do período de trituração do micélio (em "Ultraturax"). Com 2 segundos de trituração os fragmentos apresentavam um tamanho médio de 0,8mm, com dispersão e viabilidade

de satisfatórias. O inóculo produzido em meio pobre e com cerca de 3 semanas de incubação mostrou-se, quando triturado, com maior viabilidade do que aquele incubado por um período maior, ou em meio mais rico em nutrientes.

HUNG & MOLINA (1986) observaram que apenas um, de quatro isolados de *Pisolithus tinctorius*, com inóculo produzido em vermiculita/turfa, foi capaz de formar micorriza em *Pseudotsuga menziesii*, em recipientes de 165 ml com substrato vermiculita/turfa (1:1). Apenas 30,8% do sistema radicular foi colonizado pelo inóculo fresco, reduzindo-se a percentagem para valores inferiores a 1%, quando o mesmo permanecia armazenado por mais de um mês a, 21°C ou 2°C. Os autores constataram, no entanto, que o mesmo inóculo apresentava micélio abundante e com bom crescimento se colocado em MMN ágar, para todos os isolados.

Segundo HUNG & MOLINA (1986), se um meio rico em nutrientes é fornecido ao inóculo estocado, as hifas, no interior das partículas de vermiculita, usam estes nutrientes para reiniciar o crescimento e permanecer fisiologicamente ativas. No entanto, quando o inóculo é misturado ao substrato (vermiculita/turfa), o fungo senesce antes de conseguir infectar a raiz.

LOPES *et alii* (1987) estudando a quebra de micélio de *Pisolithus tinctorius* com o uso de cacos de porcelana e agitação em liquidificador, observaram que uma

suspensão mais homogênea e com maior número de fragmentos viáveis era obtida com trituração em liquidificador por, no máximo, 3 segundos.

2.3.4. Esterilização do substrato

ASHTON (1976) constatou que em substrato previamente esterilizado, a inoculação de *Eucalyptus regnans* com *Inocybe olivaceo-fulvus* resultou em aumento no crescimento das mudas, o que não pôde ser observado na ausência de esterilização. Segundo GIBSON *et alii* (1988) a esterilização do solo é importante apenas para os fungos ectomicorrízicos que normalmente ocorrem em estágios mais adiantados do estabelecimento da planta.

MARX *et alii* (1978) conseguiram um aumento de mudas, de *Pinus taeda*, aptas ao transplante de 140% com inoculação de micélio de *Pisolithus tinctorius*, e 81, 79 e 75% com 3 concentrações de esporos inoculadas, em solo fumigado. Em solo não fumigado, somente a inoculação na forma de micélio obteve resultado significativo para este parâmetro. Um aumento na altura, diâmetro e peso fresco de parte aérea e sistema radicular, só foi conseguido com a inoculação em solos fumigados.

Mudas de *Pinus taeda*, produzidas em tubetes, foram transplantadas para parcelas contendo solo fumigado e não fumigado, com brometo de metila. As hifas de *Pisolithus tinctorius* difundiram-se a distâncias maiores em solos fumi

gados, resultando na formação de ectomicorriza em 90% das raízes laterais, contra 50% em solos não fumigados (RUEHLE, 1983).

Segundo MCKAY (1982) em estudos usando plantas micorrízicas, microrganismos do solo reduzindo o número de sítios disponíveis para colonização e por competição por fontes de energia prontamente disponíveis durante a infecção inicial, podem mascarar o efeito da inoculação.

Em estudos realizados por SUMMERBELL (1987), *Trichoderma viride* e *Trichoderma polysporum* inibiram a formação de micorriza por *Laccaria bicolor*. Segundo o autor, *Trichoderma* spp. pode ter um significado especial no insucesso da formação de micorriza, por simbioses introduzidos, em viveiros florestais; já que solos fumigados são facilmente recolonizados por este fungo. YATAZAWA *et alii* (1960) observaram que em solo tratado com álcool, havia uma relativa estabilidade na população de bactérias e actinomicetos, mas que a população de *Trichoderma viride* se reestabeleceu rapidamente.

2.3.5. Fertilização

Uma correlação negativa entre altos níveis de N e P e a suscetibilidade de raízes curtas de *Pinus taeda* a infecção ectomicorrízica por *Pisolithus tinctorius* foi encontrada por MARX *et alii* (1977). Os níveis elevados de N

e P, levaram a um decréscimo na concentração de sucrose nas raízes curtas, diminuindo a suscetibilidade à infecção pelo fungo. Para MEYER (1974), no entanto, parece inapropriado considerar ectomicorriza como uma manifestação de solos pobres em nutrientes.

Segundo CHILVERS & GUST (1982a), o efeito da fertilização parece ser responsável por um atraso inicial nas infecções micorrízicas e, posteriormente, por uma proliferação das ramificações micorrízicas.

Diferentes níveis de fósforo não afetaram a infecção micorrízica em plântulas de *Eucalyptus calophylla*, expostas a solo com inóculo natural ou inoculadas com fungo não identificado. A formação de micorriza, no entanto, aumentou a absorção de fosfato em solos com níveis insuficientes do nutriente, sem apresentar aumento significativo no crescimento das plântulas (MALAJCZUK *et alii*, 1975).

Mudas de *Pseudotsuga menziesii* e *Pinus contorta*, produzidas em tubetes com substrato de vermiculita/turfa, recebendo cerca de metade da dosagem de nutrientes recomendada para viveiros comerciais, formaram ectomicorriza com seis isolados de *Pisolithus tinctorius* inoculados. A percentagem de plântulas infectadas, bem como a percentagem de raízes colonizadas, variou significativamente entre os isolados, mas nenhum deles aumentou o crescimento das mudas (MOLINA, 1979). Embora a redução dos níveis de adubação

tenha resultado em menor desenvolvimento das mudas, o autor acredita ser possível às mudas com ectomicorriza uma melhor "performance", comparada a das mudas maiores e sem ectomicorriza.

Segundo LE TACON & GARBAYE (1986), níveis elevados de elementos minerais no solo diminuem o número de micorrizas, e a inoculação de substratos artificiais, com fungos simbiontes, só é possível com a diminuição do nível de fertilidade.

Em experimentos realizados por SOARES *et alii* (1986), *Pisolithus tinctorius* desempenhou um importante papel no crescimento e absorção de fósforo por mudas de eucalipto. A eficiência da micorriza decresceu com o aumento da concentração de fósforo disponível no solo, sendo a expansão de ectomicorrizas nas raízes novas inibida em concentrações superiores a 33,9 ppm.

2.3.6. Fungicidas e inseticidas

Em experimentos realizados por MARX & ROWAN (1981), tratamentos com uma ou duas aplicações de captan (4,5 kg i.a./ha) ou benomyl (11,2 kg i.a./ha) aumentaram o desenvolvimento de ectomicorriza de *Pisolithus tinctorius* e *Thelephora terrestris*; PCNB (6,7 kg i.a./ha) não apresentou efeito, e benodanil (15,3 kg i.a./ha) apresentou um efeito negativo sobre a formação micorrízica em *Pinus taeda*. Sobre

o crescimento micelial, em laboratório, além de completa inibição por benodanil, houve um efeito inibitório de PCNB e benomyl (em doses elevadas) para *Pisolithus tinctorius*.

Em experimentos realizados por PAWUK & BARNETT (1981), houve maior formação de micorriza por *Pisolithus tinctorius* em *Pinus taeda*, crescendo em tubetes, com a aplicação máxima de benomyl testada (10 mg/tubete, a cada duas semanas).

KELLEY (1982), observou um decréscimo de 50% na área da colônia de *Pisolithus tinctorius*, em meio-de-cultura, a uma concentração de 1 µg de triadimefon por mililitro de meio e completa inibição a 5 µg/ml. Em testes de campo, não houve efeito significativo sobre o desenvolvimento micorrízico ou altura de plântulas, inclusive com o aparecimento de basidiocarpos do fungo.

CUDLIN *et alii* (1983) observaram que mancozeb limitou a viabilidade dos fungos *Pisolithus arrhyzum* e *Suillus granulatus*, e, portanto, o número de ectomicorrizas em *Pinus sylvestris*, no entanto, os maiores efeitos foram observados em condições assépticas e nas dosagens mais elevadas. Nenhum efeito de mancozeb sobre micorriza foi observado sob condição de viveiro (CUDLIN *et alii*, 1984).

Em trabalhos realizados por MARX *et alii* (1984), com inoculação de *Pisolithus tinctorius* em viveiro de pinus, captan aumentou a efetividade do inóculo, havendo maior

desenvolvimento ectomicorrízico e produção de corpos-de-frutificação pelo fungo. Segundo os autores, este efeito pode ter se dado devido a redução na população de microrganismos antagonicos. Os fungicidas maneb, chlorothalonil, captan e benomyl foram utilizados em diversas dosagens e número de aplicações, sem que seus efeitos fossem reportados.

DE BARR & MARX (1984) observaram que 0,44 g do inseticida carbofuran provocava um decréscimo no desenvolvimento ectomicorrízico, em *Pinus taeda* inoculado com *Pisolithus tinctorius*, o que não era observado para doses menores. Os autores aconselharam, portanto, o uso da quantidade mínima necessária ao controle das pragas, para evitar possíveis efeitos adversos à infecção ectomicorrízica.

Em experimentos realizados por SANTOS (1984) pôde ser observado um aumento no crescimento micelial de *Pisolithus tinctorius* a baixas concentrações de benomyl e terrazol, havendo inibição a 100 ppm. Carboxin, PCNB e thiram inibiram o desenvolvimento micelial em todas as concentrações, enquanto mancozeb apenas nas mais elevadas. Sobre o crescimento de *Thelephora terrestris*, carboxin, PCNB, thiram e mancozeb apresentaram efeito inibitório nas três concentrações (1, 10 e 100 ppm).

Sobre a formação de ectomicorriza por *Thelephora terrestris*, em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, SANTOS (1984) observou um estímulo com a aplicação de beno

myl 8 g i.a./m² (4 x 2 g/m²); um decréscimo, na percentagem de micorrizas formadas com captan, mancozeb e thiram, e inibição total com PCNB, nas mesmas dosagens.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Avaliação do crescimento micelial de *Pisolithus tinctorius* em cultura pura

Neste ensaio foram utilizados quatro isolados, de *Pisolithus tinctorius* de pinus e sete de eucalipto, listados na Tabela 1.

Um disco de 0,5 cm de colônias com cerca de 20 dias, foi colocado no centro de cada placa-de-petri, contendo meio de Melin-Norkrans modificado (MMN). Foram consideradas quatro placas por isolado.

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

As placas-de-petri foram mantidas a 25-28°C, em incubadora, e o diâmetro das colônias medido após 19 dias de incubação.

Tabela 1 - Origem dos isolados de *Pisolithus tinctorius* avaliados quanto ao crescimento micelial

Isolado	ORIGEM	
	Local	Hospedeiro
Marx 185	Athens, G.A. E.U.A.	<i>Pinus taeda</i>
P2	Macapã (AP)	<i>Pinus</i> sp.
P3 ¹	Piracicaba (SP)	<i>Pinus</i> sp.
p4 ¹	-	<i>Pinus taeda</i>
E1	Mogi Guaçu (SP)	<i>Eucalyptus grandis</i> ; <i>E. saligna</i>
E2	Mogi Guaçũ (SP)	<i>Eucalyptus grandis</i> ; <i>E. saligna</i>
E3	Mogi Guaçũ (SP)	<i>Eucalyptus grandis</i> ; <i>E. saligna</i>
E4	Rio Claro (SP)	<i>Eucalyptus grandis</i>
E5	Rio Claro (SP)	<i>Eucalyptus grandis</i>
E6	Anhembi (SP)	<i>Eucalyptus</i> sp.
E7	Tupi (SP)	<i>Eucalyptus citriodora</i>

¹ reisolados a partir do isolado Marx 185.

3.2. Avaliação da viabilidade do inóculo produzido em meio líquido

Quatro discos de 0,5 cm de diâmetro, de micélio dos isolados E 1 e 82-1 (fornecido pela pesquisadora Rosana F. Vieira do CPAC - EMBRAPA) de *Pisolithus tinctorius*, foram transferidos para frasco erlenmeyer de 250 ml, contendo

50 ml de meio MMN líquido. Foram preparados 3 frascos para cada isolado.

As culturas foram mantidas a 26°C, durante 38 dias. O meio-de-cultura foi descartado, e o conteúdo micelial de cada frasco triturado, em 40 ml de água estéril, em liquidificador, à velocidade baixa durante 10 segundos. A suspensão de micélio obtida foi plaqueada em meio MMN e MMN + 100 ppm de sulfato de estreptomicina. Utilizaram-se 3 placas-de-petri de cada meio.

O liquidificador foi desinfectado com álcool 70% e hipoclorito de sódio comercial 3:1, e em seguida lavado com água estéril. Procurou-se manter assepsia durante toda a operação.

As placas-de-petri, com os fragmentos miceliais, foram incubadas a 26°C. Após 8 dias, foi observada a proporção de fragmentos viáveis, para cada placa-de-petri.

3.3. Avaliação da compatibilidade fungo-hospedeiro

A técnica utilizada foi a do "papel-sanduíche", desenvolvida por CHILVERS *et alii* (1986), com algumas adaptações.

a. Preparo das plântulas para a inoculação

Sementes de *Eucalyptus grandis*, desinfectadas em hipoclorito de sódio comercial (2%) 2:1, por cerca

de 4 minutos, e lavadas em água destilada estéril por 4 a 6 minutos, foram plaqueadas em ágar-água 1%.

As placas foram mantidas sob lâmpadas fluorescentes-dia, em sala de incubação com temperatura de 26°C e fotoperíodo de 12 horas.

Após 11 dias, as plântulas foram transferidas para placas-de-petri contendo solução de Hoagland modificada por Sarruge (SARRUGE, 1975), adicionada de 15 g de ágar/l, recoberta com papel de filtro autoclavado. Sobre o sistema radicular foi colocada outra folha de papel de filtro. As raízes ficaram protegidas da luz, embrulhando-se metade da placa-de-petri com papel-alumínio.

As plântulas foram incubadas a 26°C e fotoperíodo de 12 h, sob lâmpadas fluorescentes-dia e gro-lux, em proporção 1:1, por mais 10 dias.

b. Preparo do inóculo

Foram transferidos 2 discos, de 0,5 cm de diâmetro, de micélio de *P. tinctorius*, isolados E 1 (selecionado em 3.1) e 82-1, para a superfície de papel-cartão (tamanho 6,0 x 6,0 cm) embebido em meio MMN e colocado sobre o mesmo meio em placas-de-petri.

O fungo foi incubado a 26°C por 20 dias.

c. Inoculação

Foi retirado o papel-de-filtro que cobria o sistema radicular e colocado, sobre o último, um papel-cartão contendo o micélio do fungo. O sistema radicular continuou protegido com papel-alumínio e as plântulas foram mantidas nas mesmas condições de incubação.

Algumas plântulas não receberam o inóculo, sendo consideradas testemunhas.

Devido a contaminações, o número de repetições variou, sendo de 6 plântulas para a testemunha, 9 plântulas para o isolado E 1 e 7 para o isolado 82-1.

As plântulas foram avaliadas, quanto aos parâmetros número de ramificações e comprimento do sistema radicular, após 14 dias de contato fungo-raiz.

Foram feitos cortes de 30 μ m de espessura, em micrótomo, e observados em microscópio óptico, para se comprovar a infecção micorrízica.

3.4. Avaliação da presença de ectomicorrizas em amostras de um viveiro comercial

A amostragem foi feita em viveiro da Champion Papel e Celulose Ltda. (Mogi Guaçu, SP), no mês de setembro/87.

As amostras se constituíram de subamostras do sistema radicular de mudas de *Eucalyptus grandis*, coletadas em diversos pontos do viveiro. Foram formadas amostras de mudas de 30, 60 e 90 dias.

As raízes foram preservadas em álcool-formol-ácido acético (AFA), posteriormente clarificadas segundo o processo de Phillips & Hayman, descrito por KORMANIK & McGRAW (1982), e observadas ao microscópio óptico.

3.5. Inoculação de mudas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*

a. Produção do Inóculo

O inóculo foi produzido com base na metodologia descrita por MARX *et alii* (1982).

Frascos com capacidade de 1 litro, contendo uma mistura de 700 ml de vermiculita + 20 ml de turfa moída, umedecida com 300 ml de meio MMN, foram autoclavados por 1 hora a 120°C. Cada frasco recebeu 4 discos de micélio de *P. tinctorius*, isolado E 1, com cerca de 0,7 cm de diâmetro.

Os frascos permaneceram à temperatura ambiente (25-30°C), e foram eliminados os que apresentaram qualquer contaminação.

Após 3 meses, o conteúdo do frasco foi lavado em água corrente, para retirar o resíduo de meio-de-cul-

tura, comprimido até perder todo o excesso de água e acondicionado em sacos plásticos.

O inóculo acondicionado foi mantido sob refrigeração por 24 horas.

b. Inoculação

O ensaio foi instalado em viveiro da Champion Papel e Celulose Ltda. (Mogi Guaçu), em fevereiro/87.

A inoculação foi feita por ocasião da semeadura. Tubetes de polietileno, com volume de 55 ml, receberam substrato até cerca de 2 a 3 cm de seu bordo superior, e sobre este foi colocado o inóculo. Logo após, completou-se o volume do recipiente, com substrato, para evitar a dessecação do inóculo.

O substrato se constituiu de 50% de turfa moída e 50% de vermiculita, e recebeu cerca de metade da adubação comumente utilizada no viveiro, 0,2 g da fórmula 8-17-6 (N-P-K).

Foram testadas 2 doses de inóculo, 2 e 4 ml, em 2 espécies de *Eucalyptus*, *E. grandis* e *E. urophylla*, num total de 6 tratamentos (incluindo as testemunhas). O delineamento experimental foi o de blocos casualizados. Cada parcela constou de 49 plantas, sendo avaliadas apenas dez mudas centrais.

As mudas não receberam tratamento com inseticidas ou fungicidas. As adubações complementares foram feitas nas dosagens geralmente utilizadas no viveiro, porém com algum atraso:

- mudas com 42 dias - 0,15 g/tubete de 8:17:6
- mudas com 64 dias - 0,20 g/tubete de 8:17:6
- mudas com 94 dias - 0,15 g/tubete de 8:17:6 + FTE
- mudas com 114 dias - 0,20 g/tubete de 8:17:6
- mudas com 163 dias - 0,20 g/tubete de 8:17:6 + FTE.

Após cerca de 6 meses (170 dias) foi feita a avaliação quanto à altura e diâmetro do colo das mudas.

Algumas plantas foram amostradas para a observação microscópica do sistema radicular. As raízes sofreram o processo de clarificação de Phillips & Hayman.

3.6. Inoculação de mudas de *Eucalyptus grandis* com 45 dias de idade

Os ensaios foram conduzidos com mudas de duas épocas de semeadura, consideradas como mudas "de verão" e "de inverno". Cada tipo de muda recebeu tratamentos, principalmente de adubação, adequados a sua época de cultivo.

3.6.1. Mudas "de verão"

a. Produção do inóculo

Frascos erlenmeyer de 250 ml, com 50 ml de meio MMN líquido, receberam 2 discos (0,8 cm de diâmetro) de micélio de *P. tinctorius*. Foram utilizados dois isolados do fungo, E 1 e 82-1

O fungo permaneceu incubado a 26°C por 27 dias.

O conteúdo micelial de 5 frascos, após a retirada do meio-de-cultura, foi triturado em 200 ml de água destilada, em liquidificador à velocidade de 90 x 100 rpm, por 30 segundos.

b. Inoculação

A inoculação foi feita em viveiro da Champion Papel e Celulose Ltda. (Mogi Guaçu), em novembro/87.

Mudas de *Eucalyptus grandis*, com 45 dias de idade, foram inoculadas com 2 ml da suspensão de fragmentos de micélio, descrita acima. A inoculação se deu pela injeção do inóculo cerca de 2 cm abaixo da região do colo.

As mudas estavam em tubetes de 55 ml, contendo substrato com 50% de turfa moída e 50% de vermiculita, acrescido de 12 kg de superfosfato simples, 2 kg de sulfato de amônia, 500 g de KCl e 500 g de FTE/m³.

Foram considerados 3 tratamentos, sendo testemunha, isolados E 1 e 82-1 de *Pisolithus tinctorius*, e 8 repetições. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Cada parcela constou de 10 plantas.

As mudas prosseguiram em viveiro contínuo (MORO *et alii*, 1988), recebendo as adubações de rotina. Não receberam aplicações de fungicidas.

Após 45 dias da inoculação, foi feita a ava-

liação através dos parâmetros diâmetro do colo, altura e peso da parte aérea e sistema radicular. Foram coletadas amostras do sistema radicular, para observações ao microscópio, após a clarificação das raízes.

3.6.2. Mudas "de inverno"

a. Produção de inóculo

Frascos erlenmeyer de 250 ml, com 50 ml de meio MMN líquido, receberam 4 discos (0,5 cm de diâmetro) de micélio de *P.tinctorius*. Foram utilizados dois isolados do fungo, E 1 e 82-1.

O fungo permaneceu incubado a 26°C por 38 dias.

O conteúdo micelial de 5 frascos, após a retirada do meio-de-cultura, foi triturado em 200 ml de água destilada, em liquidificador à velocidade de 90 x 100 rpm, por 4-5 segundos.

b. Inoculação

O ensaio foi conduzido em viveiro da Champion Papel e Celulose Ltda. (Mogi Guaçu), sendo feita a inoculação em abril/88.

Mudas de *Eucalyptus grandis*, produzidas em tubetes, com 45 dias de idade, foram inoculadas através de injeção de 2 ml da suspensão de fragmentos de micélio, cerca de 2 cm abaixo da região do colo.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 3 tratamentos (testemunha, isolado E 1 e isolado 82-1) e 8 repetições. Cada parcela foi constituída por 10 plantas.

O substrato foi uma mistura de 50% de turfa moída, 25% de vermiculita e 25% de palha de arroz carbonizada, adicionada de 12 kg de superfosfato simples, 2 kg de sulfato de amônia, 500 g de KCl e 500 g de FTE/m³.

As mudas foram conduzidas em viveiro contínuo (MORO *et alii*, 1988), recebendo as adubações de rotina. Receberam pulverizações semanais com benomyl, captan, mancozeb ou chlorothalonil, aplicados alternadamente, na dosagem de 0,4 g do produto/m².

Após 85 dias da inoculação, foi feita a avaliação quanto a diâmetro do colo, altura e peso da parte aérea. Algumas plantas foram amostradas, e suas raízes conservadas em AFA.

As amostras do sistema radicular sofreram clarificação e foram observadas em microscópio óptico.

3.7. Inoculação de mudas de *Eucalyptus grandis* com 75 dias

a. Produção de inóculo

Descrita para mudas "de inverno" com 45 dias.

b. Inoculação

A inoculação foi feita em abril/88, em viveiro da Champion Papel e Celulose Ltda.

Mudas com 75 dias, de *E. grandis*, em tubetes, foram inoculadas com a suspensão de fragmentos de micélio.

Metade das mudas recebeu o inóculo através de injeção de 2 ml da suspensão, cerca de 2 cm abaixo da região do colo. A outra metade foi inoculada, retirando-se as mesmas do tubete e banhando-se as raízes da periferia, do bloco formado pelo substrato e sistema radicular, com cerca de 2 ml da suspensão.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo testados 2 isolados do fungo *Pisolithus tinctorius* (E 1 e 82-1) e 2 métodos de inoculação. Incluindo-se as testemunhas de cada método de inoculação, foram considerados 6 tratamentos, com 4 repetições. Cada parcela se constituiu de 10 plantas.

O substrato, as adubações e os tratamentos fitossanitários foram os mesmos descritos para mudas de 45 dias, "de inverno".

Após 85 dias da inoculação, foi feita a avaliação através do diâmetro do colo, altura e peso da parte aérea. Foram retiradas amostras do sistema radicular, conservadas em AFA, para a observação em microscópio óptico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação do crescimento micelial de *P. tinctorius* em cultura pura

Os isolados de *P. tinctorius* obtidos em povoamentos de eucalipto, mostraram uma taxa de crescimento menor do que aqueles isolados de basidiocarpos encontrados em talhões de pinus (Tabela 2), além de coloração mais clara. Estas diferenças entre isolados de pinus e eucalipto, foram também observadas por YOKOMIZO & KRÜGNER (1983/85b).

Mesmo entre os isolados de eucalipto, houve uma variação no crescimento, sendo que um dos isolados apresentou diâmetro médio da colônia significativamente menor do que os demais (Tabela 2). MOLINA (1979) observou variação no crescimento entre diversos isolados de *P. tinctorius* obtidos em povoamento de pinus, enquanto CHILVERS & GUST (1982b) fizeram o mesmo tipo de observação para isolados de eucalipto.

O isolado E1 foi escolhido para as inoculações por apresentar uma taxa de crescimento semelhante a dos isolados de pinus. Segundo GRENVILLE *et alii* (1986), o isola

do que apresenta maior crescimento em cultura pura, é o mais vigoroso para infecções micorrízicas. Para TRAPPE (1977), a seleção de um isolado com taxa de crescimento elevada, é importante para a produção de inóculo. MARX (1981) não constatou relação entre o crescimento de *P. tinctorius* em cultura pura e sua capacidade de formar micorriza.

Tabela 2 - Crescimento de *Pisolithus tinctorius* em meio MMN, com 19 dias de incubação

Isolado	Diâmetro das colônias (cm)
Marx 185	7,300 ab
P2	8,712 a
P3	7,925 a
P4	8,262 a
E1	5,184 bc
E2	2,650 d
E3	4,575 cd
E4	3,362 cd
E5	3,562 cd
E6	4,175 cd
E7	4,300 cd

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ao nível de 1% de significância.

4.2. Avaliação da viabilidade do inóculo produzido em meio líquido

O inóculo obtido pela trituração de micélio crescendo em meio líquido, se mostrou viável em meio-de-cultura. A possibilidade de trituração do micélio de fungos

ectomicorrízicos, sem perda de viabilidade, já havia sido constatada anteriormente. HUNG & TRAPPE (1983) observaram que micélio de *P. tinctorius* não tolerou a trituração por 25 segundos, enquanto outros fungos o fizeram sem perda de viabilidade. LAPEYRIE & BRUCHET (1983) constataram um declínio na viabilidade deste tipo de inóculo quando o micélio possuía mais do que 3 semanas de idade. Quanto ao tempo de trituração, LAPEYRIE & BRUCHET (1985) recomendam dois segundos para que o inóculo permaneça viável e com boa dispersão e LOPES *et alii* (1987), 3 segundos em liquidificador. No presente trabalho, as colônias possuíam mais do que 4 semanas de incubação, e foram trituradas por 10 segundos, sem perda de viabilidade (Tabela 3).

Os meios-de-cultura utilizados nos testes de viabilidade do inóculo não mostraram influência sobre a mesma. Aquelas colônias que apresentaram uma viabilidade zero ou muito baixa, sofreram contaminação com *Penicillium* sp. durante a trituração, prejudicando o teste em meio-de-cultura.

4.3. Avaliação da compatibilidade fungo-hospedeiro

Inoculados em plântulas de *Eucalyptus grandis*, *in vitro*, os dois isolados (E1 e 82-1) se mostraram capazes de infectar as raízes (Tabela 4). A micorriza formada se caracterizou pela presença de um manto de hifas entrelaçadas e de rede de Hartig restrita a uma ou duas camadas de

Tabela 3 - Viabilidade do inóculo micelial de *Pisolithus tinctorius*, triturado em liquidificador durante 10 segundos.

Meio para teste	Isolado	Viabilidade (%)		
		Colônia 1	Colônia 2	Colônia 3
MMN	E1	79,7	0	0
	82-1	92,7	89,7	61,7
MMN + estreptomicina	E1	39,7	11,3	0
	82-1	94,0	43,7	70,0

Tabela 4 - Desenvolvimento micorrízico em cortes de raízes de *Eucalyptus grandis*, inoculadas com *Pisolithus tinctorius in vitro*

Isolado	Com manto (%)	Rede de Hartig (%)
E1	89,96	50,00
82-1	82,93	41,46

células (Figura 1), estrutura anteriormente observada por YOKOMIZO & KRÜGNER (1983/85a), GRENVILLE *et alii* (1986) e MASSICOTTE *et alii* (1987).

A infecção micorrízica *in vitro*, não afetou o crescimento radicular (Tabela 5), embora um crescimento mais lento de raízes infectadas por *P. tinctorius* tenha sido observado por CHILVERS & GUST (1982b). As raízes inoculadas apresentaram maior ramificação, o que também foi obser-

vado por CHILVERS & GUST (1982b) e MASSICOTTE *et alii* (1987).

Tabela 5 - Efeito de *Pisolithus tinctorius* sobre o desenvolvimento radicular de *Eucalyptus grandis*, *in vitro*

Isolado	Comprimento sistema radicular (cm)	Nº médio de ramificações
Testemunha	3,617a	1,50 b
E1	4,534a	9,23a
82-1	3,114a	4,00ab

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

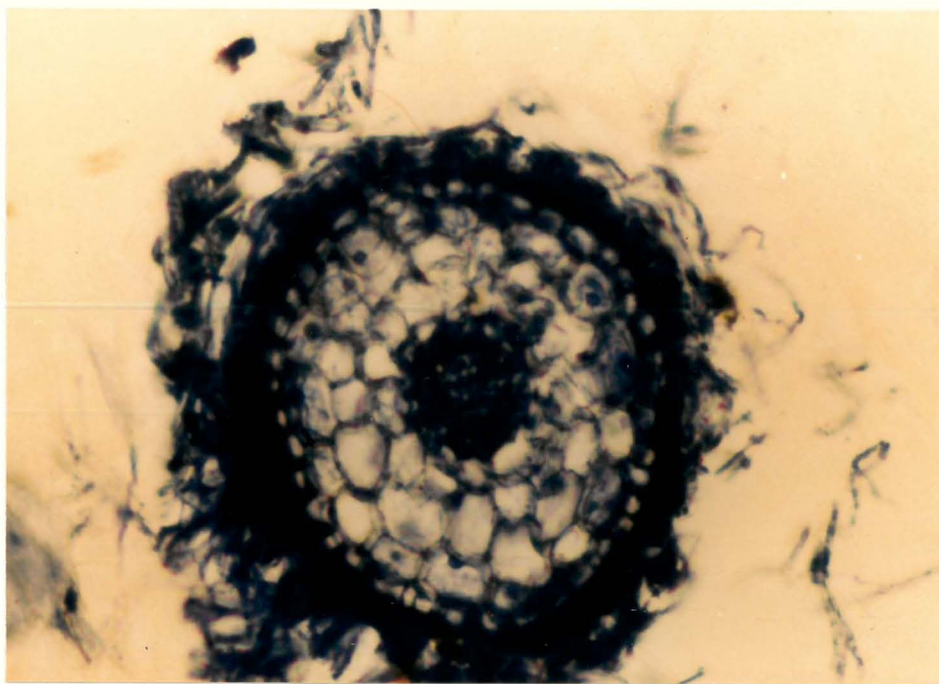


Figura 1 - Corte transversal de raiz de *Eucalyptus grandis* inoculada com *Pisolithus tinctorius in vitro* apresentando manto e rede de Hartig na epiderme.

4.4. Avaliação da presença de ectomicorrizas em uma amostra de viveiro comercial

Mudas de *Eucalyptus grandis*, retiradas de um viveiro comercial, não apresentaram ectomicorrizas típicas e nem indícios da presença de fungos ectomicorrízicos (Tabela 6). As mudas estavam com 30, 60 e 90 dias, e sua semeadura fora feita nos meses de agosto, julho e junho, respectivamente. SHWAN (1984) encontrou apenas 9 a 30% de raízes com micorriza em um lote de mudas semeado em junho, contra 31 a 48% em outro lote com semeadura em setembro.

Tabela 6 - Desenvolvimento micorrízico em raízes de mudas de *Eucalyptus grandis*, amostradas em viveiro comercial

Idade das mudas (dias)	% raízes com manto	% raízes sem manto	
		com micélio	sem micélio
30	0	16,67	83,33
60	0	39,62	60,38
90	0	54,93	45,07

4.5. Inoculação de mudas de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* com o fungo *P. tinctorius*

A inoculação de mudas de *E. grandis* e *E. urophylla*, com inóculo produzido em uma mistura de vermiculita/turfa, umedecida com meio MMN, não resultou em formação de ectomicorrizas típicas, nem em efeito significativo sobre o

crescimento das plantas (Tabela 8). O mesmo tipo de inóculo foi utilizado por YOKOMIZO & KRÜGNER (1983/85b) em *E. saligna* e *E. citriodora* sem sucesso. Em mudas de *Pinus* sp., esta técnica de inoculação é eficiente, sendo inclusive utilizada em escala comercial (MARX *et alii*, 1984).

Na Tabela 7 pode ser observado que 24,67% das raízes de *E. grandis* e 52,94% de *E. urophylla*, de parcelas não inoculadas, apresentaram hifas entrelaçadas, formando um manto, o que indica a contaminação por fungos ectomicorrízicos nativos da região.

As mudas de *E. urophylla* apresentaram uma maior colonização por fungos, sendo que cerca de 5% das raízes observadas não apresentaram hifas em sua superfície. As mudas de *E. grandis* não inoculadas apresentaram 31,17% das raízes sem a presença de hifas; enquanto apenas 21,43% e 15,28% das mesmas não apresentaram hifas na superfície quando inoculadas com 2 e 4 ml do inóculo, respectivamente (Tabela 7).

Foi anotada a presença de grampos-de-conexão nas hifas, sobre cerca de 30,85% das raízes de mudas de *E. grandis* não inoculadas, 44,45% nas inoculadas com 2 ml do inóculo a 45,88% com 4 ml. No caso de *E. urophylla*, 52,94% das raízes das mudas testemunhas apresentaram hifas com grampo-de-conexão, 71,21% das inoculadas com 2 ml e 51,43% com 4 ml do inóculo.

GARBAYE *et alii* (1988) obtiveram um aumento no crescimento de mudas de eucalipto com a inoculação de micélio de *P. tinctorius* produzido em vermiculita/turfa. No entanto, os autores fizeram a inoculação por ocasião do transplante, e o inóculo foi colocado na cova feita para receber a muda, garantindo perfeito contato fungo-raiz. Após 4 meses, embora as mudas inoculadas se apresentassem mais vigorosas, a percentagem de ectomicorrizas era a mesma, para tratamentos com e sem inoculação, sendo que as micorrizas típicas de *P. tinctorius* desapareceram após cerca de 20 meses, no campo.

Tabela 7 - Desenvolvimento micorrízico em raízes de mudas de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*, com 170 dias de idade, inoculadas com *Pisolithus tinctorius*.

Espécie	Doses do inóculo	% raízes com manto	% raízes sem manto	
			com micélio	sem micélio
<i>E. grandis</i>	Testemunha	24,67	44,16	31,17
	2 ml	25,00	53,57	21,43
	4 ml	8,34	76,38	15,28
<i>E. urophylla</i>	Testemunha	52,94	41,18	5,88
	2 ml	83,60	11,48	4,98
	4 ml	54,68	40,63	4,69

Tabela 8 - Efeito da inoculação de *Pisolithus tinctorius* sobre o crescimento de mudas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*; após 170 dias da semeadura.

Espécie	Doses do inóculo	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	IV ¹ (cm ³)
<i>E. grandis</i>	Testemunha	25,96a	2,31a	1,396a
	2 ml	27,66a	2,50a	1,739a
	4 ml	26,88a	2,72a	1,990a
	(média)	(26,84)X	(2,51)Y	
<i>E. urophylla</i>	Testemunha	25,29A	3,54A	3,268A
	2 ml	24,36A	3,55A	3,073A
	4 ml	24,72A	3,54A	3,152A
	(média)	(24,79)Y	(3,54)X	

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

¹ Índice volumétrico = $d^2 \cdot h$

As inoculações feitas em mudas de *E. grandis* com 45 dias, utilizando-se fragmentos de micélio de *P. tinctorius*, também não resultaram na formação de ectomicorrizas visíveis, apesar das diferenças encontradas na percentagem de raízes com manto ou infectadas por hifas típicas de basidiomicetos, que poderiam indicar uma associação não completamente estabelecida. Este tipo de avaliação foi utilizada por VIEIRA (1984), que conseguiu infecção com apenas um dos

três isolados de *P. tinctorius* testados em *E. grandis*.

As mudas "de verão" inoculadas com o isolado E1 apresentaram uma maior percentagem de raízes com manto, seguidas daquelas inoculadas com o isolado 82-1 e das testemunhas, que apresentaram apenas 1% das raízes observadas com manto fúngico (Tabela 9). Apenas 4,1% das raízes observadas se apresentaram associadas a hifas com grampo-de-conexão, nas mudas não inoculadas. Nas mudas inoculadas com os isolados E1 e 82-1, foi observado grampo-de-conexão em hifas sobre 25,0 e 14,6% das raízes, respectivamente.

Não foi observado manto fúngico na amostra de raízes retirada de mudas "de inverno" não inoculadas ou inoculadas com o isolado 82-1 (Tabela 10). Grampo-de-conexão foi encontrado em hifas sobre apenas 1,3% das raízes de mudas testemunhas, 17% nas inoculadas com o isolado E1 e 10% com 82-1.

Não houve diferença significativa entre altura, diâmetro e peso da parte aérea de mudas inoculadas e não inoculadas, aos 45 dias, com suspensão de fragmentos de micélio de *P. tinctorius*. No entanto, pelas Tabelas 11 e 12, se pode observar que houve uma tendência ao maior desenvolvimento de mudas, nas parcelas com inoculação.

As mudas inoculadas aos 75 dias não mostraram aumento em seu desenvolvimento e nem micorrizas formadas por *P. tinctorius* (Tabela 13). Em um dos tratamentos, no entanto,

Tabela 9 - Desenvolvimento micorrízico em raízes de mudas de *Eucalyptus grandis*, com 90 dias de idade, inoculadas com suspensão de micélio de *P. tinctorius* aos 45 dias.

Isolado	% raízes com manto	% raízes sem manto	
		com micélio	sem micélio
Testemunha	1,03	56,70	42,27
E1	19,31	72,74	7,95
82-1	9,70	53,41	36,89

Tabela 10 - Desenvolvimento micorrízico em raízes de mudas de *Eucalyptus grandis*, com 130 dias de idade, inoculadas com suspensão de micélio de *P. tinctorius* aos 45 dias.

Isolado	% raízes com manto	% raízes sem manto	
		com micélio	sem micélio
Testemunha	0,00	45,46	54,54
E1	2,00	81,00	17,00
82-1	0,00	68,88	31,12

Tabela 11 - Efeito da inoculação de suspensão de micélio de *Pisolithus tinctorius* sobre o desenvolvimento de mudas "de verão" de *Eucalyptus grandis*, com 90 dias de idade, inoculadas aos 45 dias.

Isolado	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	IV ¹ (cm ³)	PSPA ² (g)	PSSR ³ (g)
Testemunha	14,64*	2,037	0,6111	2,467	0,727
E1	15,04	2,125	0,6835	2,611	0,774
82-1	15,15	2,097	0,6705	2,582	0,707

* As médias não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

¹ Índice volumétrico = $d^2 \cdot h$

² Peso seco da parte aérea (5 plantas)

³ Peso seco do sistema radicular (4 plantas)

Tabela 12 - Efeito da inoculação de suspensão de micélio de *Pisolithus tinctorius* sobre o desenvolvimento de mudas "de inverno" de *Eucalyptus grandis*, com 130 dias de idade, inoculadas aos 45 dias.

Isolado	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	IV ¹ (cm ³)	PSPA ² (g)
Testemunha	28,15*	3,628	3,7589	5,776
E1	28,43	3,743	4,0006	5,902
82-1	30,72	3,829	4,5188	5,991

* As médias não diferiram entre si pelo teste de Tukey (5%).

¹ Índice volumétrico = $d^2 \cdot h$

² Peso seco da parte aérea (5 plantas).

(micêlio do isolado 82-1 colocado na periferia do sistema radicular) foram encontradas algumas raízes com manto (Tabela 14).

A incidência de hifas com grampo-de-conexão foi baixa, ficando por volta de 1 a 2% do sistema radicular, com exceção das mudas inoculadas com o isolado E1 por injeção que apresentaram 8,6% das raízes com hifas típicas de basidiomicetos e das mudas que receberam o isolado 82-1 na superfície do sistema radicular com 21,8%.

A retirada das mudas do tubete, nesta idade, para que as mesmas fossem inoculadas, não prejudicou o sistema radicular a ponto de refletir no crescimento das plantas. As mudas deste ensaio sofreram danos causados por *Botrytis cinerea* e falta de água.

Em três dos quatro ensaios realizados em viveiro, houve uma tendência ao maior desenvolvimento das mudas inoculadas, embora as diferenças não fossem significativas. MALAJCZUK *et alii* (1975) citam a colonização de raízes de *Eucalyptus* sp. por fungos ectomicorrízicos, sem a formação de micorriza, com efeito sobre o hospedeiro. Efeito da inoculação, sem micorriza típica, também foi encontrado por IMAÑA & PRADO JUNIOR (1979) e CHILVERS & GUST (1982b).

Segundo SINGH & KUMAR (1966), embora a associação micorrízica em eucalípto não se mostre obrigatória

Tabela 13 - Efeito da inoculação de suspensão de micélio de *Pisolithus tinctorius* sobre o desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis*, com 160 dias de idade, inoculadas aos 75 dias.

Isolado	Método de inoculação	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	IV (cm ³)	PSPA (g)
Testemunha	injeção	37,81*	4,100	6,376	8,200
	deposição	35,45	4,361	6,739	7,245
E1	injeção	33,28	4,307	6,134	8,485
	deposição	31,05	4,336	5,825	6,902
82-1	injeção	33,32	4,439	6,558	6,610
	deposição	37,55	4,343	7,097	8,072

* As médias não diferiram entre si pelo teste de Tukey (5%).

¹ Índice volumétrico = $d^2 \cdot h$

² Peso seco da parte aérea (5 plantas)

Tabela 14 - Desenvolvimento micorrízico em raízes de mudas de *Eucalyptus grandis*, com 160 dias de idade, inoculadas com suspensão de micélio de *P. tinctorius*, aos 75 dias.

Isolado	Método de inoculação	% raízes com manto	% raízes sem manto	
			com micélio	sem micélio
Testemunha	injeção	-	60,53	39,47
	deposição	-	54,55	45,45
E1	injeção	-	76,73	23,27
	deposição	-	67,95	32,05
82-1	injeção	-	63,33	36,67
	deposição	4,60	80,46	14,94

na fase de muda, pode ser importante aos anos subsequentes. Portanto, o efeito da simbiose sobre *Eucalyptus* spp., para ser melhor esclarecido, deve ser estudado em mudas inoculadas em condições de assepsia total ou parcial, com alto potencial de inóculo, já que a técnica de inoculação em viveiro não está dominada para este gênero, e por períodos de tempo mais longos.

As dificuldades em se conseguir inoculação efetiva em mudas de *Eucalyptus* spp., já haviam sido consideradas por MULLETTE (1976) e CHILVERS *et alii* (1986), que procuraram técnicas alternativas de inoculação.

Mesmo havendo infecção e formação de micorriza *in vitro*, o alto potencial de inóculo envolvido, nestas condições, e a disponibilidade de carboidratos solúveis ao fungo, criam uma situação artificial que pode não corresponder a capacidade de formar micorrizas do fungo em viveiro. Segundo CHILVERS (1968), os testes *in vitro* indicam apenas a habilidade do fungo em infectar o hospedeiro, o que não significa que o faça em quaisquer condições ambientes. DUDDRIDGE (1986a, 1986b), observou que a presença de carboidratos no meio-de-cultura aumentou a agressividade do fungo ectomicorrízico.

Além disso, os experimentos conduzidos *in vitro*, geralmente envolvem somente o hospedeiro e o fungo simbiote. Sob condições naturais a ocorrência de fungos

antagônicos pode apresentar efeito significativo sobre a infecção micorrízica. SUMMERBELL (1987) observou um efeito inibitório de *Trichoderma* spp. sobre a formação de micorrizas por *Laccaria laccata*.

Apesar de viável em meio-de-cultura, o inóculo formado por fragmentos de micélio, pode não ser capaz de infectar o hospedeiro quando injetado no solo ou substrato artificial. Para que ocorra a infecção, é necessário que se garanta o contato fungo-raiz, conforme sugerido por CHILVERS *et alii* (1986). MUNG & MOLINA (1986) observaram que o inóculo de *P. tinctorius*, produzido em vermiculita/turfa que apresentava micélio abundante e com bom crescimento em meio-de-cultura, não foi capaz de formar micorriza em mudas de *Pseudotsuga menziesii*, produzidas em tubetes.

MULLETTE (1976) atribuiu as falhas de inoculação em *Eucalyptus* spp. ao desconhecimento dos fatores ambientais favoráveis a associação simbiótica. GARBAYE *et alii* (1988) conseguiram a formação de ectomicorrizas com um isolado de *P. tinctorius*, enquanto que o outro isolado testado não foi capaz de infectar o hospedeiro, o que atribuíram a fatores ambientais não identificados.

O efeito de vários fatores ambientais, ou de cultivo, sobre a formação de micorrizas foi estudado por diversos autores, principalmente em mudas de *Pinus* spp. e *Quercus* spp. (MARX & ROWAN, 1981; EKWEBELAM & REID, 1983;

SANTOS, 1984; DIXON *et alii*, 1985). Sobre mudas de *Eucalyptus* spp., no entanto, estes fatores foram bem menos estudados.

A inoculação de mudas de *Eucalyptus* spp., em viveiro comercial, poderá se tornar viável, se conhecidos os fatores que influenciam a mesma, as práticas culturais forem adaptadas aos mesmos, assim como as técnicas de inoculação.

DIXON *et alii* (1985) observaram que a irrigação diária, inibiu a formação de micorrizas, o mesmo ocorrendo com a fertilização excessiva. LETACON & GARBAYE (1986), sugerem a redução nos níveis de fertilização das mudas para que a inoculação tenha sucesso. No entanto, fertilização e irrigação são práticas que atuam diretamente sobre o desenvolvimento das mudas, e uma redução das mesmas prejudicará o crescimento das plantas. MOLINA (1979), conseguiu a formação de micorriza com a inoculação de *P. tinctorius* em um viveiro comercial, mantendo as condições culturais de rotina com exceção de uma redução de 50% na quantidade de adubo. As mudas obtidas, apesar de infectadas pelo fungo, eram menores do que aquelas que receberam adubação normal.

Muitas vezes, a ocorrência de uma doença ou praga põe em risco todo o viveiro, levando ao uso exagerado de produtos químicos. Grande parte dos fungicidas e inseticidas testados não apresentaram efeito sobre o desenvolvimento micorrízico, embora inibissem o crescimento do fungo em cultura pura (MARX & ROWAN, 1981; KELLEY, 1982; CUDLIN *et alii*,

1984). Em alguns casos, a aplicação de fungicidas, como beno₂myl e captan, aumenta a eficiência de inoculação (PAWUK & BARNETT, 1981; MARX *et alii*, 1984; SANTOS, 1984). No entanto, é necessário que se preste atenção aos produtos e doses a serem utilizados, pois um decréscimo na formação de micorrizas já foi observado por SANTOS (1984) com a aplicação de captan, mancozeb, thiram e PCNB, e por DEBARR & MARX (1984) para o inseticida carbofuran em doses elevadas.

Portanto, estudos são necessários, no sentido de determinar as alterações a serem feitas para o sucesso da inoculação, e se testar a viabilidade das mesmas em um viveiro comercial.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- a. o contato do fungo *P. tinctorius* com o sistema radicular de *Eucalyptus grandis*, em condições axênicas, resulta na formação de ectomicorriza típica, aumentando a ramificação de raízes;
- b. micélio de *P. tinctorius* triturado e liquidificado por 10 segundos, se apresenta viável em meio-de-cultura;
- c. a inoculação de mudas de *E. grandis* e *E. urophylla* com inóculo produzido em vermiculita/turfa, e de *E. grandis* com micélio triturado, não apresentou efeito significativo sobre o desenvolvimento das mudas ou formação de ectomicorriza típica, nas condições de um viveiro comercial, em tubetes;
- d. as mudas "de inverno" de *E. grandis* em viveiro comercial não apresentaram ou apresentaram uma percentagem muito pequena de infecção por fungos ectomicorrízicos, no ano de 1987;

e. as mudas de *E. grandis* inoculadas por ocasião da semeadura ou aos 45 dias, apresentaram uma maior percentagem de raízes com manto e tendência ao maior desenvolvimento. Este resultado sugere a necessidade da continuação de estudos na área, visando o aprimoramento da técnica para sua aplicação prática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHTON, D.H. Studies on the mycorrhizae of *Eucalyptus regnans* F. Muell. *Aust. J. Bot.*, Melbourne, 24:723-41, 1976.
- BAKSHI, B.K. Mycorrhiza in eucalypts in India. *Indian Forester*, DehraDun, 92(1):19-20, 1966.
- BARROS, H.F.; BRANDI, R.M.; REIS, M.S. Micorriza em eucalipto. *Revista Árvore*, Viçosa, 2(2):130-140, 1978.
- BETTIOL, W. & KRÜGNER, T.L. Influência da matéria orgânica na formação de ectomicorrizas em mudas de *Pinus* por *Pisolithus tinctorius* e *Thelephora terrestris*. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 21(6):619-624, junho 1986.
- CARVALHO, A.M.F.; PEREIRA, A.G.; AUER, C.G. Distribuição de basidiocarpos de *Pisolithus tinctorius* em talhões de *Eucalyptus* spp., na região de Alfenas, M.G. In: REUNIÃO BRAS. SOBRE MICORRIZAS, 2., São Paulo, 1987. *Anais*. São Paulo, Inst. de Botânica, 1987. p.29.

- CARVALHO, E.F. & MUCHOVET, R.M.C. Comportamento de mudas de *Eucalyptus grandis* na presença de fungos endo e ectomícorrizicos. In: REUNIÃO BRAS. SOBRE MICORRIZAS, 2., São Paulo, 1987. Anais. São Paulo, Inst. de Botânica, 1987. p.3.
- CHEVALIER, G. La mycorhization contrôlée em pépinière forestière possibilités d'application aux conteneurs. *Revue Forestière Française*, Nancy, 37(2):93-106, 1985.
- CHILVERS, G.A. Some distinctive types of eucalypt mycorrhiza. *Australian Journal of Botany*, Melbourne, 16:49-70, 1968.
- CHILVERS, G.A. Host range of some eucalypt mycorrhizal fungi. *Aust. J. Bot.*, Melbourne, 21:103-11, 1973.
- CHILVERS, G.A.; DOUGLASS, P.A.; LAPEYRIE, F.F. A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. *New Phytologist*, Cambridge, 103:397-402, 1986.
- CHILVERS, G.A. & GUST, L.W. The development of mycorrhizal populations on pot-grown seedlings of *Eucalyptus st-johnii* R.T. Bak. *The New Phytologist*, Cambridge, 90: 677-699, 1982a.
- CHILVERS, G.A. & GUST, L.W. Comparison between the growth rates of mycorrhizas, uninfected roots and a mycorrhizal fungus of *Eucalyptus st-johnii* R.T. Bak. *New Phytologist*, Cambridge, 91:453-466, 1982b.

- CHILVERS, G.A., LAPEYRIE, F.F.; HORAN, D.P. Ectomycorrhizal vs. endomycorrhizal fungi within the same root system. *New Phytologist*, Cambridge, 107:441-448, 1987.
- CHILVERS, G.A. & PRYOR, L.D. The structure of eucalypt mycorrhizas. *Australian Journal of Botany*, Melbourne, 13:245-59, 1965.
- CHU-CHOU, M. & GRACE, L.J. *Hymenogaster albus* - a mycorrhizal fungus of *Eucalyptus* in New Zealand. *New Zealand Journal of Forestry Science*, Rotorua, 11(2):186-90, 1981.
- CUDLIN, P.; MEJSTRIK, V.; SKOUPÝ, J. Effect of pesticides on ectomycorrhizae of *Pinus sylvestris* seedlings. *Plant and Soil*, The Hague, 71:353-361, 1983.
- CUDLIN, P.; SKOUPY, J.; MEJSTRIK, J. Effect of pesticides on mycorrhiza formation and seedling growth in scots pine (*Pinus sylvestris*). *Sbornik Ustavu Aplikovaně Ekologie a Ekotechniky Vysokě Školy Zemedelské Praze*. Czechoslovakia, 1:149-169, 1984. Apud: *Forestry Abstracts*, Oxford, 48(11): 684, 1987. (Resumo).
- DE BARR, G.L. & MARX, D.H. Carbofuran affects and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings. *Southern Journal of Applied Forestry*, Washington, 8(1):13-16, 1984.

DIXON, R.K.; BEHRNS, G.T.; GARRET, H.E.; COX, G.S.; SANDER, I.L. Synthesis of ectomycorrhizae on container-grown oak seedlings. *Southern Journal of Applied Forestry*, Washington, 9(2):95-99, 1985.

DUDDRIDGE, J.A. The development and ultrastructure of ectomycorrhizas III. Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevellei* and 11 species of ectomycorrhizal hosts *in vitro* in the absence of exogenous carbohydrate. *New Phytologist*, Cambridge, 103(3):457-464, 1986a.

DUDDRIDGE, J.A. The development and ultrastructure of ectomycorrhizas IV. Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevillii* and a number of ectomycorrhizal hosts *in vitro* in the presence of exogenous carbohydrate. *New Phytologist*, Cambridge, 103(3):465-471, 1986b.

EKWEBELAM, S.A. & REID, C.P.P. Effect of light, nitrogen fertilization and mycorrhizal fungi on growth and photosynthesis of lodgepole pine seedlings. *Can. J. For. Res.*, Ottawa, 13:1099-1106, 1983.

GARBAYE, J.; DELWAULLE, J.C.; DIANGANA, D. Growth response of Eucalypts in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. *Forest Ecology and Management*, Amsterdam 24:151-157, 1988.

- GIBSON, F.; FOX, F.M.; DEACON, J.W. Effects of microwave treatment of soil on growth of birch (*Betula pendula*) seedlings and infection of them by ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, Cambridge, 108:189-204, 1988.
- GRAND, L.F. Distribution plant associates and variation in basidiocarps of *Pisolithus tinctorius* in the United States. *Mycologia*, Lancaster, 68:672-677, 1976.
- GRENVILLE, D.J.; PETERSON, R.L.; ASHFORD, A.E. Synthesis in Growth Pouches of mycorrhizae between *Eucalyptus pilularis* and several strains of *Pisolithus tinctorius*. *Aust. J. Bot.*, Melbourne, 34:95-102, 1986.
- HUNG, L.L. & MOLINA; R. Temperature and time in storage influence the efficacy of selected isolates of fungi in commercially produced ectomycorrhizal inoculum. *Forest Science*, Washington, 32(2):534-545, 1986.
- HUNG, L.L. & TRAPPE, J.M. Growth variation between and within species ectomycorrhizal fungi in response to pH *in vitro*. *Mycologia*, Lancaster, 75(2):234-241, 1983.
- IMANA, J. & PRADO JÚNIOR, A.C. Efeito do fungo *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker no desenvolvimento inicial de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, e., Manaus, 1978. *Silvicultura*, São Paulo, 14:347-349, 1979. Edição Especial.

- JACKSON, R.M. & MASON, P.A. *Mycorrhiza*. London, Edward Arnold Ltd., 1984. 60p. (The Institute of Biology's Studies in Biology nº 159).
- KELLEY, W.D. Effect of Triadimefon (Bayleton) on Ectomycorrhizal of loblolly and slash Pines in Alabama. *Forest Science*, Washington, 28(2):232-236, 1982.
- KHALIQNE, A. & BEG, A.R. Effect of soil salinity on the ectomycorrhizal nodules in *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *Pakistan Journal of Forestry*, (s.l.) 26 (3):177-180, 1976. *Apud: Forestry Abstracts*, Oxford, 39(3):128, 1978. (Resumo).
- KORMANIK, P.P. & MCGRAW, A.C. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. In: SCHENCK, N.C. ed. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. St. Paul Minnesota, American Phytopathological Society, 1982. p.37-45.
- KRUGNER, T.L. Ectomicorrizas: caracterização, produção de inóculo e inoculação. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1, Lavras, 1985. *Anais*. Lavras, FAEPE, 1986. p.138-141.
- LAPEYRIE, F. & BRUCHET, G. Protection d'*Eucalyptus delegatensis* vis-a-vis du calcaire par des champignons ectomycorrhizies. In: ASSOCIATION FORÊT-CELLULOSE. *Annales de Recherches Sylvicoles* 1982. Paris, 1983. p.212-233.

- LAPEYRIE, F.F. & BRUCHET, G. Some factors influencing viability of ectomycorrhizal fungal inoculum. *New Phytologist*, Cambridge, 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*, Cambridge, 100:93-104, 1985.
- LE TACON, F. & GARBAYE, J. La maîtrise des associations mycorhiziennes en pépinière forestière. *Revue Forestière Française*, Nancy, 38(3):249-257, 1986.
- LOPES, S.A.R.; PRADELLA, J.G.C.; OLIVEIRA, M.S.; SILVA, L.F. Obtenção de inóculo homogêneo de *Pisolithus tinctorius* (Marx 185) através da quebra do micélio vegetativo. In: REUNIÃO BRAS. SOBRE MICORRIZAS 2., São Paulo, 1987. *Anais*. São Paulo, Inst. de Botânica, 1987. p.101.
- MCKAY, H.M. A multiple plant module for aseptic nutritional studies and the synthesis of mycorrhizas. *Plant and Soil*, The Hague, 66:257-62, 1982.
- MALAJCZUK, N. The microflora of unuberized roots of *Eucalyptus calophylla* R. Br. and *Eucalyptus marginata* Donn ex. Sm. seedlings grown in soils suppressive and conducive to *Phytophthora cinnamomi*. *Aust. J. Bot.*, Melbourne, 27: 255-72, 1979.

- MALAJCZUK, N.; DELL, B.; BOUGHER, N.L. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus* III. Superficial ectomycorrhizas initiated by *Hysterangium* and *Cortinariun* species. *New Phytologist*, Cambridge, 105(3):421-428, 1987.
- MALAJCZUK, N.; McCOMB, A.J.; LONERAGAN, J.F. Phosphorus Uptake and growth of mycorrhizal and uninfected seedlings of *Eucalyptus calophylla* R. Br. *Aust. J. Bot.*, Melbourne, 23:231-8, 1975.
- MALAJCZUK, N.; MOLINA; R.; TRAPPE, J.M. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus* I. Pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with *Pinus radiata*. *New Phytologist*, Cambridge, 91:467-482, 1982.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection: I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, Saint Paul, 59:153-163, 1969.
- MARX, D.H. Mycorrhizae of ecotic trees in the Peruvian Andes and synthesis of Ectomycorrhize on Mexican Pines. *Forest Science*, Washington, 21(4):353-358, 1975.
- MARX, D.H. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhical fungus *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 23(3):217-223, mar. 1977.

- MARX, D.H. Variability in ectomycorrhizal development and growth among isolates of *Pisolithus tinctorius* as affected by source, age, and reisolation. *Canadian Journal of Forest Research*, Ottawa, 11(1):168-174, 1981. Apud: *Forestry Abstracts*, Oxford, 43(5):305, 1982. (Resumo).
- MARX, D.H.; BRYAN, W.C.; CORDELL, C.E. Growth and Ectomycorrhizal development of Pine seedlings in nursery soils infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. *Forest Science*, Washington, 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 for development of ectomycorrhizal on bare root tree seedlings. *Forest Science*, Washington, 30(3-supl.):1-101, setembro 1984.
- MARX, D.H.; HATCH, A.B.; MENDICINO, J.F. High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 55:1569-1574, 1977.
- MARX, D.H. & KENNEY, D.A. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. In: SCHENCK, N.C., ed. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. St. Paul Minnesota, American Phytopathological Society, 1982. p.131-146.

- MARX, D.H.; MORRIS, W.G.; MEXAL, J.G. Growth and Ectomycorrhizal development of loblolly Pine seedlings in fumigated and nonfumigated nursery soil infected with different fungal symbionts. *Forest Science*, Washington, 24(2):193-203, 1978.
- MARX, D.H. & ROWAN, S.J. Fungicides influence growth and development of specific Ectomycorrhizal on loblolly Pine seedlings. *Forest Science*, Washington, 27(1):167-176, 1981.
- MARX, D.H.; RUEHLE, J.L.; KENNERY, D.S.; CORDELL, C.E.; RIFFLE, J.W.; MOLINA, R.J.; PAWUK, W.H.; NAVRATIL, S.; TINUS, R.W.; GOODWIN, O.C. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of Ectomycorrhizal on container grown tree seedlings. *Forest Science*, Washington, 28(2):373-400, 1982.
- MARX, D.H. & SCHENCK, N.C. Potential of mycorrhizal symbiosis in agricultural and forest productivity. In: KOMMENDAHL, T. & WILLIAMS, P.H., ed. *Challenging Problems in Plant Health*. 75th Anniv. Publ. of Am. Phytopathol. Soc., 1983. cap. 30, p.334-47.
- MASSICOTE, H.B.; PETERSON, R.L.; ASHFORD, A.E. Ontogeny of *Eucalyptus pilularis*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizal. I. Light microscopy and scanning electron microscopy. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 65:1927-1939, 1987.

- MEYER, F.H. Distribution of ectomycorrhizal in native and man-made forests. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T., ed. *Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology*. New York, Academic Press, 1973. p.79-105.
- MEYER, F.H. Physiology of mycorrhiza. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, California, 25:567-86, 1974.
- MIKOLA, P. Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practice. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. ed. *Ectomycorrhizae - Their ecology and physiology*. New York, Academic Press, 1973. 444pp.
- MOLINA, R. Ectomycorrhizal inoculation of containerized Douglas-fir and Lodgepole Pine seedlings with six isolates of *Pisolithus tinctorius*. *Forest Science*, Washington, 25(4):585-590, 1979.
- MOLINA, R. & TRAPPE, J.M. Applied aspects of Ectomycorrhizal. In: SUBBARAO, N.S., ed. *Advances in Agricultural Microbiology*. New Delhi, Oxford & LBH Publishing Co., 1982, Cap. 12, p.305-324.
- MORO, L.; BRESSAM, C.; CANEVA, R.A.; COLLI JÚNIOR, G.; NEGRI, P.A. Viveiro contínuo de *Eucalyptus* da Champion Papel e Celulose Ltda. *Circular Técnica*, IPEF, Piracicaba (160): 1-5, julho 1988.

- MULLETTE, K.J. Studies of eucalypt mycorrhizas I. A method of mycorrhiza induction in *Eucalyptus gummiifera* by *Pisolithus tinctorius*. *Aust. J. Bot.*, Melbourne, 24:193-200, 1976.
- MULLIGAN, D.R. & PATRICK, J.W. Phosphorus and carbon economies of Ectomycorrhizal seedlings of *Eucalyptus pilularis* *Aust. J. Plant Physiol.*, Melbourne, 12:669-79, 1985.
- PAWUK, W.H. & BARNETT, J.P. Benomyl stimulates ectomycorrhizal development by *Pisolithus tinctorius* on shortleaf pine grown in container. *Research Note. USDA Forest Service*, (s.l.), SO-267, 3p. 1981. *Apud Forestry Abstract*, Oxford, 46(5):315, 1985. (Resumo).
- PEREIRA, J.M.; OLIVEIRA, E.; SOUZA, P. Efeitos de micorrizas vesicular-arbusculares sobre o desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis*. In: REUNIÃO BRAS. SOBRE MICORRIZAS, 2., São Paulo, 1987. *Anais*. São Paulo, Inst. de Botânica, 1987. p.14.
- POISSONNIER, M. Mycorrhization *In vitro* de clones d'eucalyptus. In: ASSOCIATION FORÊT-CELLULOSE. *Annales de recherches sylvicoles 1986*. Paris, 1987. p.82-94.
- PRYOR, L.D. Chlorosis and lack of vigour in seedlings of renantheroun species of *Eucalyptus* caused by lack of mycorrhiza. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, (s.l.), LXXXI:91-95, 1956.

- RIFFLE, J.W. & MARONEK, D.M. Ectomycorrhizal inoculation procedures for greenhouse and nursery studies. In: SCHENCK, N.C. ed. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*, St. Paul Minnesota, American Phytopathological Society, 1982. p.147-156.
- RIFFLE, J.W. & TINUS, R.W. Ectomycorrhizal characteristics, growth, and survival of artificially inoculated ponderosa and scots Pine in a greenhouse and plantation. *Forest Science*, Washington, 28(3):646-660, 1982.
- ROSE JÚNIOR, R.W.; VAN DYKE, C.G.; DAVEY, C.B. Scanning electron microscopy of three types of ectomycorrhizal formed on *Eucalyptus Nova-anglica* in the southeastern United States. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 59:683-688, 1981.
- RUEHLE, J.L. The relationship between lateral-root development and spread of *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizal after planting of container-grown loblolly pine seedlings. *Forest Science*, Washington, 29(3):519-526, 1983.
- SANTOS, M.M.L.S. Efeito de fungicidas sobre os fungos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* e *Thelephora terrestris* e ação sistêmica de benomyl em mudas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. Piracicaba, 1984. 87p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 1(3):231-233, 1975.

- SCHENCK, N.C. Can mycorrhizal control root disease? *Plant Disease*, St. Paul, 65(3):230-34, 1981.
- SCHWAN, K.R.F. Caracterização, incidência e ecologia de micorrizas em viveiro e florestas de *Eucalyptus* spp., na Região de Viçosa, Minas Gerais. Viçosa, 1984. 55p. (Mestrado - Universidade Federal de Viçosa).
- SINGH, S. & KUMAR, A. Field survey of mycorrhiza in *Eucalypts* and Pines. *Indian Forester*, Dehra Dun, 92(8):517-520, 1966.
- SMITH, R.A. Nutritional study of *Pisolithus tinctorius*. *Mycologia*, Lancaster, 74(1):54-58, 1982.
- SOARES, J.; BORGES, A.C.; BARROS, J.F.; NEVES, J.C.L.; BELLEI, M.M. Absorção de nutrientes e crescimento de mudas de eucalipto micorrizadas com *Pisolithus tinctorius* em diferentes níveis de fósforo no solo. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1., Lavras, 1985. *Anais*. Lavras, FAEPE, 1986. p.211.
- SUMMERBELL, R.C. The inhibitory effect of *Trichoderma* species and other soil microfungi on formation of mycorrhiza by *Laccaria bicolor* *in vitro*. *New Phytologist*, Cambridge, 105(3):437-448, 1987.

- TRAPPE, J.M. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nursery. *Ann. Rev. Phytopathol.*, Palo Alto, 15:203-22, 1977.
- VIEIRA, R.F. Efeito de fatores edáficos associados ao cerrado no crescimento de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch em meio de cultura e na infecção micorrízica de *Eucalyptus grandis* W. Hill Ex Maiden em condições controladas. Viçosa, 1984. 84p. (Mestrado - Universidade Federal de Viçosa).
- WARCUP, J.H. Ectomycorrhizal associations of australian indigenous plants. *New Phytologist*, Cambridge, 85():331-335, 1980.
- YATAZAWA, M.; PERSIDSKY, D.J.; WILDE, S.A. Effect of allyl alcohol on micropopulation of prairie soils and growth of tree seedlings. *Proceedings of the Soil Science Society of America*, Madison, 24:313-316, 1960.
- YOKOMIZO, N.K.S. Micorrizas em essências florestais. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1., Lavras, 1985. *Anais*. Lavras, FAEPE, 1986. p.212.
- YOKOMIZO, N.K.S. & KRUGNER, T.L. *Pisolithus tinctorius* Coker et Couch e ectomicorrizas em espécies de *Eucalyptus* L'Heritier. *Silvicultura em São Paulo*, São Paulo, 17/19:1-8, 1983/85a.

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