

MÔNICA MEINERT

Efeito da inoculação dos fungos micorrízico arbuscular, *Glomus clarum* (Nicol. & Schenck), e ectomicorrízico, *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch, sobre a colonização radicular, crescimento e nutrição de *Eucalyptus globulus* Labill.

FLORIANÓPOLIS

1998

MÔNICA MEINERT

Efeito da inoculação dos fungos micorrízico arbuscular, *Glomus clarum* (Nicol. & Schenck), e ectomicorrízico, *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch, sobre a colonização radicular, crescimento e nutrição de *Eucalyptus globulus* Labill.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.
Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia
Universidade Federal de Santa Catarina
Orientadora: Prof. Vetúria L. de Oliveira

FLORIANÓPOLIS

1998

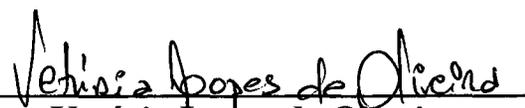
**“EFEITO DA INOCULAÇÃO DOS FUNGOS MICORRÍZICO
ARBUSCULAR, *GLOMUS CLARUM* (NICOL. & SCHENCK), E
ECTOMICORRÍZICO, *PISOLITHUS TINCTORIUS* (PERS.) COKER &
COUCH, SOBRE A COLONIZAÇÃO RADICULAR, CRESCIMENTO E
NUTRIÇÃO DE *EUCALYPTUS GLOBULUS* LABILL.”**

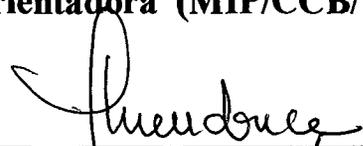
POR

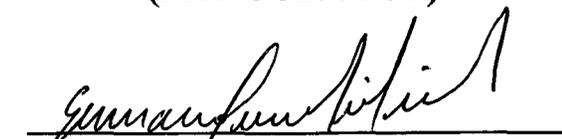
MÔNICA MEINERT

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Comissão Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:**

Comissão Examinadora:


Vetúria Lopes de Oliveira
Orientadora (MIP/CCB/UFSC)


Margarida Matos de Mendonça
(MIP/CCB/UFSC)


Germano Nunes Silva Filho
(MIP/CCB/UFSC)

Florianópolis, abril de 1998

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade oferecida para realização deste curso e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À professora *Vetúria Lopes de Oliveira*, pela orientação, amizade, ensinamentos e pelo constante apoio.

Aos professores Margarida M. Mendonça e Germano Nunes Silva Filho pelo incentivo, pela amizade, pelas críticas, pelas valiosas sugestões e pela participação na banca examinadora.

À Gabriela e ao Fredy pela amizade, apoio e pela imensa ajuda na "montagem" e "desmontagens" dos experimentos.

À Analia, amiga de todas as horas, pelo apoio e pela imensa ajuda e companheirismo durante todo o curso.

Ao Zeca pela amizade e pela ajuda na confecção das figuras.

Aos colegas dos laboratórios: Admir, Maria Alice, Maurício, Samara, Lindomar, Gilson, Juliano, Marcelo, Luis, prof. Alexandre, Rodrigo, André, pelo agradável convívio e pelo companheirismo.

Aos Engenheiros Florestais Teotônio Francisco de Assis (Riocell) e Antônio R. Higa (EMBRAPA) pelas valiosas informações sobre o *Eucalyptus globulus*.

A todos aqueles que, mesmo não mencionados, tenham de algum modo participado de minha vida acadêmica e da realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	3
1 - Micorrizas	3
2 - A Planta Hospedeira	10
3 - A Dupla Simbiose Micorrízica em <i>Eucalyptus</i> spp.	15
MATERIAIS E MÉTODOS	26
1 - A Planta Hospedeira	26
2 - Germinação das Sementes	26
3 - Os Fungos Micorrízicos	26
4 - Produção do Inóculo Fúngico	27
4.1 - Ectomicorrízico	27
4.2 - Micorrízico Arbuscular	28
5 - Substrato de Plantio	31
6 - Montagem e condução dos experimentos	32
6.1 - Efeito da forma de inoculação de fungos micorrízico arbuscular ectomicorrízico, isolada ou conjuntamente, na colonização radicular, absorção de fósforo e produção de matéria seca em plantas de <i>Eucalyptus globulus</i>	32
6.2 - Efeito da seqüência de inoculação de fungos micorrízico arbuscular e ectomicorrízico na colonização radicular, absorção de fósforo e produção de matéria seca em plantas de <i>Eucalyptus globulus</i>	35
7 - As condições experimentais	36

8 - Análises dos Dados	36
8.1 - Avaliação do fósforo das amostras de tecido vegetal	38
8.2 - Avaliação do comprimento radicular colonizado	39
8.3 - Avaliação da velocidade de crescimento e absorção de fósforo pelas plantas	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
1 - Efeito da forma de inoculação de fungos micorrízico arbuscular ectomicorrízico, isolada ou conjuntamente, na colonização radicular, absorção de fósforo e produção de matéria seca em plantas de <i>Eucalyptus globulus</i>	42
1.1 - Colonização Radicular	42
1.2 - Absorção de Fósforo	48
1.3 - Crescimento	55
2 - Efeito da seqüência de inoculação de fungos micorrízico arbuscular e ectomicorrízico na colonização radicular, absorção de fósforo e produção de matéria seca de <i>Eucalyptus globulus</i>	72
2.1 - Colonização radicular	72
2.2 - Absorção de fósforo	74
2.3 - Crescimento	78
CONCLUSOES	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS	106

LISTA DE TABELAS

1	Fungos micorrízicos com seus respectivos hospedeiros e procedências	27
2	Esquema dos tratamentos de inoculação de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> com fungos micorrízico arbuscular e ectomicorrízico	33
3	Esquema dos tratamentos de inoculação de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> com fungos micorrízico arbuscular e ectomicorrízico	35
4	Comprimento colonizado e porcentagem de colonização radicular de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	43
5	Quantidade de fósforo na parte aérea em plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	49
6	Quantidade de fósforo no sistema radicular em plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	51
7	Quantidade total de fósforo em plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	53
8	Concentração de fósforo em plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	54
9	Altura de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	56
10	Comprimento do sistema radicular de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	59
11	Peso da matéria seca da parte aérea de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i>	

	inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	61
12	Peso da matéria seca do sistema radicular de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	63
13	Peso da matéria seca total das plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	64
14	Relação R/S (matéria seca de raiz/ matéria seca da parte aérea) de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	66
15	Comprimento colonizado e porcentagem de colonização radicular de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , em diferentes seqüências, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	73
16	Quantidade de fósforo na parte aérea em plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , em diferentes seqüências, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	75
17	Quantidade de fósforo no sistema radicular em plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , em diferentes seqüências, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	77
18	Quantidade total de fósforo em plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , em diferentes seqüências, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	79
19	Concentração de fósforo em plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , em diferentes seqüências, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	80
20	Altura de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , em	

	diferentes seqüências, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	82
21	Comprimento do sistema radicular de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , em diferentes seqüências, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	83
22	Peso de matéria seca da parte aérea de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , em diferentes seqüências, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	85
23	Peso de matéria seca do sistema radicular de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , em diferentes seqüências, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	86
24	Peso de matéria seca total de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , em diferentes seqüências, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	88
25	Relação R/S (matéria seca de raiz/matéria seca da parte aérea) de plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus clarum</i> e o fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> , em diferentes seqüências, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação	89

LISTA DE FIGURAS

1	Esquema representativo dos principais tipos de associações micorrízicas (adaptado de LE TACON, 1985)	5
2	Ramo típico de <i>Eucalyptus</i> spp. apresentando folhas, flores e frutos (adaptado de FAO, 1985)	11
3	Esquema da distribuição das principais plantações de <i>Eucalyptus</i> spp. no mundo (adaptado de FAO, 1985)	12
4	Técnica de preparação do inóculo ectomicorrízico	29
5	Técnica de preparação do inóculo micorrízico arbuscular e da quantificação dos propágulos	30
6	Técnica de inoculação dos fungos micorrízico arbuscular e ectomicorrízico em plantas de <i>Eucalyptus globulus</i>	34
7	Técnica de inoculação seqüencial dos fungos micorrízico arbuscular e ectomicorrízico em plantas de <i>Eucalyptus globulus</i>	37
8	Avaliação do comprimento radicular	40
9	Raiz de <i>Eucalyptus globulus</i> colonizada por <i>Glomus clarum</i> , apresentando vesículas e hifas (55X)	44
10	Detalhe de uma vesícula de <i>Glomus clarum</i> , observado em raiz de <i>Eucalyptus globulus</i> (140X)	45

RESUMO

Eucalyptus globulus é uma das espécies exóticas mais amplamente cultivadas no mundo, sendo a espécie preferencial para extração de celulose de fibra curta. Existe grande interesse em seu cultivo intensivo no Brasil, mas limitações, notadamente de ordem ambiental, dificultam seu crescimento. Como as demais espécies do gênero *Eucalyptus*, *E. globulus* apresenta dois tipos de simbiose micorrízica: as micorrizas arbusculares (MA) e as ectomicorrizas (ECM). Vários estudos têm demonstrado benefícios da inoculação no crescimento desta planta, mas a maioria deles trata apenas da inoculação ectomicorrízica. A inoculação micorrízica pode, assim, constituir-se num fator que contribua para a adaptação dessa planta, desde que sejam definidos quais os fungos a ser introduzidos e quais as formas e seqüências de inoculação. Com esse objetivo, foram realizados dois experimentos para estudar os efeitos dos fungos *Glomus clarum* (MA) e *Pisolithus tinctorius* (ECM) em duas formas de inoculação (isolada ou conjunta) e da seqüência de inoculação (inoculação na sementeira ou no transplantio), e sua contribuição para nutrição e crescimento de *E. globulus*. Utilizou-se para isso areia quartzosa, lavada e esterilizada em autoclave, previamente fertilizada com macro e micronutrientes, contendo 7.5 ppm de fósforo. O inóculo MA foi obtido de uma cultura em vaso, usando sorgo como hospedeiro, enquanto que o inóculo do fungo ECM foi obtido por meio de cultura axênica em meio MNM sólido e posterior fragmentação em meio semi-sólido. Um dos experimentos tinha 4 tratamentos de inoculação: *G. clarum* (Gc), *P. tinctorius* (Pt), inoculação conjunta (Gc+Pt) e testemunha, não inoculada (Ni). No outro experimento, os 5 tratamentos de inoculação foram caracterizados pelo caráter seqüencial da inoculação (semeadura/transplantio): Ni/Ni, Ni/Gc, Ni/Pt, Gc/Pt, Pt/Gc. Os dois experimentos foram avaliados aos 2, 3, 4 e 5 meses após a sementeira. Os parâmetros avaliados foram: altura, comprimento radicular total e colonizado, matéria seca da parte aérea e de raiz, fósforo na parte aérea e raiz. Avaliaram-se, também, a velocidade de crescimento ($\text{cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ou $\text{mg.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e de absorção de fósforo ($\text{mg.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$). Somente *G. clarum* colonizou as plantas e a colonização foi limitada pela presença do fungo ECM, *P. tinctorius*. A forma de inoculação isolada (Gc), promoveu maior nutrição fosfatada e crescimento das plantas, notadamente nos parâmetros relativos ao sistema radicular. No experimento de inoculação seqüencial, os efeitos dos tratamentos foram menos discerníveis, sendo possível destacar, no entanto, a colonização somente do tipo MA, nos tratamentos onde *G. clarum* foi inoculado, e efeitos positivos desse fungo em alguns parâmetros de crescimento (altura, comprimento e peso de raiz, relação R/S) e absorção de P (raiz). Ficou evidente, também, um efeito negativo do transplantio sobre a colonização radicular pelo fungo MA. Com base nesses resultados, pôde-se concluir que: *G. clarum* (FMA) foi mais compatível em relação a *E. globulus* que *P. tinctorius* (ECM); foi também mais eficiente na colonização, absorção de fósforo e promoção do crescimento em *E. globulus*.

Palavras-chave: *Eucalyptus globulus* - Micorrizas Arbusculares - Ectomicorrizas - Colonização - Crescimento - Fósforo

ABSTRACT

Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* (Nicol. & Schenck), and the ectomycorrhizal *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch, on root colonisation, nutrition and growth of *Eucalyptus globulus* Labill.

Eucalyptus globulus is the most used species for the extraction of short fiber cellulose worldwide. In Brazil, climatic constraints prevents intensive planting of this species. *E. globulus* forms mycorrhizal association with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and ectomycorrhizas (ECM). Many studies have showed the benefits of ECM on growth of this species, but only a very few have examined the effect of AM. In this study, two experiments were performed to evaluate the effect of the AMF fungus *Glomus clarum* (Gc) and the ECM fungus *Pisolithus tinctorius* (Pt), inoculated alone or combined, and in different sequences, on growth and nutrition of *E. globulus*. Experiments were carried out using a substrate of sterile sand previously fertilized with 7.5 ppm P and other macro- and micro- nutrients. Inoculum of *G. clarum* was produced in pot cultures using sorghum as the host and consisted of a mixture of spores, hyphae and colonised roots. Inoculum of *P. tinctorium* consisted of a slurry produced by blending solid cultures (MMN-agar) in a semi-solid MMN medium. In the first experiment, plants were inoculated with Gc, Pt, Gc+Pt, or noninoculated (Ni). In the second experiment, fungal inoculation (Gc, Pt and Ni) was added in 5 different sequences, corresponding to the inoculation at sowing and at transplanting (30 d): Ni/Ni, Ni/Gc, Ni/Pt, Gc/Pt, Pt/Gc. Plant height, root length colonised, root and shoot dry weights and P contents were measured when plants were 2, 3, 4 and 5 month-old. Growth and P uptake rates were also calculated. In both experiments only *G. clarum* was able to colonise roots, but colonisation was reduced by the presence of *P. tinctorius*, although no ectomycorrhizal colonisation was observed. In the first experiment, *G. clarum* inoculated alone contributed to a greater P uptake and plant growth, particularly on root system, relative to the control. In the sequential inoculation study, differences between treatments were not clearly detected. However, it was possible to observe the positive effects of *G. clarum* relative to other treatments on plant height, root length and weight, root:shoot ratio, and on root P contents. The results suggest that the isolate of *G. clarum* used is more compatible to *E. globulus* than *P. tinctorius* (ECM). The AM fungus was also efficient on promoting P uptake and growth of *E. globulus*.

Keywords: *Eucalyptus globulus* - Arbuscular mycorrhizas - Ectomycorrhizas - Colonisation - Growth - Phosphorus

INTRODUÇÃO

Os *Eucalyptus* são essências florestais de grande interesse econômico, sendo utilizados principalmente para fabricação de celulose e papel, cujo consumo mundial vem aumentando nos últimos anos. Contribuem para isso diversas características que essas plantas apresentam, dentre elas, seu rápido crescimento e fácil adaptação a diferentes regiões do planeta. No Brasil, dos 6,5 milhões de hectares reflorestados, 65% são ocupados com espécies de *Eucalyptus*, proporcionando benefícios econômicos e sociais, como a geração de inúmeros empregos.

Diversas espécies têm sido utilizadas nesse setor, entre elas, *E. globulus* vem se destacando devido ao seu alto rendimento industrial, baixos teores de lignina e maior densidade de madeira.

Os *Eucalyptus* formam dois tipos de associação micorrízica, a ectomicorrízica e a micorrízica arbuscular. Essa dupla simbiose tem sido geralmente relacionada a fatores ambientais e a fatores intrínsecos ao hospedeiro. Dentre os fatores ambientais, é sugerido que a temperatura, pluviosidade, o precedente cultural e o potencial de inóculo estão relacionados à ocorrência dessa dupla associação. No que diz respeito aos fatores intrínsecos ao hospedeiro, os principais são a idade e a fisiologia dos mesmos. Além disso, as interações entre os fatores do ambiente, do hospedeiro e do fungo simbiote podem estar relacionados a essa ocorrência. Foi observada uma dinâmica sucessional dessas associações, porém são poucos os estudos sobre o papel desses dois tipos de micorriza nessa dinâmica.

No caso dos *Eucalyptus*, o estudo do papel das micorrizas é importante principalmente em termos de produtividade e aumentos de biomassa, devido ao grande interesse econômico dessas espécies. O controle da micorrização, com a utilização dos fungos ectomicorrízicos como "ferramentas" biotecnológicas, pode proporcionar vantagens aos produtores florestais e, conseqüentemente, às indústrias que fazem uso dessas espécies.

Os inúmeros resultados que demonstram os benefícios advindos das associações micorrízicas, principalmente em termos de aumento de crescimento, biomassa e nutrição mineral, foram obtidos com inoculação de forma isolada e, principalmente,

com fungos ectomicorrízicos. São escassos os estudos sobre a associação micorrízica arbuscular em relação a espécies deste gênero.

Assim, este trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito de fungo micorrízico arbuscular e de fungo ectomicorrízico, na nutrição e produção de biomassa de *Eucalyptus globulus* Labill., sob condições de casa-de-vegetação. Além de avaliar os benefícios conferidos pelos dois tipos de micorriza na promoção do crescimento das plantas, verificar em qual estágio de desenvolvimento esses benefícios se manifestam, determinar a dinâmica da colonização do sistema radicular pelos dois tipos de fungos micorrízicos e analisar o efeito de um tipo micorrízico na colonização do hospedeiro pelo outro tipo.

REVISÃO DA LITERATURA

1 - Micorrizas

Micorrizas são associações simbióticas entre as raízes das plantas e fungos especializados do solo (FRANK, 1885). Tais associações são exemplos clássicos de simbioses mutualísticas, onde o fungo e a planta hospedeira dependem um do outro para sobreviver nos ecossistemas naturais (MOLINA e TRAPPE, 1984). Mais recentemente, READ (1991) reenfatizou o conceito de simbiose micorrízica como uma comunidade de organismos, com inúmeros hospedeiros e fungos envolvidos. Estima-se que mais de seis mil espécies de fungos são capazes de estabelecer esta associação, com aproximadamente duzentas e quarenta mil espécies de plantas (BONFANTE e PEROTTO, 1995). As micorrizas variam na estrutura, função e no tipo de fungo envolvido, demonstrando representar um tipo de associação que tem evoluído repetidamente, em resposta a distintas pressões seletivas e não uma simples classe de associação evolucionária (FITTER e MOYERSON, 1996; SYLVIA, 1998). Evidências têm sugerido que o hábito micorrízico evoluiu como um mecanismo de sobrevivência para ambos os organismos envolvidos na associação, permitindo a sobrevivência destes em ambientes de baixa fertilidade do solo, períodos de seca, doenças, baixas temperaturas e outras condições naturais de estresse (MARX et al., 1992).

Nesta simbiose, o fungo se beneficia pelo suprimento de nutrientes orgânicos (carboidratos, vitaminas, aminoácidos) advindos da fotossíntese do hospedeiro. A planta, por sua vez, beneficia-se pelo suprimento de nutrientes minerais do solo absorvidos pelo fungo, especialmente aqueles que têm pouca mobilidade, ou que estão presentes em baixas concentrações na solução do solo, tais como fósforo, cobre e zinco (HARLEY e SMITH, 1983).

Em adição ao aumento do crescimento das plantas e da absorção de nutrientes, especialmente fósforo e nitrogênio (HEINRICH et al., 1988; BURGESS et al., 1993; MARSCHNER e DELL, 1994), os fungos micorrízicos conferem outros benefícios a seus hospedeiros. Esses fungos podem, eventualmente, ter um papel importante na estruturação e estabilidade de comunidades vegetais (FRANCIS e READ,

1994); absorver água e aumentar a resistência de plantas jovens à seca (DUDDRIDGE et al., 1991), resultante do aumento da área de superfície de captação pelas hifas (HARLEY e SMITH, 1983; MILLER e ALLEN, 1992). Alguns fungos micorrízicos podem detoxificar o solo (WILKINS, 1991; HARLEY e SMITH, 1983) ou capacitar plantas a resistir a temperaturas ou acidez extremas, como podem atuar, também, na agregação e estabilidade do solo (TISDALL, 1994) e podem modificar a arquitetura do sistema radicular (KOTHARI et al., 1990; HOOKER et al., 1992). Além disso, os fungos micorrízicos podem proteger as raízes contra fitopatógenos (KOPE e FORTIN, 1989; SUH et al., 1991; RASANAYAGAM e JEFRIES, 1992; NEWSHAM et al., 1995).

As micorrizas podem ser classificadas em três tipos gerais: endomicorrizas, ectomicorrizas e ectendomicorrizas (Figura 1). O primeiro contém um número de distintos subtipos, notadamente as ubíquas micorrizas arbusculares (MA), anteriormente referidas como micorrizas vesículo-arbusculares, envolvendo inúmeras espécies de plantas; as micorrizas ericóides, formadas por fungos do Filo Ascomycota (notavelmente *Hymenoscyphus* spp.) e plantas da ordem Ericales; e as micorrizas orquidóides, formadas por vários fungos, freqüentemente formas imperfeitas, e orquídeas. Dentre estes diferentes tipos de micorrizas, as ectomicorrizas e as micorrizas arbusculares são as mais comuns e as mais relevantes economicamente (HARLEY e SMITH, 1983; MOLINA e TRAPPE, 1984; ALEXOPOULOS et al., 1996; FITTER e MOYERSON, 1996).

A grande maioria das espécies de plantas das regiões tropicais, subtropicais e temperadas é colonizada por fungos MA (FRANCIS e READ, 1994). Assim, estima-se que mais de 80% das famílias de plantas formam normalmente simbioses do tipo MA (GIANINAZZI-PEARSON, 1996), ou seja, a maioria das famílias de fanerógamas, sendo estas importantes tanto econômica quanto ecologicamente (TRAPPE, 1987; MOLINA et al., 1992).

As micorrizas arbusculares são formadas por fungos da ordem Glomales (Filo Zygomycota) (ALEXOPOULOS et al., 1996) e são caracterizadas pela penetração do micélio inter- e intracelular no córtex radicular, ausência de manto e de modificações morfológicas nas raízes (MORTON e BENTIVENGA, 1994). Cento e cinquenta espécies de fungos MA são reconhecidas atualmente (MORTON e BENNY, 1990),

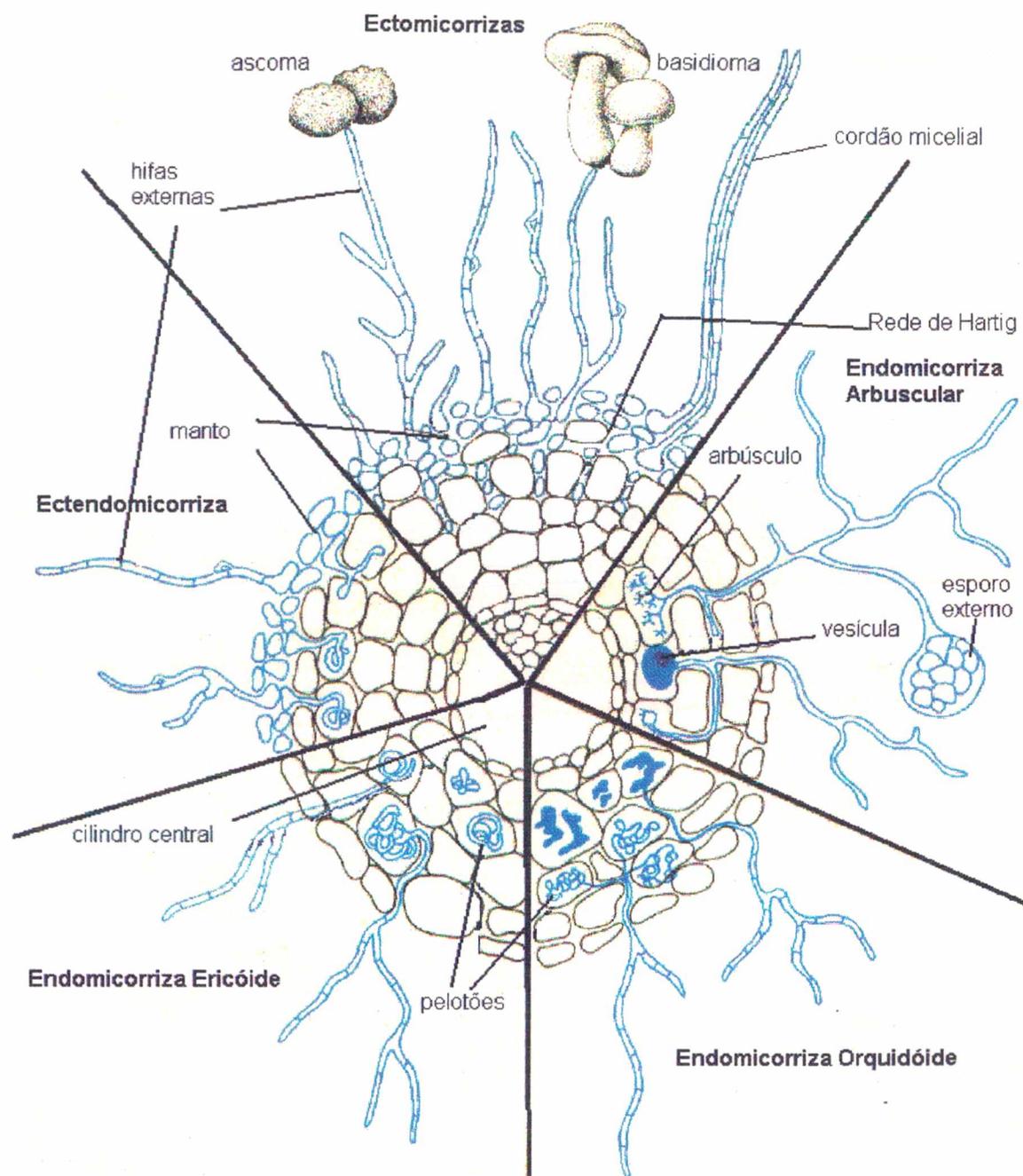


Figura 1 - Esquema representativo dos principais tipos de associações micorrízicas (adaptado de LE TACON, 1985).

distribuídas em três famílias (Glomaceae, Acaulosporaceae, Gigasporaceae) e em seis gêneros (*Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Sclerocystis* e *Entrophospora*). Os fungos envolvidos neste tipo de associação são considerados simbioses obrigatórios, ou seja, são fungos que não produzem esporos na ausência de uma planta hospedeira e, dessa forma, somente completam seu ciclo de vida na associação com as raízes das plantas (HARLEY e SMITH, 1983).

Somente tecidos radiculares específicos, tais como tecidos epidérmicos e corticais são colonizados, enquanto que meristemas e tecidos vasculares são resistentes à infecção micorrízica (BONFANTE e PEROTTO, 1995). Durante seu ciclo de vida, o fungo produz esporos, base da taxonomia destes fungos, que germinam e originam um micélio vegetativo. Este, em contato com a superfície da raiz de uma planta hospedeira, diferencia-se em apressório, e a penetração aparentemente ocorre por combinação de degradação mecânica e enzimática da parede celular vegetal (LAMBAIS, 1996). GIOVANETTI et al. (1993), citados por BONFANTE e PEROTTO, 1995, demonstraram que a formação do apressório é induzida por exsudatos das raízes produzidos por plantas hospedeiras compatíveis, enquanto que exsudatos de raízes de plantas não compatíveis estimulam somente a elongação da hifa. Numa planta compatível, este apressório produz uma hifa que inicia a infecção dos tecidos radiculares, onde vão formar hifas inter- e intracelulares, novelos de hifas (*coils*), arbúsculos e, em alguns casos, vesículas (ALEXANDER et al., 1992; PETERSON e FARQUHAR, 1994; BONFANTE e PEROTTO, 1995). Os arbúsculos são estruturas efêmeras formadas de micélio inter- e intracelular no córtex da raiz e responsáveis pela troca de nutrientes entre os simbioses (GIANINAZZI, 1991; MORTON e BENTIVENGA, 1994; LAMBAIS, 1996). Já as vesículas são formadas exclusivamente nas espécies de Glomaceae e Acaulosporaceae, mas com diferenças distintas evidentes entre elas. As vesículas nas Glomaceae são usualmente subglobosas a elípticas, ao passo que nas Acaulosporaceae são pleiomórficas, nodosas, e coram-se facilmente com azul de tripan (MORTON e BENTIVENGA, 1994).

As ectomicorrizas (ECM), por sua vez, são caracterizadas pela presença de um manto de hifas ao redor da raiz, pela penetração intercelular do micélio fúngico no córtex (rede de Hartig) e pela indução de modificações morfológicas nas raízes colonizadas (HARLEY e SMITH, 1983). Tais raízes tornam-se morfológicamente

distintas, sendo isentas de pêlos radiculares, algumas vezes coloridas, freqüentemente curtas e grossas, e podem ser ramificadas ou não e/ou nodulares. Esta morfologia parece ser determinada primariamente pelo micossimbionte e pode ser específica para gênero ou espécie deste (JONES e LAST, 1991).

O manto das ECM, quando completamente desenvolvido, consiste freqüentemente de hifas compactas separando as células radiculares do solo. Dois tipos básicos de manto podem ser distingüidos: o manto plectenquimatoso, no qual a hifa pode ser reconhecida individualmente; e o manto pseudoparenquimatoso, no qual as hifas individuais que formam este manto não podem ser distingüidos por que perderam sua forma original, assemelhando-se assim a um verdadeiro parênquima. Estes dois tipos são divididos em outros subtipos. Essas características são importantes na montagem de chaves dicotômicas para a identificação das ECM (AGERER, 1994; HONRUBIA et al., 1994). Freqüentemente, as hifas estocam glicogênio, proteínas e lipídeos, e são capazes de absorver e acumular nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio (MARX et al., 1992; PETERSON e FARQUHAR, 1994).

A rede de Hartig é uma rede intercelular de hifas, formada entre as células corticais e epidérmicas, ou entre ambas, e é o local de trocas entre o fungo e a planta hospedeira (KROPP e LANGLOIS, 1990). Nesta rede, as células epidérmicas sofrem mudanças na morfogênese sendo induzidas a expandir-se radialmente, ao invés de axialmente, sendo a rede confinada a esta camada de células. Isto provoca um aumento de superfície para trocas entre o fungo e a planta hospedeira. O controle desta reorientação ainda está sendo estudado (PETERSON e FARQUHAR, 1994).

Nas angiospermas, a rede de Hartig é freqüentemente superficial e formada somente ao redor das células epidérmicas, enquanto que nas gimnospermas, a rede de Hartig é mais profunda, estendendo-se até o córtex e, algumas vezes, até a endoderme. Geralmente, não ocorre reação adversa nas células corticais à colonização fúngica e a rede de Hartig nem sempre as envolve completamente (KROPP e LANGLOIS, 1990).

Os fungos envolvidos nesta associação são principalmente espécies dos Filos Basidiomycota e Ascomycota (ALEXOPOULOS et al., 1996). Numerosas espécies de fungos têm sido identificadas como formadoras de ECM. TRAPPE (1987) estima que mais de cinco mil espécies de fungos têm potencial para formar este tipo de micorriza. Em Santa Catarina, foi observada a ocorrência de treze gêneros de fungos ECM em

plantações de *Pinus* e *Eucalyptus*, sendo eles: *Amanita*, *Chondrogaster*, *Descomyces*, *Hysterangium*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Pisolithus*, *Ramaria*, *Rhizopogon*, *Scleroderma*, *Setchelliogaster*, *Suillus* e *Thelephora* (GIACHINI e OLIVEIRA, 1997), todos eles do Phylum Basidiomycota.

As plantas hospedeiras são predominantemente espécies arbóreas pertencentes às famílias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae, Jugladaceae, Myrtaceae, Dipterocarpaceae, Ericaceae, Tiliaceae, Leguminosae, e outras famílias (MEYER, 1973; GARBAYE, 1990; MARX et al., 1992). Em seis dessas famílias (Pinaceae, Fagaceae, Dipterocarpaceae, Betulaceae, Myrtaceae e Salicaceae) o *status* simbiótico é predominantemente do tipo ECM com uma concentração de hospedeiros estimada variando de 70-98% (WILCOX, 1990).

Algumas espécies arbóreas de uso agroflorestal podem formar ambas as associações, ECM e MA, dentre elas espécies dos gêneros *Eucalyptus*, *Alnus*, *Casuarina*, *Acacia*, *Cupressus*, *Juniperus*, *Tilia*, *Ulmus*, *Arbutus*, *Populus* e *Salix*, que, dependendo do potencial de inóculo do solo e da idade da planta, irão formar um ou outro tipo, ou ambos simultaneamente (MOLINA e TRAPPE, 1984; MARX et al., 1992). OSONUBI et al. (1991) demonstraram que importantes espécies agroflorestais como *Albizia lebbek*, *Gliricidia sepium* e *Leucaena leucocephala* podem, também, se associar a ambos os tipos de fungos micorrízicos. Já VOZZO e HACKSKAYLO (1974) observaram que diferentes espécies de *Populus* apresentavam tipos distintos de micorriza, MA ou somente ECM, ou nenhuma, dependendo do local, do tipo de solo e das condições climáticas.

Dessa forma, foi sugerido que a capacidade de formar micorrizas poderia influenciar na distribuição dessas espécies. HARLEY (1970), citado por KHAN (1978), considerou que plantas com dupla associação simbiótica, participando na fixação de nitrogênio e absorção de fósforo, são bem sucedidas como colonizadores primários devido a sua capacidade para contrabalançar a baixa fertilidade do solo em seu habitat. Em outro estudo, também ficou evidenciado que as condições do solo podem ter influência na predominância de um tipo ou outro de micorriza (REDDELL e MALAJCZUK, 1984). Esses autores encontraram predominância de ECM em *E. marginata* em locais ricos em matéria orgânica e outros autores observaram MA dominando em solos com baixo conteúdo de matéria orgânica e disponibilidade de

fósforo (READ, 1991; SYLVIA, 1998). Fica, assim, a sugestão de que a capacidade de formar ambos os tipos de micorriza pode conferir vantagens seletivas às espécies, como foi de observado por LODGE (1989).

Um aspecto de particular interesse para a biotecnologia com relação as micorrizas é a sua ampla ocorrência entre os numerosos grupos de plantas economicamente importantes, tanto nas regiões tropicais quanto nas temperadas (PETERSON et al., 1984). As principais essências florestais, de grande interesse nas regenerações artificiais no mundo, são normalmente dependentes da simbiose ECM (GARBAYE, 1990). A dependência dessas espécies florestais em relação à associação micorrízica foi inicialmente observada quando tentativas para estabelecer plantações de espécies exóticas de pinus falharam até que o fungo fosse introduzido, demonstrando a importância da utilização dos fungos micorrízicos (HACSKAYLO, 1967 citado por JANERETTE, 1991).

Sendo a grande maioria dos sítios para práticas agroflorestais nos trópicos caracterizados por solos de baixa fertilidade, inerentes ou resultantes de práticas agrícolas intensivas ou da erosão da camada superficial, o manejo e a manutenção dos sistemas micorrízicos são de grande interesse. Neste caso particular, o principal modo de estímulo micorrízico ao crescimento da planta é o aumento da absorção de nutrientes (HASELWANDTER e BOWEN, 1996).

São diversas as vantagens em resposta à utilização e inoculação micorrízica das plantas, dentre elas: a redução do uso de fertilizantes químicos, pois as micorrizas, atuando como um "fertilizante biológico", poderiam propiciar uma alternativa às elevadas aplicações de fosfato e outros elementos (PETERSON et al., 1984); redução no uso de pesticidas, diminuindo, com isso, os problemas ambientais decorrentes de sua utilização excessiva e a da mortalidade de plântulas no momento do transplântio (GARBAYE, 1990). Dessa forma, o potencial das associações micorrízicas para aumentar a produtividade das plantas em plantações florestais, ou para o estabelecimento de plantas durante a recuperação de ecossistemas após severa perturbação, é foco de inúmeros estudos (BRUNDRETT et al., 1996).

Embora a condição micorrízica seja considerada uma regra em condições naturais, estudos têm demonstrado que os fungos simbiontes podem estar ausentes em determinados locais ou apresentar incompatibilidade em relação à planta introduzida. A

presença de fungos micorrízicos compatíveis com a espécie hospedeira é freqüentemente referida como um fator relevante no êxito das plantações (OLIVEIRA et al., 1994). Assim, muitos pesquisadores têm chamado a atenção para as vantagens da micorrização controlada através da seleção de fungos eficientes, compatíveis com a espécie hospedeira e adaptados às condições locais (LE TACON et al., 1987; GARBAYE, 1990; KUEK et al., 1992). No caso específico dos eucaliptos, DELL e MALAJCZUK (1996) advertem que a inoculação é desejável porque essas plantas são introduzidas em locais onde os fungos simbiotes indígenas são ineficientes na promoção do crescimento. Além disso, a população nativa de fungos micorrízicos pode ser baixa ou incompatível com a espécie introduzida (PARLADÈ et al., 1996).

2 - A Planta Hospedeira

Os eucaliptos, *Eucalyptus* L'Hérit, pertencem à Divisão Angiospermae, Classe Dicotyledonae, Ordem Myrtiflorae e à Família Myrtaceae, sendo espécies de hábito arbóreo ou arbustivo em sua maioria, de crescimento rápido, com folhas de limbo translúcido, freqüentemente portadoras de células glandulares com essências aromáticas, flores hermafroditas e frutos do tipo cápsula (Figura 2) (SCHULTZ, 1991). São conhecidas mais de seiscentas espécies, das quais quarenta têm sido amplamente cultivadas devido a sua capacidade de sobreviver a condições adversas de clima e a uma ampla variedade de ambientes, tais como diferentes altitudes, tipos de solo e regimes hídricos (PRYOR, 1976; FAO, 1985; POORE e FRIES, 1985).

As espécies desse gênero estão, atualmente, entre as mais amplamente plantadas, ocupando mais de 45 milhões de hectares em mais de cem países (FAO, 1985) (Figura 3). São consideradas dentre as mais produtivas essências florestais cultivadas devido ao rápido crescimento, além de outras características importantes como a produção de madeira de alto valor calorífico para fornos, celulose e papel, postes, dormentes, madeira serrada, mourões de cerca, madeira roliça para construções rurais, madeira para fabricação de móveis, tacos de assoalho; e em plantios para controle da erosão, drenagem, recuperação de solos, quebra-ventos, produção de mel, dentre outros (POORE e FRIES, 1985; AUSTRALIAN CENTRE FOR INTERNATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH, 1992; LIMA, 1993; HIGA, 1995). Além disso, o uso

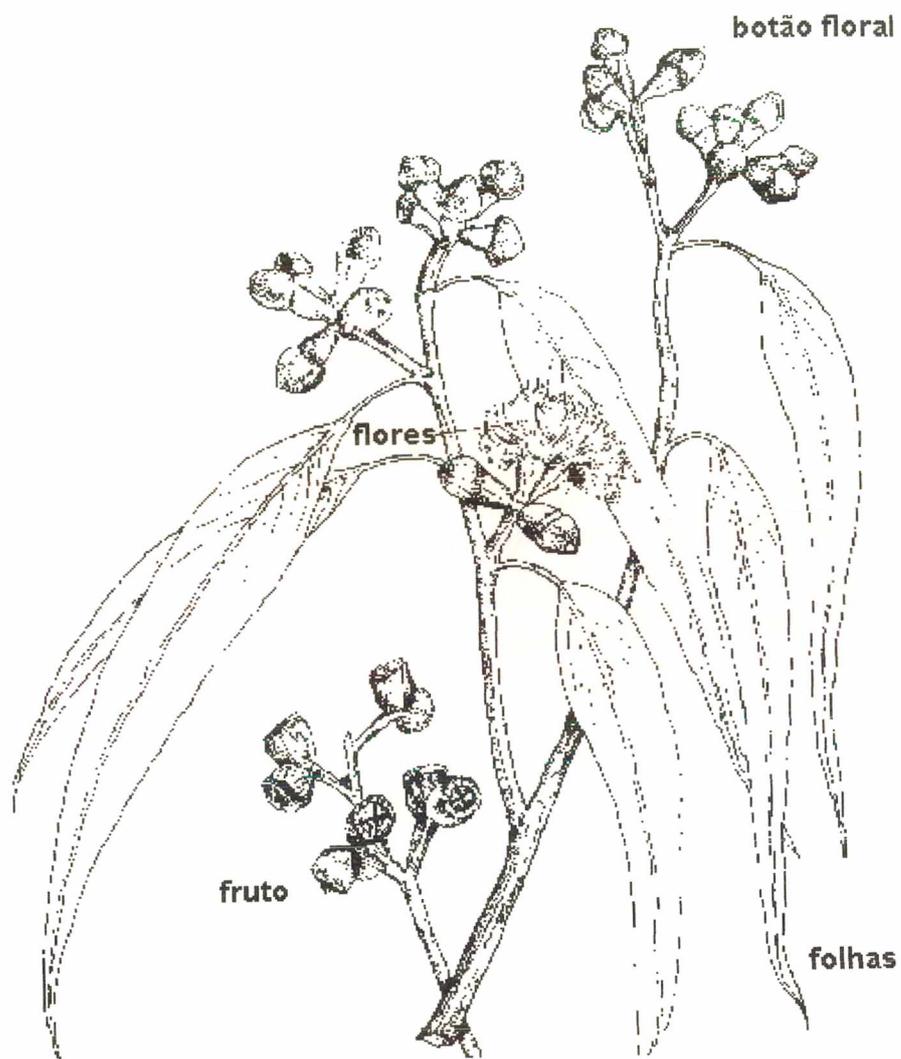


Figura 2 - Ramo típico de *Eucalyptus* spp. apresentando folhas, flores e frutos (adaptado de FAO, 1985).



Figura 3 - Distribuição das principais plantações de *Eucalyptus* spp. no mundo (adaptado de FAO,1985).

do óleo essencial de *Eucalyptus* vem obtendo significativo crescimento no mercado mundial (FLORENCE, 1986; LIMA, 1993).

O consumo de papel está aumentando em todo o mundo. Há 80 anos, apenas 15 milhões de toneladas eram consumidas, em 1994, o consumo passou para 268 milhões de toneladas. O Brasil foi o primeiro país a iniciar a produção de polpa e papel de *Eucalyptus* em grande escala nos anos 50, quando a produção anual alcançou 280 mil t. Na década de 60, essa produção aumentou para 780 mil t, mas foi somente nos anos 70 que esse setor realmente se consolidou. A partir dessa década, o uso do *Eucalyptus* para produção de celulose e papel, em substituição à celulose de pinho, que até então dominava o mercado, tornou-se significativo. Essa substituição deve-se ao fato do *Eucalyptus* possuir fibra curta e características únicas de maciez, opacidade e capacidade de impressão de suas fibras (KAUFMANN, 1997). Em 1980, mais de 3 milhões de toneladas de polpa foram produzidas com fibras curtas de *Eucalyptus* predominando sobre fibras longas de coníferas. Em 1994, o Brasil era o fornecedor de metade da polpa de *Eucalyptus* consumida mundialmente. O país é, atualmente, o segundo em área de plantação industrial de espécies de crescimento rápido, notadamente *Eucalyptus*, e vem se tornando o maior fornecedor de polpa (CARRERE, 1996).

De acordo com levantamentos estatísticos efetuados por associações de classe ligadas ao setor florestal, o Brasil possui ao redor de 6,5 milhões de hectares reflorestados, 65% dos quais ocupados com espécies de *Eucalyptus*, 30% com espécies de *Pinus* e os 5% restantes com *Gmelina*, *Araucaria* e *Acacia* (SANTOS e SCANAVACA JÚNIOR, 1993).

A primeira árvore de *Eucalyptus* foi trazida ao Brasil em 1825, para o Jardim Botânico do Rio de Janeiro (UNGARETTI, 1995), mas as grandes plantações só foram iniciadas por volta de 1904. Desde então, o cultivo de *Eucalyptus* tem sido bastante criticado por supostos danos ecológicos e sociais (FAO, 1985; HIGA, 1995). Deve ser ressaltado porém que, de uma maneira geral, as plantações florestais ocupam áreas marginais, terras esgotadas pelas culturas agrícolas e/ou por pastagens degradadas (POGGIANI, 1995). É provável que o impacto das plantações de *Eucalyptus* sobre a fauna local seja muito menos destrutivo do que o de outras culturas tais como trigo, cana-de-açúcar ou arroz (AUSTRALIAN CENTRE FOR INTERNATIONAL

AGRICULTURAL RESEARCH, 1992). Além disso, a silvicultura já apresenta atualmente um sensível avanço no processo de plantio dessa espécie, o que diminui os impactos ambientais inerentes a essa cultura. O *Eucalyptus* tem contribuído cada vez mais para a redução do déficit de madeira em todo o mundo, aliviando a pressão sobre as florestas nativas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 1995; UNGARETTI, 1995).

Quanto aos aspectos sociais, é importante ressaltar que a indústria de base florestal, além de garantir o emprego, direta e indiretamente, de dois milhões e setecentos mil brasileiros, participa da formação de comunidades inteiras, ajudando a formar gerações mais qualificadas advindas das contribuições desse setor em benefícios às populações locais, além de contribuir para geração de receitas e aumento das exportações (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 1995; 1997).

Em Santa Catarina, a economia madeireira iniciou-se a partir dos anos 60 com auxílio dos incentivos fiscais do extinto IBDF, que estimulou o plantio de florestas, basicamente de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp.. As plantações de *Eucalyptus* ocupam o segundo lugar no estado, predominando as espécies *Eucalyptus grandis*, *E. dunnii* e *E. viminalis*. Segundo HIGA (1995), o setor florestal de Santa Catarina gera 116 mil empregos, e contribuiu, no ano de 1993, com 14% do ICMS e aproximadamente com US\$ 231 milhões de exportação. Essa atividade contribui, ainda, para a diminuição da devastação das florestas naturais existentes protegendo os ecossistemas locais. O incentivo a esse setor objetiva, também, atender ao crescimento da demanda de produtos florestais.

Eucalyptus globulus, ou "Tasmanian Blue Gum", é nativa do sul da Austrália onde é encontrada naturalmente nos Estados de Vitória e Tasmânia, em condições de clima moderado pelo efeito marítimo (LOPEZ et al., 1997). É uma das espécies exóticas mais amplamente plantadas no mundo, com plantações nas zonas temperadas de vários continentes (Europa, África, e América do Sul) (ORME, 1983), possuindo, porém, algumas exigências climáticas que limitam as possibilidades de adaptação desta espécie a poucos locais no mundo. As principais exigências são: existência de chuvas de inverno; temperaturas mínimas absolutas não inferiores a - 5°C, verão ameno, com temperaturas médias não superiores a 28°C, solos profundos, bem drenados e boa fertilidade (T.F. de Assis, comunicação pessoal). Além da sua utilização

para produção de polpa e papel, postes, combustível e madeira para construção (ORME, 1983), as folhas de *E. globulus* são importantes no uso medicinal como antisséptico das vias respiratórias, expectorante e antifebril (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 1995).

Na Argentina, foi a primeira espécie de *Eucalyptus* introduzida (MENDONZA, 1983). No Chile, com um cultivo de 9,7 mil hectares/ano essa espécie destina-se principalmente à obtenção de celulose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 1995).

No Brasil, o interesse no plantio dessa espécie é o mesmo. *E. globulus* caracteristicamente apresenta menor teor de lignina (21,3%) em relação a outras espécies de *Eucalyptus* tradicionalmente utilizadas para celulose (por exemplo, *E. grandis* e *E. saligna*) (SANSÍGOLO e CURVELO, 1994). Devido a todas essas qualidades positivas, o interesse dos reflorestadores na sua adaptação no Brasil vem aumentando. De acordo com A. R. Higa (comunicação pessoal) a utilização do *E. globulus* pelo setor de celulose e papel, devido a sua característica de baixa quantidade de lignina, representaria uma economia anual de cerca de 5 milhões de dólares em relação a outras espécies.

Segundo o Eng^o Teotônio F. de Assis (comunicação pessoal), a Riocell, no Rio Grande do Sul, iniciou recentemente um programa de plantio dessa espécie em maior escala. De acordo com este profissional, o interesse na introdução do *E. globulus* no Brasil se deve principalmente às características tecnológicas de sua madeira, como baixos teores de lignina, que têm influência direta nos custos de deslignificação, a alta densidade e o alto rendimento industrial, ambos com impactos relevantes no consumo específico. A Riocell vem desenvolvendo estudos de melhoramento genético para desenvolver populações adaptadas e cruzamentos interespecíficos com espécies botanicamente compatíveis (*E. grandis*, *E. viminalis*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. dunnii*), com objetivo de adaptar essa espécie ao clima e às condições brasileiras.

3 - A Dupla Simbiose Micorrízica em *Eucalyptus* spp.

As espécies do gênero *Eucalyptus* apresentam dois tipos de simbiose micorrízica: as micorrizas arbusculares (MA) e as ectomicorrizas (ECM). A presença de ECM nas espécies de *Eucalyptus* foi mencionada, pela primeira vez, em 1917 por VAN

DER BIJL (1918), citado por MULLETTE (1976), e somente em 1934 foi descrita a ocorrência de MA, em *E. globulus* (ASAI, 1934). A ocorrência de ECM em *Eucalyptus* foi constatada posteriormente por diversos autores. CHILVERS e PRYOR (1965) examinaram diversas espécies de *Eucalyptus* e constataram que todas eram capazes de formar ECM em associação a um fungo compatível. Desde então, vários autores têm indicado que ambos os tipos podem estar presentes independentemente ou simultaneamente nas raízes (LAPEYRIE e CHILVERS, 1985; CHILVERS et al., 1987; BOUDARGA et al., 1990; BELLEI et al., 1992; ESTRADA et al., 1993).

Eucalyptus spp. podem associar-se a espécies de diversos gêneros de fungos ECM, dentre elas: *Amylascus*, *Austrogautieria*, *Boletus*, *Castoreum*, *Chondrogaster*, *Cortinarius*, *Hydnangium*, *Hymenogaster*, *Inocybe*, *Mesophelia*, *Pisolithus*, *Ramaria*, *Scleroderma*, *Setchelliogaster*, *Sphaerosoma*, *Tricholoma* (TRAPPE, 1962; MOLINA et al., 1992).

No Centro-leste e Leste brasileiros, os fungos ECM mais comumente encontrados associados com *Eucalyptus* spp. são: *Pisolithus* spp. e *Scleroderma* spp. (BARROS et al., 1978). Mas, em Santa Catarina, foram observados os seguintes gêneros: *Chondrogaster*, *Descomyces*, *Hysterangium*, *Laccaria*, *Pisolithus*, *Ramaria*, *Scleroderma*, *Setchelliogaster* e *Thelephora* (GIACHINI e OLIVEIRA, 1997).

A presença de micorrizas do tipo MA em espécies de *Eucalyptus* tem sido relatada por diversos autores. Após o primeiro relato (ASAI, 1934), KHAN (1978) relatou a presença desse tipo de micorriza em *E. pilularis* e *E. paniculata*. No Brasil, ZAMBOLIM e BARROS (1982) foram os primeiros a observar a presença de MA em diferentes espécies deste gênero crescendo em condições de campo. As estruturas fúngicas típicas observadas na região do córtex radicular foram as vesículas, observando-se, também, esporos de fungos MA crescendo sobre as raízes das plantas. O gênero *Acaulospora* spp. predominou nas amostras de solo rizosférico coletadas de diversas plantações, seguido por *Glomus* spp. e *Gigaspora* spp. (ZAMBOLIM e BARROS, 1982). Segundo MALAJCZUK et al. (1981), as estruturas MA nas raízes de *Eucalyptus* são semelhantes àquelas encontradas em outros hospedeiros MA.

Na região de Viçosa-MG, foi observada a ocorrência de fungos MA em viveiro e em duas florestas de *Eucalyptus*. As espécies encontradas foram *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus clarum* e uma terceira não identificada. Foram observados

vesículas e micélio na região do córtex, não tendo sido observados arbúsculos. Além das MA, foi observada, também, a incidência de ECM em *Eucalyptus* nesses locais. Os gêneros encontrados foram *Scleroderma* e *Pisolithus*. A incidência desses tipos de fungos foi correlacionada a fatores ecológicos como temperatura do ar, pluviosidade e tipo de solo (pH) (ESTRADA et al., 1993). BRUNDRETT e ABBOTT (1991), em um levantamento com espécies arbustivas e herbáceas de uma floresta australiana, observaram a ocorrência de ECM e MA em *E. calophylla*, *E. drummondii*, *E. marginata* e *E. patens*. Já em outro estudo sobre plantas do deserto, foi observada a presença de MA e ECM em *E. globosa* e *E. cupressus* (MEJSTRÍK e CUDLÍN, 1983). GARDNER e MALAJCZUK (1988), monitorando micorrizas durante um programa de reabilitação de um sítio de mineração de bauxita, de idades variando de 1 a 7 anos, e onde quatro espécies de *Eucalyptus* foram plantadas, verificaram que a diversidade e a abundância dos dois tipos de fungos micorrízicos aumentaram com a idade do sítio. Os autores observaram a presença de MA nas espécies *E. calophylla*, *E. marginata* e *E. resinifera*.

Em plantações de *E. viminalis* em Santa Catarina, observou-se que esta espécie tinha a dupla associação em um padrão sucessional, provavelmente relacionado à idade da planta. A porcentagem de MA era maior em plantas jovens (até 7-8 meses), enquanto que a porcentagem de ECM aumentava gradualmente com a idade da planta (BELLEI et al., 1992). Esses resultados estão de acordo com as observações de LAPEYRIE e CHILVERS (1985) e CHILVERS et al. (1987).

Por outro lado, em um estudo realizado a campo por OLIVEIRA et al. (1997), também em Santa Catarina, ficou comprovado que o precedente cultural, além do potencial de inóculo e da especificidade fungo-hospedeiro poderia ser responsável pela dinâmica de colonização. Nas seis plantações de *E. dunnii* estudadas, foram observados três padrões de colonização radicular dependendo do tipo de hospedeiro micorrízico plantado anteriormente no local: soja (MA), *E. viminalis* (MA/ECM) ou *Pinus taeda* (ECM). No sítio usado anteriormente para agricultura, cujo precedente cultural era soja, a intensidade de colonização dos *Eucalyptus* por MA foi alta nos primeiros meses após transplântio, mas diminuiu com o tempo, atingindo níveis insignificantes ao final de 13 meses de estudo. A colonização ECM, por outro lado, apresentou-se baixa nos primeiros meses, aumentando linearmente com a idade das plantas. Nos sítios anteriormente cultivados com *E. viminalis*, a porcentagem de

colonização MA permaneceu baixa no decorrer do período com ligeiras flutuações. A colonização ECM, também baixa no período inicial, aumentou rapidamente até atingir um *plateau* por volta do sétimo ao oitavo mês após o transplante. Finalmente, no sítio plantado anteriormente com *P. taeda*, ambos os tipos de micorrizas aumentaram de intensidade no período, mas nunca atingindo os níveis observados nos demais locais.

Como pode ser visto, a ocorrência da dupla simbiose em *Eucalyptus* parece ser um fenômeno comum em condições naturais, cuja dinâmica pode estar relacionada a fatores de ambiente (temperatura do ar, pluviosidade, pH do solo) assim como a fatores ligados ao hospedeiro (idade, fisiologia) e a interações e relações de especificidade entre fungo-hospedeiro. Além desses fatores, o precedente cultural e o potencial de inóculo podem desempenhar um papel importante nessa ocorrência, demonstrando a importância das interações entre a planta, o fungo, o solo e o ambiente. Não está ainda claro, no entanto, qual a importância relativa desses dois tipos de associação na promoção do crescimento das plantas, nem qual a melhor combinação entre os fatores que possa maximizar os benefícios advindos dessas associações.

São inúmeras as publicações que relatam o efeito da inoculação de fungos ECM sobre o crescimento de *Eucalyptus* spp. O papel das MA no estabelecimento e manutenção dessas plantas tem sido, porém, pouco estudado.

No primeiro caso, destaca-se ASHTON (1976) que estudou o efeito da inoculação de *E. regnans* com o fungo ectomicorrízico *Mesophellia arenaria* e observou que a inoculação promoveu aumentos no crescimento dessa espécie, tanto em condições controladas quanto a campo. A intensidade de colonização foi dependente da intensidade de luz e dos níveis de fertilização nitrogenada.

Já HEINRICH et al. (1988), observaram que a inoculação de *E. pilularis* com o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* levou a aumentos na absorção de fósforo e de biomassa em locais com teores limitantes desse elemento. Resultados semelhantes foram obtidos por BOUGHER et al. (1990) com *E. diversicolor* inoculado com dois fungos ECM, dos quais destacou-se *Laccaria laccata*.

O fungo *L. laccata* também promoveu os melhores resultados no crescimento dessa planta em um estudo sobre o efeito de 4 níveis de umidade na colonização radicular e no crescimento de *E. diversicolor*, quando comparado aos fungos *Descolea maculata* e *Pisolithus tinctorius* (BOUGHER e MALAJCZUK, 1990).

O efeito da umidade na formação de micorrizas variou conforme a espécie fúngica, mas foi particularmente acentuado com *P. tinctorius*. Em contraste, *L. laccata* manteve uma elevada porcentagem de colonização em todos os níveis de umidade, exceto no nível próximo da saturação.

A inoculação de plântulas de *E. camaldulensis* com *P. tinctorius* promoveu um aumento significativo no conteúdo de macro e micronutrientes em relação ao outro fungo testado (*Thelephora terrestris*), sugerindo que os fungos ECM diferem na sua habilidade de proporcionar nutrientes ao hospedeiro. Além disso, as plantas inoculadas com *P. tinctorius* apresentaram mais micorrizas que as inoculadas com *T. terrestris* (DIXON e HIOL-HIOL, 1992).

Em outro estudo, BURGESS et al. (1993) testaram a infectividade e a eficiência de 16 isolados fúngicos em relação a *E. globulus* e *E. diversicolor*, em casa-de-vegetação. Foram testados, ainda, dois níveis de fósforo no substrato (4 e 12 ppm). Não foram observadas diferenças no peso de matéria seca entre as plantas de *E. globulus* inoculadas e não inoculadas no nível de 12 ppm. Nesse mesmo nível, uma série de isolados causou diminuição de crescimento em *E. diversicolor*. Porém, ao nível de 4 ppm, a inoculação aumentou o crescimento em ambas as espécies. Posteriormente, BURGESS et al. (1994) compararam vinte isolados de *Pisolithus* quanto à capacidade de infectar *Eucalyptus grandis* *in vitro* e estimular o crescimento *in vivo*. A estimulação do crescimento variou entre os isolados de *Pisolithus*, tendo sido, porém, superior à testemunha. Essa estimulação foi positivamente correlacionada com a intensidade (%) de colonização radicular.

THOMSON et al. (1994) testaram quarenta e sete diferentes isolados de fungos ECM, de dezesseis diferentes gêneros, quanto a sua efetividade no aumento do crescimento de *E. globulus*. Foram observadas grandes variações entre os fungos e os isolados testados. *D. maculata*, *L. laccata*, *Hebeloma westraliense* e *P. tinctorius* foram os mais efetivos quanto à promoção de crescimento, porém com variações entre os isolados da mesma espécie. Quanto à colonização micorrízica, também foram observadas grandes variações, tanto entre as espécies fúngicas quanto entre os isolados da mesma espécie.

Assim, esses estudos demonstraram que a inoculação das plantas com fungos ECM tem proporcionado, na maioria dos casos, bons resultados nas diferentes

espécies de *Eucalyptus* principalmente em termos de aumentos de absorção de nutrientes e biomassa. As variações observadas ocorreram principalmente em relação às espécies fúngicas utilizadas e, algumas vezes, devido à planta, sugerindo que certas combinações fungo-hospedeiro possam ser mais bem sucedidas.

O primeiro experimento de inoculação de *Eucalyptus* com fungos MA foi realizado por MALAJCZUK et al. (1981), onde observaram-se MA típicas em plântulas de *E. marginata* e *E. diversicolor*, inoculadas com *Glomus fasciculatus* (= *G. fasciculatum*). Um ano depois, ZAMBOLIM et al. (1982) avaliaram o efeito de seis espécies do gênero *Glomus* sobre o crescimento e absorção de nutrientes por mudas de *Eucalyptus* spp., em casa-de-vegetação. O crescimento e a absorção de nutrientes minerais foram favorecidos nas plantas inoculadas. Além disso, a eficiência de utilização do elemento absorvido pelas plantas para produção de matéria seca foi afetada pela espécie fúngica, sugerindo diferenças de compatibilidade fungo-hospedeiro ou diferentes graus de eficiência entre as espécies fúngicas testadas.

Em outro estudo, testou-se o efeito de trinta isolados de fungos MA (em sua maioria espécies de *Glomus*, *Gigaspora* e *Acaulospora*) tendo sido observado que nenhum dos isolados foi capaz de estimular o crescimento das oito espécies de *Eucalyptus*, após três meses de inoculação. As diferenças de crescimento foram atribuídas a prováveis diferenças nos níveis de nutrientes nos substratos (GOMES et al., 1987). Um resultado semelhante foi observado por Machado e colaboradores (MACHADO et al., 1988) que estudaram o efeito de fungos MA sobre o crescimento de *E. citriodora* em diferentes substratos. Não foram observadas interações significativas entre substrato e inóculo, mas a inoculação micorrízica favoreceu à emergência das plântulas, não afetando, porém, o crescimento das mesmas, sendo este influenciado, apenas, pelo tipo de substrato de plantio.

O trabalho mais recente sobre o efeito da inoculação de fungos MA em *Eucalyptus* foi realizado por ADJOUND et al. (1996). Foi estudado o efeito de três fungos *G. intraradices*, *G. mosseae* e *G. caledonium* no crescimento e absorção de fósforo de onze espécies de *Eucalyptus*. Após vinte semanas da inoculação micorrízica, as plântulas inoculadas aumentaram seu peso seco em até 49% quando comparadas às não inoculadas (testemunha). A porcentagem de colonização foi variável em função da espécie de *Eucalyptus* e isto foi atribuído a fenômenos de especificidade fungo-

hospedeiro. Não foi observada porém, uma correlação entre a estimulação do crescimento e o aumento da concentração foliar de fósforo, ou entre a extensão da colonização radicular e a estimulação do crescimento e o aumento da concentração foliar de fósforo.

A ocorrência da dupla simbiose em espécies de *Eucalyptus* foi relatada pela primeira vez por LAPEYRIE e CHILVERS (1985), que observaram colonização por fungos MA e ECM em *E. dumosa*, quando essas plantas foram introduzidas em solo esterilizado e inoculado com solo natural de uma floresta da mesma espécie. Nesse mesmo estudo, foi observado que o estímulo de crescimento parecia estar associado à infecção primária das plantas por MA e que as ECM, formadas posteriormente, tenderam a substituir as MA.

Para maiores detalhes sobre esse fenômeno, CHILVERS et al. (1987) reexaminaram o material vegetal do experimento de LAPEYRIE e CHILVERS (1985) e constataram a ocorrência de colonização MA e ECM na mesma planta e no mesmo ápice radicular. Os resultados desse segundo estudo confirmaram a ocorrência de uma sucessão MA/ECM. As MA predominando no período inicial (2 meses), onde representavam cerca de 50% do número de raízes contra apenas 10% de ECM. Aos 5 meses, a situação se invertia, com as ECM predominando em relação às MA, nas mesmas proporções. Esses autores relacionaram essa sucessão ao alto potencial de inóculo inicial dos fungos MA. Esse potencial seria resultante de fatores como o tamanho e a densidade de esporos de fungos MA, germinação mais rápida e maior quantidade de substâncias de reserva disponível nos esporos, em relação às ECM.

Estudos comparativos do efeito desses dois tipos de fungos (inoculados isolada ou conjuntamente), em condições controladas, apresentam resultados conflitantes. AMORIM (1988), estudou a contribuição de fungos MA em mistura (*Gigaspora heterogama*, *Acaulospora scrobiculata* e *Glomus macrocarpum*; e *Gi. heterogama*, *A. scrobiculata* e *G. fasciculatum*) e de fungos ECM (dois isolados de *P. tinctorius*, IS-83 e Pt-298, e *Paxilus involutus*), inoculados simultânea ou separadamente, sobre a absorção de nutrientes e o crescimento em plântulas de *E. grandis*, em casa-de-vegetação. As plantas inoculadas apenas com fungos ECM foram as que apresentaram os maiores valores de produção de matéria seca e absorção de nutrientes. A dupla inoculação promoveu um melhor desempenho em relação às plantas

testemunhas (não inoculadas), ao passo que a inoculação isolada de fungos MA não proporcionou diferenças significativas nos parâmetros avaliados. Dos fungos ECM testados, o isolado de *P. tinctorius* (IS-83) foi o mais eficiente na absorção de nutrientes e na promoção de crescimento.

SANTOS (1993) estudou a dinâmica de infecção MA - ECM em casa-de-vegetação em cinco espécies de *Eucalyptus*. Os tratamentos consistiram da inoculação isolada e conjunta de *Glomus etunicatum* e *Pisolithus tinctorius* em plantas de *E. camaldulensis*, *E. urophylla*, *E. citriodora*, *E. grandis* e *E. cloeziana*. Observou-se a colonização do mesmo segmento de raiz pelos dois tipos de fungos e uma sucessão MA/ECM na colonização radicular nas mudas que receberam inoculação conjunta, à semelhança dos resultados obtidos por CHILVERS et al. (1987). A partir dos 120 dias, a porcentagem de colonização MA diminuiu na presença de *P. tinctorius*. Também foram evidenciadas variações no crescimento e na compatibilidade fungo-hospedeiro, entre as espécies de *Eucalyptus*.

Em outro estudo semelhante com *E. globulus*, sobre o efeito do fungo micorrízico arbuscular *Glomus invermaium* e do fungo ectomicorrízico *Descolea maculata*, foi verificado que *D. maculata*, embora colonizando as plantas mais tardiamente, foi mais eficiente na promoção do crescimento e absorção de fósforo pelas plantas que o fungo MA, *G. invermaium*. Mesmo quando a planta foi inoculada com os dois fungos simultaneamente, os parâmetros de nutrição e crescimento foram positivamente correlacionados com a colonização ECM mas não com a colonização MA (OLIVEIRA et al., 1996).

Em um estudo semelhante, testando dois fungos MA, *Glomus invermaium* e *Acaulospora laevis*, e dois fungos ECM *Pisolithus* sp. e *Descolea maculata* inoculados conjunta ou separadamente em *E. globulus*, WU et al. (1996) observaram que o peso total das plantas inoculadas com *Pisolithus* sp. e *D. maculata* aumentou em 44% e 54%, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas. A colonização pelos fungos MA foi alta, porém não foram observadas diferenças entre as plantas deste tratamento e as não inoculadas quanto ao peso de matéria seca. Entretanto, quando fungos MA foram inoculados juntamente com o fungo ectomicorrízico *Pisolithus* sp., observou-se um efeito negativo no crescimento das plantas, o mesmo não ocorrendo quando os fungos MA foram inoculados juntamente com *D. maculata*. Os autores sugerem que *D.*

maculata seria um fungo com maior habilidade competitiva em relação aos MA e *Pisolithus*.

BOUDARGA et al. (1990) desenvolveram uma técnica *in vitro* de inoculação mista que permitiria o estudo das interações entre os simbioses. Nas observações feitas por esses autores, através de microscopia eletrônica, foi demonstrado que ambos simbioses coexistem no mesmo ápice radicular, sem qualquer antagonismo entre eles, o que vem confirmar as observações de CHILVERS et al. (1987).

Uma análise mais resumida dos resultados que acabam de ser apresentados permite destacar dois aspectos que parecem representar uma tendência no padrão de colonização de *Eucalyptus* spp. por fungos MA e ECM, assim como na eficiência relativa destes na promoção do crescimento dessas espécies.

Nesses estudos, têm sido observado que plântulas de algumas espécies de *Eucalyptus* associam-se facilmente a fungos MA e que estes colonizam o sistema radicular mais rapidamente que os fungos ECM. Entretanto, o nível de colonização estabelecido parece diminuir com a idade da planta, embora as duas associações possam coexistir no mesmo sistema radicular. Isto é considerado o resultado de diferenças na capacidade de colonização dos dois tipos de fungos. Os fungos MA são considerados mais eficientes que os ECM na colonização primária, que se estabelece a partir do propágulo fúngico presente no solo. Já os fungos ECM seriam mais eficientes na colonização secundária, colonizando rapidamente o sistema radicular a partir de pontos de infecção previamente estabelecidos (CHILVERS et al., 1987).

Além dos fatores relacionados à competição por sítios de infecção anteriormente mencionados, diversos autores têm sugerido que tal substituição poderia, também, ser atribuída à competição por um substrato limitante e barreiras mecânicas (CHILVERS et al., 1987; LODGE e WENTWORTH, 1990), mas não existem dados que comprovem essas hipóteses. As MA podem ser consideradas, assim, uma opção de primeiro estágio na sucessão micorrízica (CHILVERS et al., 1987).

É necessário considerar, entretanto, que esse padrão de colonização pode ser influenciado por fatores externos como o precedente cultural do solo (OLIVEIRA et al., 1997), provavelmente refletindo diferenças no potencial de inóculo.

Os resultados experimentais também demonstram uma maior eficiência dos fungos ECM na promoção do crescimento quando comparados aos fungos MA.

Entretanto, tais resultados referem-se a apenas um isolado de cada fungo e a plantas provenientes de sementes de mesma origem, não podendo, portanto, ser extrapolados para diferentes combinações fungos-hospedeiro ou plantas de diferentes origens genéticas.

Dessa forma, a necessidade de estudos para demonstrar o efeito de fatores que influenciam a dominância de um dos tipos de micorrizas é de extrema importância para a compreensão e aplicação das simbioses micorrízicas em *Eucalyptus*.

A espécie hospedeira estudada, o *E. globulus*, é uma das espécies de maior interesse das indústrias de celulose e papel atualmente em grande parte do mundo, e diversas tentativas de sua introdução nas condições ambientais brasileiras já foram feitas. São duas as principais linhas que tentam explicar as dificuldades de adaptação dessa espécie às nossas condições. Uma delas diz respeito às suas exigências climáticas e a outra a sua provável necessidade de associação a um fungo micorrízico compatível.

É bem conhecido que os microrganismos do solo, dentre eles os fungos micorrízicos, e seus processos desempenham um papel importante na produtividade, recuperação e estabilidade de ecossistemas (HAWKSWORTH, 1991; AMARANTHUS e LUOMA, 1995). Os fungos micorrízicos podem auxiliar e, algumas vezes, acelerar a reabilitação de áreas degradadas e áreas pioneiras (KHAN, 1978; GARDNER e MALAJCZUK, 1988). Além disso, podem ser utilizados como ferramentas para adaptação de determinadas espécies a novos habitats. Plantas associadas a fungos micorrízicos estão melhor preparadas para iniciar a exploração do solo e, portanto, têm uma melhor chance de sobrevivência e crescimento (KROPP e LANGLOIS, 1990). Experimentos realizados a campo com plantas inoculadas com fungos ECM selecionados, por exemplo, freqüentemente mostram aumentos nas taxas de sobrevivência e crescimento das plantas em relação às plantas não inoculadas, especialmente em áreas deficientes em fungos ECM (PARLADÉ et al., 1996).

Deste modo, surge a necessidade de se desenvolverem estudos sobre a infectividade e a eficiência desses dois tipos de fungos micorrízicos em relação a essa espécie, assim como o efeito de diferentes formas de inoculação na dinâmica de colonização, considerando que o tempo de contato fungo-raiz pode variar amplamente nos diferentes locais e circunstâncias. Espera-se que os resultados permitam definir estratégias de controle de micorrização para essa espécie e, com isso, contribuir para seu

cultivo sob nossas condições. Isso poderia ser considerado um primeiro passo para o uso biotecnológico desses fungos para posteriormente produzi-los em larga escala, a exemplo do que é feito com *Pisolithus tinctorius* que tem sido usado comercialmente em inoculações em viveiro ou em áreas degradadas em recuperação nos Estados Unidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Micorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

1- A Planta Hospedeira

A espécie vegetal utilizada foi *Eucalyptus globulus* Labill., cujas sementes foram gentilmente cedidas pela Facultad de Agronomia, Universidad de la República, Uruguai, sendo provenientes do Chile, tendo sido colhidas em 1993.

2- Germinação das Sementes

As sementes foram germinadas numa solução de sulfato de cálcio 500 μ M ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e ácido bórico 3 μ M. Para isso, foram mantidas nessa solução sob condições de aeração forçada durante cerca de 4 dias, sendo, então, transferidas para o substrato de plantio.

3- Os Fungos Micorrízicos

As espécies fúngicas, micorrízica arbuscular (MA) e ectomicorrízica (ECM), foram selecionadas de acordo com os resultados de experimento preliminar (Resultados não publicados). Nesse experimento, foram comparadas duas espécies MA e duas ECM disponíveis nas coleções de culturas dos Laboratórios de Micorrizas.

A espécie fúngica ectomicorrízica, *Pisolithus tinctorius*, foi obtida da coleção de fungos do Laboratório de Ectomicorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Este isolado foi proveniente da coleção australiana da "CSIRO"

(Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization's - Austrália), sob o código H-4943 (Tabela 1). Na coleção da UFSC, este isolado é denominado Pt-46, sendo mantido rotineiramente em meio sólido Melin-Norkrans Modificado (MNM) (MARX,1969), em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, a 25°C, em incubadora B.O.D., sob condições de obscuridade.

Foram utilizadas inicialmente duas culturas do isolado, a partir das quais foram feitas 5 novas culturas, e estas mantidas nas mesmas condições de cultivo descritas anteriormente. Após 4 semanas de crescimento, o fungo foi novamente repicado em 10 novas placas para obtenção de culturas a ser utilizadas nos experimentos.

A espécie fúngica micorrízica arbuscular foi obtida da coleção de fungos do Laboratório de Microbiologia do Solo, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia. O isolado de *Glomus clarum* (Tabela 1) foi proveniente da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) do Rio de Janeiro. O fungo foi cedido na forma de solo inóculo (120 g), constituído de uma mistura de esporos, hifas, fragmentos de raízes em solo e areia. Este isolado foi, então, multiplicado conforme descrição no item 4.2.

Tabela 1 - Fungos micorrízicos com seus respectivos hospedeiros e procedências.

Espécie Fúngica	Hospedeiro de Isolamento	Procedência
<i>Pisolithus tinctorius</i> (Pers.) Coker & Couch (Isolado H-4943)*	<i>Eucalyptus</i> sp.	CSIRO – Austrália
<i>Glomus clarum</i> Nicol. & Schenck	Não determinado	EMBRAPA - RJ

*Na coleção da UFSC, isolado Pt-46.

4- Produção do Inóculo Fúngico

4. 1 - Ectomicorrízico

Para a obtenção do inóculo, o fungo foi cultivado inicialmente em meio sólido (25 mL) Melin-Norkrans Modificado (MNM), e mantido nas mesmas condições

descritas no item 3, por 4 semanas. Após esse período, as culturas foram utilizadas na preparação do inóculo através da fragmentação do micélio em homogeneizador (líqüidificador), durante 5 s, em meio MNM semi-sólido, diluído 1/20, sob condições assépticas de fluxo laminar. A suspensão miceliana, assim obtida, foi testada quanto à viabilidade e pureza pela inoculação imediata de 1 mL em meio MNM sólido em placas de Petri, sendo, em seguida, mantida em incubação sob as mesmas condições descritas para as culturas originais, durante 25 dias (cf. item 3) (Figura 4).

As placas contendo a amostra de suspensão miceliana foram, também, incubadas nessas condições e observadas diariamente durante uma semana, sendo então descartadas.

4.2. Micorrízico Arbuscular

O inóculo do fungo micorrízico arbuscular foi produzido a partir de cultura em vaso, utilizando como substrato uma mistura de areia de rio e terra roxa na proporção 3:1, cuja análise encontra-se no Anexo 1. Esse substrato foi semeado com sorgo, como hospedeiro multiplicador, e mantido em casa-de-vegetação, por um período de 5 meses, sendo regado diariamente com água destilada. Durante esse período, foram coletadas amostras de raízes e de substrato para avaliar a ocorrência de colonização radicular e a presença de esporos (Figura 5).

Paralelamente ao procedimento de multiplicação do fungo micorrízico arbuscular, foram preparadas plantas testemunhas da mesma espécie em dois vasos contendo o mesmo substrato mas sem inoculação de fungos micorrízicos arbusculares, as quais foram mantidas nas mesmas condições de ambiente das plantas inoculadas.

A presença de esporos foi avaliada pela técnica de separação de esporos de fungos MA descrita por BRUNDRETT (1994). Para isso, uma amostra de solo de aproximadamente 50 g foi misturada a 2000 mL de água sob agitação. Após a decantação do solo, a suspensão foi vertida em duas peneiras sobrepostas de malhas 0,149 mm e 0,053 mm. A peneira com malha de 0,149 mm sendo utilizada para separar resíduos de solo e raízes, enquanto que a peneira de 0,053 mm para recuperar os esporos. Esse processo continuou até que todo o solo da amostra passasse através das peneiras. O material retido na segunda peneira foi colocado em tubos de centrífuga e o

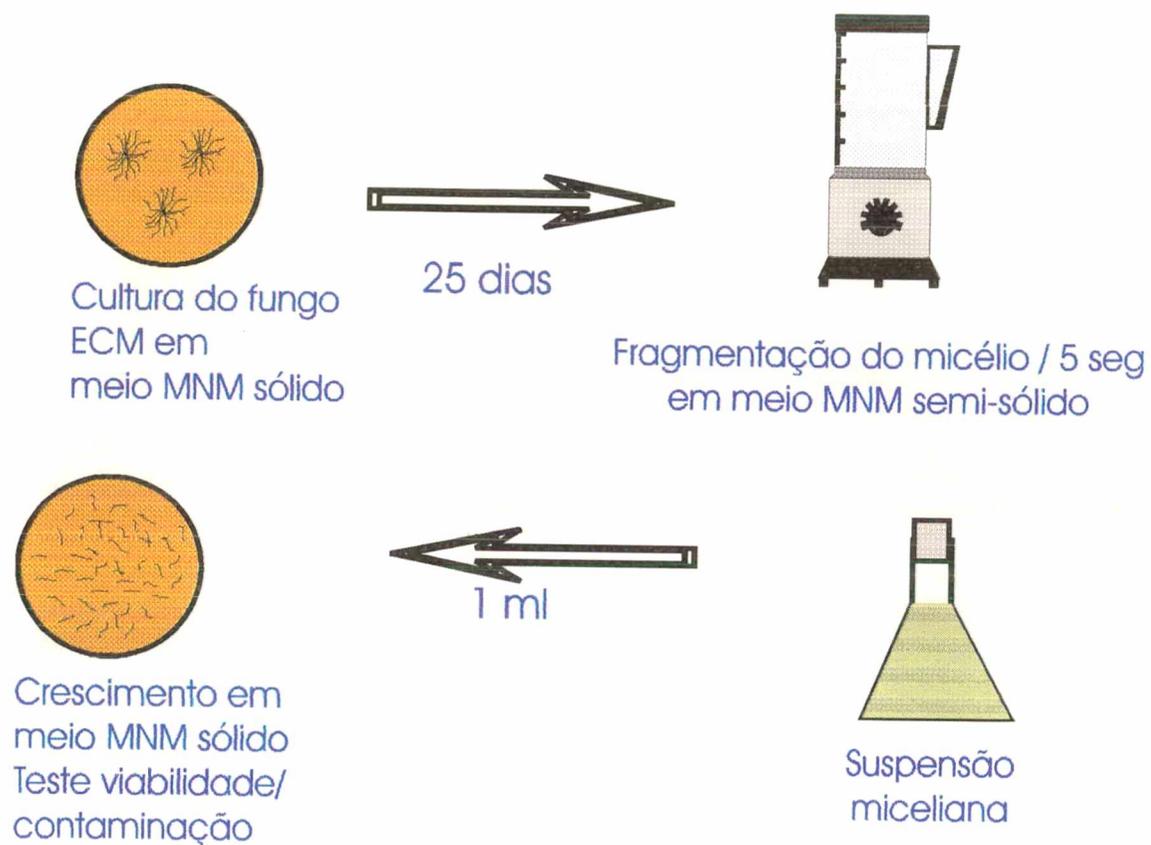


Figura 4 –Técnica de preparação do inóculo fúngico ectomicorrízico.

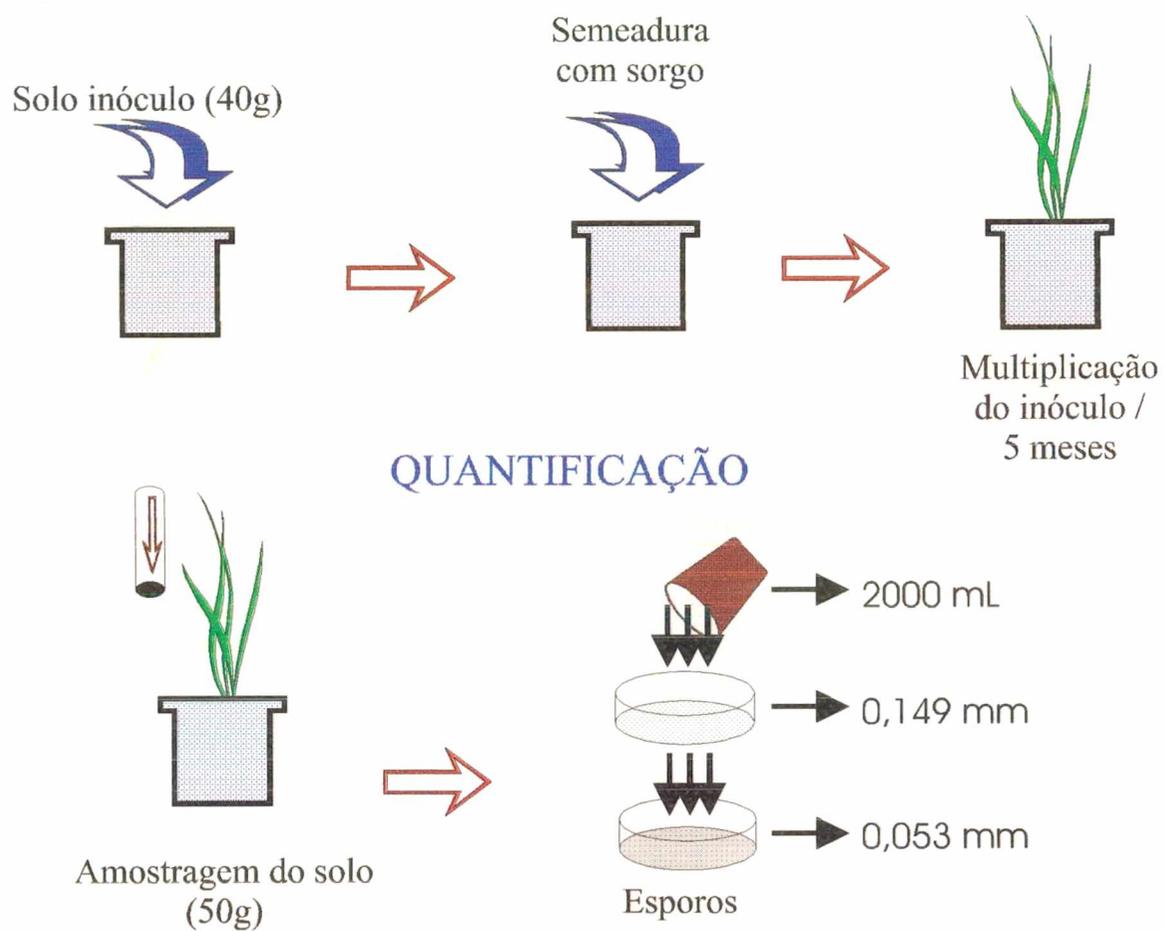


Figura 5 – Técnica de preparação do inóculo fúngico micorrízico arbuscular e da quantificação dos propágulos.

volume foi completado com água para 30 mL. Em seguida, foi centrifugado a 582 g, durante 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado sendo feita uma segunda centrifugação, na qual o material precipitado foi ressuspensionado em solução de sacarose 50% (peso/volume) e centrifugado durante 1 min a 582 g. O sobrenadante, contendo os esporos, foi vertido em peneira (0,053 mm) e cuidadosamente lavado com água para remoção da sacarose. Em seguida, os esporos lavados foram transferidos para placas de Petri e observados ao microscópio estereoscópio (30 X).

As raízes foram coradas pela técnica descrita por PHILLIPS e HAYMAN (1970), modificada por KOSKE e GEMMA (1989). Para isso, foram inicialmente submetidas a um tratamento de descoloração numa solução de KOH 2,5%, em banho-maria a 90°C durante 30 min. Em seguida, foram lavadas em água corrente e imersas em H₂O₂ alcalina (3 mL NH₄OH 20% em 30mL H₂O₂ 3%) durante 30 min, à temperatura ambiente. Após nova lavagem em água corrente, as raízes foram tratadas com HCl 1% por 60 min e, em seguida, coradas com solução de azul de tripan (0,05% de azul de tripan, 500 mL de glicerol, 450 mL de H₂O, 50 mL de HCl 1%) em banho-maria a 90°C, durante 30 min. Após esse tratamento, o corante foi eliminado por filtração e as raízes foram conservadas em glicerol acidificado (500 mL de glicerol, 450 mL de H₂O, 50 mL de HCl 1%) até o momento das observações.

Após 5 meses, as plantas deixaram de ser regadas durante 3 semanas sendo, então, eliminada a parte aérea. O substrato, juntamente com as raízes colonizadas, os esporos e as hifas, foi utilizado na inoculação das plantas.

5- Substrato de Plantio

O substrato de plantio consistiu de areia quartzosa, coletada nas dunas fixas da Lagoa da Conceição (Florianópolis-SC), cuja análise química encontra-se no Anexo 2. A areia foi peneirada e lavada em água corrente durante 3 dias e esterilizada em autoclave a 120°C durante 1 h. Após a esterilização, a areia foi distribuída em vasos plásticos, revestidos interiormente com sacos de polietileno. Os vasos foram

previamente lavados e imersos em solução de hipoclorito de sódio (2,5%), durante 24 horas, para desinfecção, e deixados para secar ao ar.

Em seguida, a areia foi fertilizada com a solução nutritiva descrita por BOUGHER e MALAJCZUK (1990), contendo os seguintes nutrientes (mg/kg de areia): $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 51,5; K_2SO_4 , 111,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 33,7; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 16,9; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 8,2; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 9,2; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,34; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,46; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 1,1, deixando-se secar à temperatura ambiente. Após a secagem da solução nutritiva, foi aplicado fósforo, na forma de fosfato de cálcio [$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$], de modo a obter 7,5 ppm de fósforo. Quinzenalmente, foram aplicados 15 mL de uma solução de nitrato de amônio (NH_4NO_3), de forma a obter 18 mg N kg^{-1} (BOUGHER e MALAJCZUK, 1990).

6- Montagem e condução dos experimentos

Foram realizados dois experimentos com o objetivo de avaliar os efeitos dos isolados fúngicos sobre a absorção de fósforo e o crescimento pelo hospedeiro. Num deles, avaliou-se o efeito da inoculação dos fungos ectomicorrízico e micorrízico arbuscular, em conjunto, ou isoladamente. No outro, avaliou-se o efeito da seqüência de inoculação com os dois diferentes fungos sobre esses parâmetros.

6.1. Efeito da forma de inoculação de fungos micorrízico arbuscular e ectomicorrízico, isolada ou conjuntamente, na colonização radicular, absorção de fósforo e produção de matéria seca em plantas de *Eucalyptus globulus*

Este experimento teve como objetivo estudar a infectividade e eficiência de fungos MA e ECM, inoculados isoladamente ou em conjunto, em relação a *E. globulus*, conforme é sumarizado na Tabela 2.

Tabela 2 - Esquema dos tratamentos de inoculação de plantas de *Eucalyptus globulus* com fungo micorrízico arbuscular e ectomicorrízico.

Tratamentos	Inoculação com fungos micorrízicos	
	<i>Glomus clarum</i>	<i>P. tinctorius</i>
Testemunha	0	0
Gc	+	0
Pt	0	+
Gc+Pt	+	+

Gc (*Glomus clarum*); Pt (*Pisolithus tinctorius*).

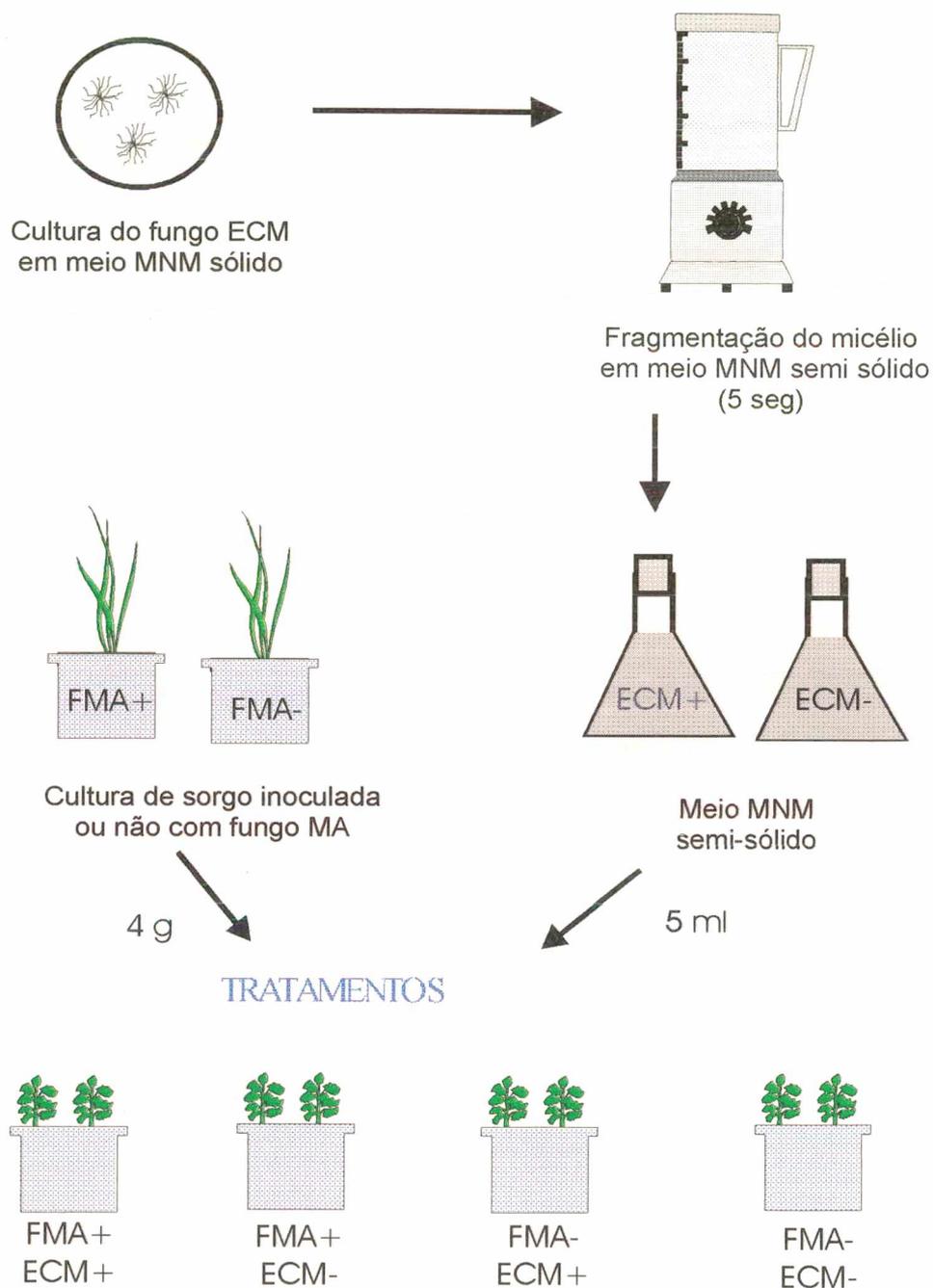
Para isso, o substrato de plantio foi distribuído em vasos de 1000 mL de capacidade. Após a adição da solução nutritiva e do ajuste do teor de fósforo (cf. item 5), o inóculo fúngico (MA ou ECM) foi adicionado em 4 covas de cerca de 2 cm de diâmetro e 2 cm de profundidade/vaso.

O inóculo ectomicorrízico (cf. item 4.1) foi adicionado na proporção de 5 mL/cova, enquanto que o inóculo micorrízico arbuscular (cf. item 4.2) foi depositado na proporção de 4 g/cova (cerca de 37 esporos). Em seguida, 2 sementes pré-germinadas foram colocadas em cada cova e cobertas com uma camada de areia. Após duas semanas, foi realizado o desbaste, deixando-se 2 plantas/vaso.

Em todos os tratamentos sem inoculação micorrízica arbuscular, o inóculo MA foi substituído por 4g de solo de cultura de sorgo não inoculado (cf. item 4.2). Em todos os tratamentos sem inoculação ectomicorrízica, o inóculo ECM foi substituído por 5 mL/cova de meio MNM (1/40) esterilizado (Figura 6).

Este experimento constou de um delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial, composto de 4 tratamentos de inoculação (Tabela 2), 4 épocas de avaliação, com 3 repetições (vasos)/tratamento e 2 plantas/vaso.

As avaliações tiveram início 2 meses após o plantio e prosseguiram mensalmente até que as plantas atingissem 5 meses de idade.



Avaliações mensais a partir dos 60 dias

Figura 6 – Técnica de inoculação dos fungos micorrízico arbuscular e ectomicorrízico em plantas de *Eucalyptus globulus*.

6.2. Efeito da seqüência de inoculação de fungos micorrízico arbuscular e ectomicorrízico na colonização radicular, absorção de fósforo e produção de matéria seca em plantas de *Eucalyptus globulus*

Diferentemente do estudo anterior (cf. item 6.1), este estudo visou estudar o efeito da seqüência de inoculação de fungos MA e ECM, em tratamentos separados ou no mesmo tratamento, em relação a *E. globulus*, conforme é sumarizado no Tabela 3.

Tabela 3 - Esquema dos tratamentos de inoculação de plantas de *Eucalyptus globulus* com fungos micorrízico arbuscular e ectomicorrízico.

Tratamentos	Plantio (0 dias)		Transplântio (30 dias)	
	<i>G. clarum</i>	<i>P. tinctorius</i>	<i>G. clarum</i>	<i>P. tinctorius</i>
Ni/Ni*	0	0	0	0
Ni/Gc	0	0	+	0
Ni/Pt	0	0	0	+
Gc/Pt	+	0	0	+
Pt/Gc	0	+	+	0

* Ni (não inoculado); Gc (*Glomus clarum*); Pt (*Pisolithus tinctorius*).

As inoculações e procedimentos foram feitos conforme descrito no item 6.1. Após 30 dias, as plantas previamente inoculadas por um dos fungos foram transplantadas para novos vasos e inoculadas com o outro fungo da mesma forma descrita para as inoculações iniciais. Neste experimento foram utilizados inicialmente vasos de 500 mL de capacidade contendo 500 g de substrato e, após 30 dias, duas plantas foram transplantadas para vasos de 1000mL de capacidade contendo 1500 g de substrato.

Como no experimento anterior, todos os tratamentos sem inoculação MA, receberam solo de cultura de sorgo não inoculado, enquanto que os tratamentos sem

inoculação ECM, receberam 5 mL/cova de meio MNM (1/40) esterilizado (cf. item 4.2) (Figura 7).

Este experimento constou de um delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial, composto de 5 tratamentos de inoculação (Tabela 3), 4 épocas de avaliação, com 3 repetições (vasos)/tratamento e 2 plantas/vaso.

As avaliações foram feitas a cada 30 dias, a partir dos 2 meses, até 5 meses após o início do experimento.

7- As condições experimentais

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação. Os valores médios das temperaturas registradas durante o experimento encontram-se no Anexo 3.

A superfície do substrato, dos experimentos do item 6, foi coberta com folha de papel alumínio para evitar o crescimento de algas. Os vasos foram pesados diariamente para a reposição do teor de umidade em torno da capacidade de campo (10%), adicionando-se, quando necessária, água destilada.

8- Análises dos Dados

Foram analisados os seguintes parâmetros: altura das plantas, peso de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular; teor de fósforo nos tecidos da parte aérea e do sistema radicular; comprimento total do sistema radicular colonizado e eficiência radicular.

Em cada avaliação, as plantas foram cortadas ao nível do colo, sendo feita a medida da altura das plantas. A parte aérea foi seca em estufa a 75°C para determinação do peso da matéria seca. As raízes foram cuidadosamente lavadas em água corrente, cortadas em pedaços de cerca de 2 cm e divididas em duas porções. Uma delas, pesando 0,25 g foi utilizada para determinação da colonização e do comprimento radicular. A outra parte, após pesagem, foi seca a 75°C para determinação do peso da matéria seca.

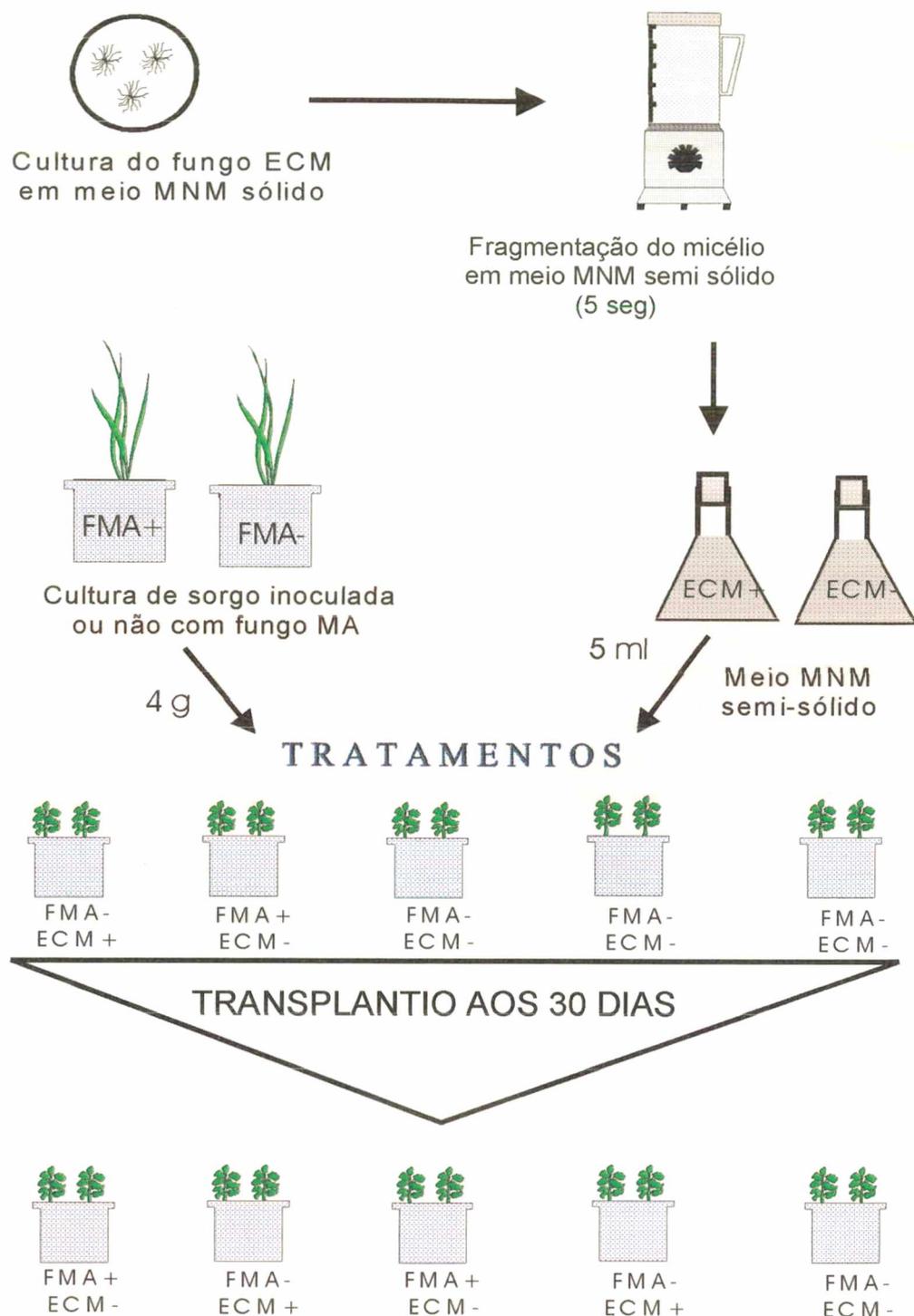


Figura: 7 – Técnica de inoculação seqüencial dos fungos micorrízico arbuscular e ectomicorrízico em plantas de *Eucalyptus globulus*.

8.1. Avaliação do fósforo das amostras de tecido vegetal

Tanto a parte aérea quanto a amostra de sistema radicular foram utilizadas para determinação do teor de fósforo pela técnica descrita por TEDESCO et al. (1995). Os tecidos (parte aérea e sistema radicular), previamente secos em estufa a 75°C, foram triturados em almofariz com auxílio de um pistilo. A parte aérea foi moída posteriormente em moinho de facas de aço inoxidável (com peneira de orifícios de 0,5 mm de diâmetro).

Amostras de 0,200 g foram, então, colocadas em tubos de vidro (c=25 cm; Ø=2,2 cm) com o auxílio de um funil de haste longa. A essas amostras, foram adicionados 1 mL de H₂O₂ (30%), 2 mL de H₂SO₄ concentrado e 0,7 g da mistura de digestão (100g de Na₂SO₄, 10 g de CuSO₄.5H₂O e 1 g de selênio, finamente moídos e misturados). Os tubos foram, em seguida, colocados em bloco digestor a 160-180°C, até completa evaporação da água, o que ocorreu em mais ou menos 45 min. Em seguida, a temperatura foi aumentada para 350°C e, após os extratos atingirem coloração amarelo-esverdeada, essa temperatura foi mantida por 1 hora. Após esse período, os tubos foram retirados, resfriados e o volume completado para 50 mL com adição de água destilada e, em seguida, agitados em agitador tipo Vortex. Os extratos foram transferidos para frascos e deixados em repouso por 12 horas.

Para determinação de fósforo no tecido das plantas, foi pipetado 1 mL de cada extrato para copos plásticos descartáveis, adicionando-se, também, 2 mL de água destilada, 3 mL da solução P-B e 3 gotas da solução P-C, cujas composições encontram-se nos Anexos 4 e 5, respectivamente e em seguida, agitados. Após 15 minutos, fizeram-se as leituras de absorbância a 660 nm. Os valores obtidos foram corrigidos pelos valores das provas em branco e, em seguida, determinaram-se os teores de fósforo (em ppm), utilizando-se a equação de regressão, obtida através da curva padrão de fósforo. Os valores foram transformados em % de fósforo e P-total (mg).

Para obtenção da curva padrão de fósforo foram utilizadas diferentes alíquotas (0,0 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 3,5 - e 5,0 mL) de uma solução padrão de fósforo (1,318 g de KH₂PO₄, seco a 105°C por 2 horas, dissolvidos em 1 L de água destilada). Essas

alíquotas foram pipetadas nos tubos de digestão e passando pelo mesmo processo citado anteriormente, sendo que nestes tubos não foi adicionado o tecido vegetal. Após esse processo, a densidade óptica dessas soluções foi determinada por espectrofotometria a 660 nm, determinando-se a absorbância para cada solução e estabelecendo-se uma equação de regressão (Anexo 6), relacionando a densidade óptica com o teor de fósforo da solução (ppm). Em seguida, os resultados foram utilizados para calcular a quantidade de fósforo nos tecidos utilizando-se para isso o peso de matéria seca.

8.2. Avaliação do comprimento radicular colonizado

Para determinação do comprimento radicular colonizado, as raízes foram submetidas ao processo de coloração descrito no item 4.2. A amostra de raízes coradas foi, então, espalhada aleatoriamente no interior de uma placa de Petri apresentando a parte inferior marcada com 15 pontos aleatórios. Em seguida, foi observada em microscópio estereoscópio (10X) registrando-se o número de pontos de intersecção entre as raízes e a linha central do campo microscópico (hairline) do microscópio estereoscópio, para determinar a presença ou ausência de colonização, assim como o tipo de micorriza nesses pontos (Figura 8).

O comprimento do sistema radicular da amostra (total e colonizado) foi então estimado pela fórmula de NEWMAN (1966):

$$R = \pi NA / 2H \quad (1),$$

onde R representa o comprimento radicular, N representa o número de pontos de intersecções entre a raiz e as linhas da placa, A é a área total da placa, e H representa o diâmetro do campo microscópico.

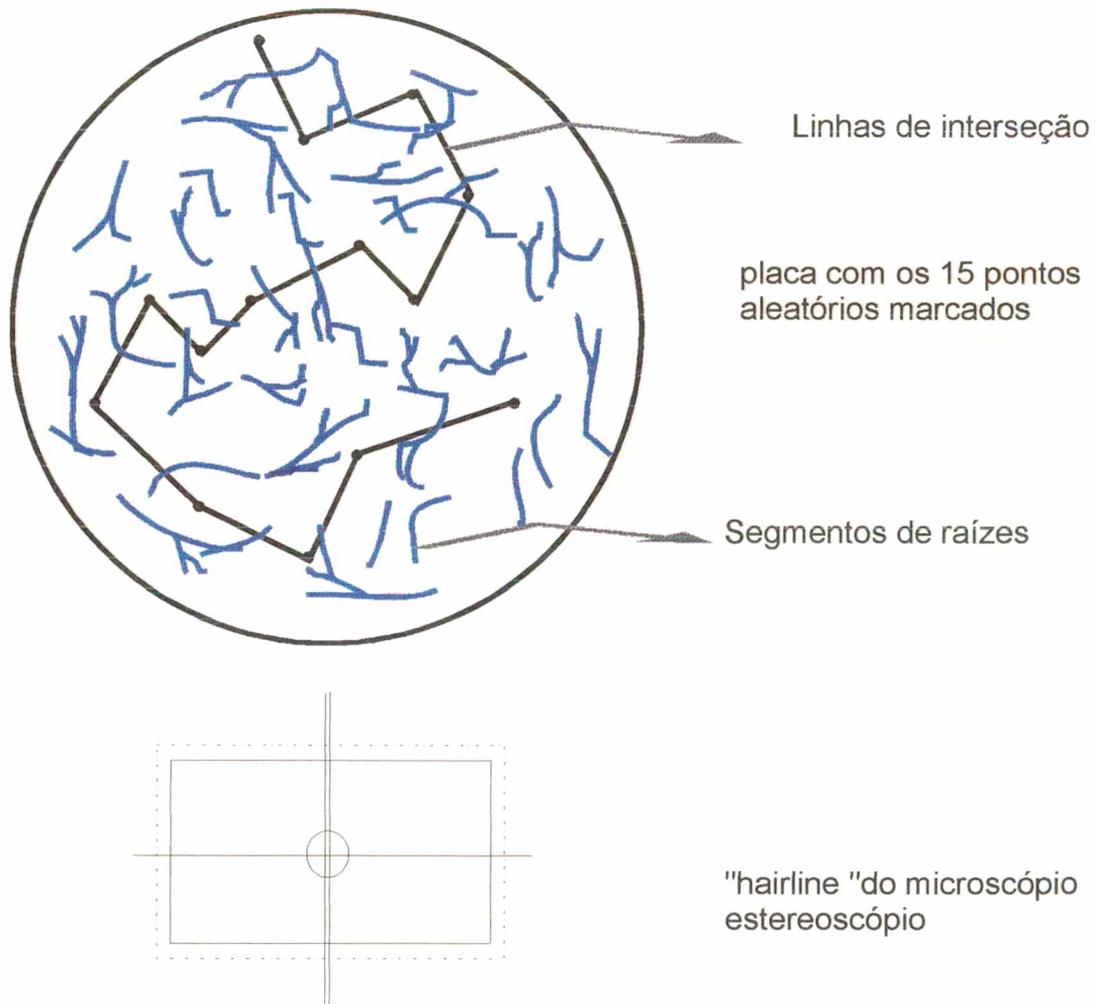


Figura 8 –Avaliação do comprimento radicular.

8.3. Avaliação da velocidade de crescimento e absorção de fósforo pelas plantas

A velocidade de crescimento foi medida pela equação:

$$VC = (A_2 - A_1) / t_2 - t_1 \quad (2),$$

onde A_1 e A_2 representam os valores do parâmetro (altura, comprimento radicular, matéria seca da parte aérea e matéria seca radicular) nos tempos t_1 e t_2 (dias), respectivamente.

A velocidade relativa de absorção de fósforo pelas plantas foi medida pela equação:

$$VA = (B_2 - B_1) / t_2 - t_1 \quad (3),$$

onde B_2 e B_1 representam a quantidade de fósforo na parte aérea ou no sistema radicular

Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Fischer (DMS) ($P=0,05$). Para essas análises, foi utilizado o programa "StatView[®]" para Macintosh[®].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Efeito da forma de inoculação de fungos micorrízico arbuscular e ectomicorrízico, isolada ou conjuntamente, na colonização radicular, absorção de fósforo e produção de matéria seca em plantas de *E. globulus*

1.1. Colonização Radicular

A colonização radicular foi observada somente nas plantas inoculadas com o fungo *Glomus clarum* (micorrízico arbuscular), correspondendo aos tratamentos Gc, onde esse fungo foi inoculado isoladamente, e Gc+Pt, inoculação conjunta com *P. tinctorius* (isolado H-1234) (Tabela 4). A colonização caracterizou-se pela presença de vesículas no interior das células corticais, esporos e hifas não septadas, conforme é apresentado nas Figuras 9 e 10. Assim como observado por outros autores (ZAMBOLIM e BARROS, 1982; ESTRADA et al., 1993; COELHO et al., 1997), não foi detectada a presença de arbúsculos. Devido a sua característica de efemeridade, estas estruturas completam seu ciclo de desenvolvimento em 2,5 - 4 dias, em seguida, colapsam rapidamente, sendo infreqüente a sua observação em muitos casos (BONFANTE e PEROTTO, 1995). As plantas do tratamento Gc apresentaram de colonização MA já no segundo mês após a inoculação, enquanto que as plantas do tratamento Gc+Pt só apresentaram-se colonizadas a partir do terceiro mês.

A porcentagem de colonização radicular apresentou pouca variação no período de observações. Nas plantas do tratamento Gc, esta variou de 4 a 14%, enquanto que no tratamento Gc+Pt a colonização variou de 0 a 11% no mesmo período.

A colonização radicular de *E. globulus* por fungos MA já foi observada por outros autores. OLIVEIRA et al. (1996) observaram uma variação de 6% a 30% no período de 4 a 12 semanas, após a inoculação, nas plantas inoculadas com *G. invermaium* isoladamente. Já no estudo de ADJOUND et al. (1996), a porcentagem de colonização nessa espécie foi de 47%, quando o fungo inoculado foi *G. intraradices*, e de 58%, quando o fungo inoculado foi *G. mosseae*.

Tabela 4 - Comprimento colonizado e porcentagem de colonização radicular de plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação.

Período (meses)	Tipo de colonização ²	Comprimento colonizado (cm/planta) e porcentagem de colonização radicular ¹			
		Não Inoculado	<i>G. clarum</i>	<i>P. tinctorius</i>	<i>P. tinctorius</i> + <i>G. clarum</i>
2	MA	0	222	0	0
	ECM	0	0	0	0
	MA+ECM	0	222	0	0
		(0%)	(4%)	(0%)	(0%)
3	MA	0	1904	0	1262
	ECM	0	0	0	0
	MA+ECM	0	1904	0	1262
		(0%)	(14%)	(0%)	(11%)
4	MA	0	1716	0	1081
	ECM	0	0	0	0
	MA+ECM	0	1716	0	1081
		(0%)	(9,5%)	(0%)	(9%)
5	MA	0	3327	0	2099
	ECM	0	0	0	0
	MA+ECM	0	3327	0	2099
		(0%)	(12%)	(0%)	(10%)

¹ Valores representam a média de 3 repetições/tratamento. ² MA = micorrízica arbuscular e ECM = ectomicorrízica

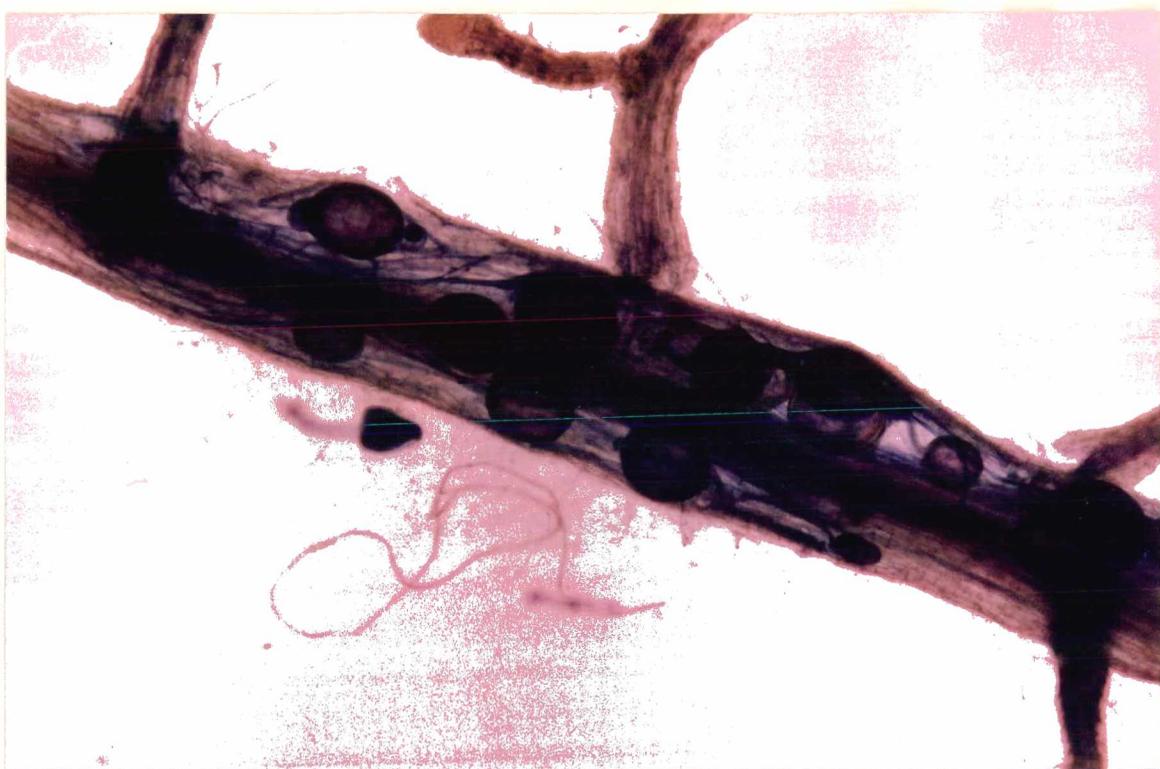


Figura 9-Raiz de *Eucalyptus globulus* colonizada por *Glomus clarum*, apresentando vesículas e hifas (55X).

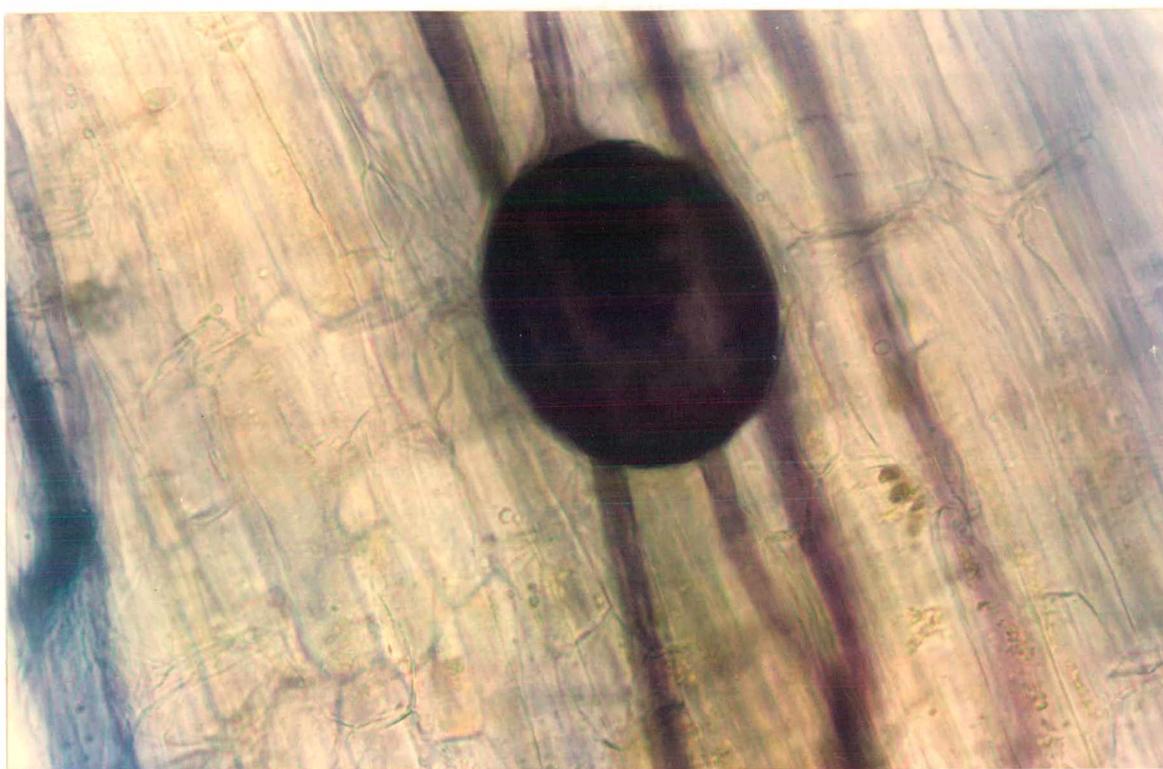


Figura 10-Detalhe de uma vesícula de *Glomus clarum*, observada em raiz de *Eucalyptus globulus* (140X).

Com outras espécies de *Eucalyptus*, a porcentagem de colonização micorrízica arbuscular tem sido, também, bastante variável. GOMES et al. (1987) observaram que aos 90 dias as plantas de *E. citriodora*, *E. urophylla* e *E. cloeziana* apresentavam uma porcentagem de 57%, 37% e 21%, respectivamente. Essa mesma variação de porcentagem de colonização de eucaliptos foi observada por SANTOS (1993), quando inoculou cinco diferentes espécies com *G. etunicatum* e observou intensidades de colonização de 27% e 68% para *E. grandis*, 76% e 83% para *E. camaldulensis*, 6% e 35% para *E. cloeziana*, 12% e 85% para *E. citriodora* e 27% e 63% para *E. urophylla*. No campo, BELLEI et al. (1992) observaram porcentagens de colonização radicular variando de 2 a 90% sendo esta variável conforme o local e a idade das plantas de *E. viminalis*. OLIVEIRA et al. (1997), por outro lado, observaram colonização de apenas 5% a 17% em *E. dunnii* plantado em seis diferentes locais de Santa Catarina.

De acordo com esses dados, as intensidades de colonização observadas neste trabalho podem ser consideradas baixas. Deve-se, entretanto, considerar que tais diferenças podem ser devidas aos diferentes métodos para avaliação da colonização radicular utilizados pelos diferentes autores. Além disso, as condições de crescimento são também variáveis nos diferentes estudos, o que pode, certamente, contribuir para as diferenças observadas. Mesmo com valores de porcentagem de colonização menores que os relatados por outros autores, foram observados incrementos significativos de crescimento e absorção de fósforo pelas plantas de *E. globulus*.

O comprimento radicular das raízes colonizadas, por outro lado, aumentou intensamente no período (Tabela 4). Nas plantas inoculadas com *G. clarum* isoladamente, o comprimento colonizado inicialmente observado foi de 222 cm no segundo mês, alcançando, porém, 3327 cm ao final das observações, o que representa um aumento de 3105 cm. A variação observada no outro tratamento (Gc+Pt) foi notadamente menor. As plantas desse tratamento somente apresentaram colonização no terceiro mês, com 1262 cm colonizados. Na última observação (quinto mês), o comprimento colonizado era de 2099 cm representando um aumento de apenas 837 cm.

Os resultados demonstram, assim, uma menor intensidade de colonização micorrízica arbuscular em presença de inóculo ECM, mesmo considerando que este último não foi bem sucedido na colonização das plantas.

Em estudos realizados em casa-de-vegetação, com plantas inoculadas com fungos MA e ECM conjuntamente, também foram observadas reduções na porcentagem de colonização radicular MA quando comparado ao tratamento de inoculação isolada. SANTOS (1993) observou que a partir dos 120 dias, a porcentagem de colonização MA diminuía na presença de fungo ECM em todas as cinco espécies de *Eucalyptus* estudadas. Para *E. globulus*, especificamente, foi observado que a colonização radicular MA caía de 30% no tratamento de inoculação isolada para 16% no tratamento de inoculação conjunta (OLIVEIRA et al., 1996).

Essas reduções também já foram observadas em outras espécies que receberam inoculação conjunta de fungos MA e ECM. LOPEZ-AGUILLON (1985) observou uma diminuição da colonização MA na presença de fungos ECM em plantas de *Populus x euramiricana*. Tal redução foi constatada mesmo quando não havia a formação de ECM. No caso de *Alnus glutinosa*, FRAGA-BEDDIAR (1987), constatou que a ocorrência de colonização ECM nas raízes promovia uma estabilização ou mesmo uma diminuição da colonização MA.

Os fungos micorrízicos MA e ECM apresentam processos de infecção diferentes. Os MA colonizam preferencialmente as regiões radiculares a partir da zona meristemática em direção à zona de alongação, não havendo evidências de colonização MA nas regiões meristemáticas das raízes. Dessa forma, essa região fica disponível para infecção ECM. Uma vez ocorrida a infecção ECM, as hifas deste fungo crescem rapidamente se espalhando pelas ramificações radiculares criando uma barreira aos sítios preferenciais de infecção MA, impedindo a colonização tardia desses fungos (CHILVERS et al., 1987). No caso presente, essa barreira física dos sítios de infecção não foi observada uma vez que não foi constatada a colonização ECM.

Muitos autores têm observado, também, uma redução na porcentagem da colonização MA com o aumento da idade da planta. Tal fenômeno tem sido mais freqüentemente observado em estudos feitos a campo, e isso é normalmente acompanhado de aumentos na colonização ECM (BELLEI et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1997). Tem sido sugerido que mudanças fisiológicas no hospedeiro (idade, por exemplo), além da produção de compostos químicos (exsudatos) que inibem a colonização MA, possam ser responsáveis por essa redução (LODGE e WENTWORTH, 1990). Quanto aos fungos micorrízicos, tal fenômeno pode ser

conseqüência das diferentes capacidades de infecção desses dois tipos de fungos. Os fungos MA são considerados mais eficientes que os fungos ECM nas infecções primárias, estabelecidas a partir do propágulo fúngico presente no solo, usualmente esporos. Essa característica dos fungos MA se deve principalmente, à fisiologia desses fungos, que apresentam esporos maiores e com mais reservas, resultando numa germinação e infecção mais rápidas. Os fungos ECM, por sua vez, são considerados mais eficientes na colonização secundária, que ocorre a partir de sítios da raiz já infectados. A partir desses pontos, a infecção propaga-se rapidamente com as hifas desses fungos cobrindo uma grande extensão das raízes e impedindo, muitas vezes o estabelecimento da infecção por outros fungos, como os MA, por exemplo (CHILVERS et al., 1987)

1.2. Absorção de Fósforo

A absorção de fósforo (P) pelas plantas foi influenciada tanto pelo tempo após a inoculação quanto pela inoculação sem, contudo, apresentar evidências de interações entre esses dois fatores (Tabelas 5, 6, e 7).

Quando se considera a quantidade de P na parte aérea (mg.planta^{-1}) (Tabela 5), observa-se que a única diferença significativa entre tratamentos ocorreu ao final do período experimental (no quinto mês após a inoculação), com as plantas inoculadas com o fungo *G. clarum* apresentando maior quantidade de P (7,4 mg) que as plantas não inoculadas (testemunhas) (5,7 mg). Observando-se, porém, a evolução deste parâmetro dentro de cada tratamento de inoculação, evidencia-se que apenas entre o terceiro e o quarto mês houve aumentos significativos da quantidade de P nos tecidos da parte aérea dentro de um mesmo tratamento. Na média geral das observações, observa-se também esse efeito, sendo as diferenças significativas apenas entre o terceiro e o quarto mês.

A aquisição de fósforo pela parte aérea apresentou duas fases distintas de velocidade. A primeira observada do tempo 0 aos 60 dias, onde o tratamento Gc foi o que apresentou o maior valor $0,085 \text{ mg.planta}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, seguido dos tratamentos Pt, com $0,079 \text{ mg.planta}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, Gc+Pt com $0,074 \text{ mg.planta}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ e testemunha com $0,068$

Tabela 5 - Quantidade de fósforo na parte aérea em plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação.

Meses após inoculação	Fósforo na parte aérea (mg/planta) ¹				Média
	Testemunha	<i>G. clarum</i>	<i>P. tinctorius</i>	<i>G. clarum</i> + <i>P. tinctorius</i>	
			<i>DMS</i> = 1,48 (<i>P</i> = 0,05)		<i>DMS</i> = 0,71 (<i>P</i> = 0,05)
2	4,1	5,1	4,7	4,4	4,58
3	4,1	4,3	4,0	4,2	4,15
4	6,7	6,7	6,2	6,3	6,51
5	5,7	7,4	6,9	6,6	6,67
Média <i>DMS</i> = 1,18 (<i>P</i> = 0,05)	5,2	5,9	5,5	5,4	

¹ Os valores representam a média de 3 repetições/tratamento (2 plantas/repetição).

mg.planta⁻¹. dia⁻¹. A segunda fase foi observada dos 90 aos 120 dias onde o tratamento testemunha apresentou a maior velocidade (0,087 mg.planta⁻¹.dia⁻¹), seguido dos tratamentos Gc, Pt e Gc+Pt. Foram observados decréscimos nesse parâmetro dos 60 para os 90 dias nos tratamentos Gc, Pt e Gc+Pt.

No sistema radicular (Tabela 6), a quantidade de P variou entre as colheitas e entre os tratamentos, embora com poucas diferenças entre estes últimos. No segundo mês após a inoculação, as plantas do tratamento Gc apresentaram maior quantidade deste elemento em seu sistema radicular que as plantas do tratamento Gc+Pt. No quarto mês, entretanto, as plantas não inoculadas foram aquelas com maior quantidade de P nas raízes (5,3 mg), quando comparadas às plantas do tratamento Gc+Pt (3,6 mg). Esse parâmetro destacou dois tratamentos quanto à velocidade de aquisição, Pt e o Gc+Pt, com velocidades médias de 0,029 e 0,025 mg.planta⁻¹.dia⁻¹.

A quantidade de P nas raízes mostrou pouca variação também em função do tempo. Na média geral, não foram evidenciadas diferenças significativas entre os valores observados no terceiro, quarto e quinto mês após a inoculação e, em nenhuma observação, as plantas do tratamento Gc apresentaram diferenças entre si. Nos demais tratamentos de inoculação, não foram evidenciadas diferenças entre os valores das diferentes observações, exceto no tratamento testemunha onde ocorreu uma redução na quantidade de P no sistema radicular entre o quarto e o quinto mês.

Mais uma vez, o tratamento Gc vem a ser o único a apresentar diferença significativa no cômputo geral, com uma média de 4,5 mg de P.planta⁻¹, significativamente superior à do tratamento Gc+Pt (3,5 mg.planta⁻¹). Na velocidade de absorção, destacam-se os tratamentos Gc e Pt, com as plantas apresentando, ao final do experimento, velocidades de 30 mg.planta⁻¹.dia⁻¹ e 32 mg.planta⁻¹.dia⁻¹, respectivamente.

A quantidade de fósforo na parte aérea foi positivamente correlacionada com o comprimento radicular ($r=0,51$; $P=0,001$) e com o comprimento radicular colonizado ($r=0,34$; $P=0,05$), indicando uma provável translocação desse elemento para essa parte da planta. Já a quantidade de fósforo no sistema radicular foi correlacionada

Tabela 6 - Quantidade de fósforo no sistema radicular em plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação.

Meses após inoculação	Fósforo no sistema radicular (mg/planta) ¹				Média
	Testemunha	<i>G. clarum</i>	<i>P. tinctorius</i>	<i>G. clarum</i> + <i>P. tinctorius</i>	
		<i>DMS</i> = 1,62 (<i>P</i> = 0,05)			<i>DMS</i> = 0,82 (<i>P</i> = 0,05)
2	2,4	3,9	2,9	2,1	2,8
3	4,1	4,9	4,7	4,2	4,5
4	5,3	4,6	4,6	3,6	4,5
5	3,8	4,5	4,9	4,0	4,3
Média <i>DMS</i> = 0,97 (<i>P</i> = 0,05)	3,9	4,5	4,3	3,5	

¹ Os valores representam a média de 3 repetições/tratamento (2 plantas/repetição).

positivamente apenas com o comprimento radicular ($r=0,47$; $P=0,001$), ou seja, os aumentos de comprimento das raízes aumentariam a absorção de fósforo; sem correlação significativa com o comprimento radicular colonizado.

Com relação à quantidade de fósforo total nos tecidos das plantas (radicular + parte aérea) (Tabela 7), não foram observadas diferenças entre os tratamentos. O maior aumento da quantidade de P total nos tratamentos ocorreu do terceiro para o quarto mês após a inoculação, mas somente as plantas do tratamento testemunha apresentaram um aumento significativo da quantidade de P total de 8,2 mg para 12 mg, o que correspondeu a um acréscimo de 31%. Os demais tratamentos Pt, Gc e Gc+Pt apresentaram aumentos da ordem de 24%, 23% e 19%, respectivamente. Entretanto, o tratamento testemunha no quinto mês apresentou um decréscimo na quantidade de P, baixando para 9,5 mg P.planta⁻¹, contra 12 mg no mês anterior. Os valores apontam a tendência do tratamento Gc ter sido aquele com maior efeito geral na absorção de fósforo, com uma média geral de 10,4 mg.planta⁻¹.

A concentração (%) de P nos tecidos (Tabela 8) sofreu efeito individual dos dois fatores estudados mas a interação entre esses fatores também não foi significativa. A concentração nas plantas diminuiu com a idade, reduzindo-se de 0,33%, na primeira observação aos 2 meses, para 0,07% na última observação aos 5 meses, refletindo o aumento da biomassa e a conseqüente diluição do fósforo nos tecidos. Somente no segundo mês após a inoculação foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, onde as plantas do tratamento Gc+Pt foram superiores às plantas do tratamento testemunha, não diferindo, porém, daquelas dos outros dois tratamentos de inoculação (Gc e Pt). Nas outras avaliações, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

De maneira geral, foi observada uma diminuição na concentração de P do segundo para o quinto mês após a inoculação em todos os tratamentos. Esse efeito ocorreu de forma significativa do segundo para o terceiro mês após a inoculação, com as plantas de todos os tratamentos apresentando decréscimos da ordem de 60%. Não foram observadas diferenças significativas na diminuição da concentração de fósforo do terceiro para o quinto mês.

Tabela 7 - Quantidade total de fósforo em plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação.

Meses após inoculação	Fósforo total (mg/planta) ¹				Média
	Testemunha	<i>G. clarum</i>	<i>P. tinctorius</i>	<i>G. clarum</i> + <i>P. tinctorius</i>	
		<i>DMS</i> = 2,68 (<i>P</i> = 0,05)			<i>DMS</i> = 1,35 (<i>P</i> = 0,05)
2	6,5	8,9	7,6	6,5	7,4
3	8,2	9,2	8,7	8,3	8,6
4	12,0	11,3	10,8	9,9	11,0
5	9,5	11,9	11,9	10,6	11,1
Média <i>DMS</i> = 1,84 (<i>P</i> = 0,05)	9,1	10,4	9,8	8,8	

¹ Os valores representam a média de 3 repetições/tratamento (2 plantas/repetição).

Tabela 8 - Concentração de fósforo em plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação.

Meses após inoculação	Concentração de fósforo (%) ¹				Média
	Testemunha	<i>G. clarum</i>	<i>P. tinctorius</i>	<i>G. clarum</i> + <i>P. tinctorius</i>	
		<i>DMS</i> = 0,047 (<i>P</i> = 0,05)			<i>DMS</i> = 0,028 (<i>P</i> = 0,05)
2	0,28	0,34	0,31	0,39	0,33
3	0,11	0,13	0,12	0,13	0,12
4	0,11	0,10	0,10	0,11	0,10
5	0,06	0,07	0,07	0,08	0,07
Média	0,14	0,16	0,16	0,17	
<i>DMS</i> = 0,092 (<i>P</i> = 0,05)					

¹ Os valores representam a média de 3 repetições/tratamento (2 plantas/repetição).

As plantas com MA e/ou ECM têm sido caracterizadas pela sua alta capacidade de absorção de fósforo quando comparadas às plantas sem micorrizas (BOUGHER et al., 1990; KOTHARY et al., 1990; MARSCHNER e DELL, 1994; THOMSON et al., 1994; SHARMA et al., 1996). Isso pôde ser comprovado durante o experimento, pelas diferenças nas concentrações de fósforo observadas na última avaliação. Essas diferenças devem estar provavelmente relacionadas aos aumentos nos sistemas de absorção das plantas (matéria seca radicular e comprimento radicular) que contribuíram com os aumentos de absorção de fósforo. As maiores concentrações, em todos os tratamentos e durante todo o período do experimento, foram observadas na parte aérea das plantas indicando uma translocação desse elemento da raiz para a parte aérea, disponibilizando o fósforo para o crescimento das plantas.

Resultados conflitantes têm sido, porém, relatados por certos autores. AMORIM (1988) e MACHADO et al. (1988) observaram que a inoculação MA não promoveu aumentos de teores de macro e micronutrientes nas partes aéreas das plantas estudadas, em comparação àquelas não inoculadas. ADJOURD et al. (1996) também observaram que a colonização radicular de *E. globulus* com fungos MA não promoveu aumentos significativos na concentração de fósforo foliar.

1.3. Crescimento

No que diz respeito à altura de plantas (Tabela 9), foram observadas diferenças significativas a nível dos dois fatores estudados: 'tempo após a inoculação' e 'tratamento de inoculação'. Não houve, entretanto, efeito da interação tempo x inoculação neste parâmetro. Como esperado, a altura das plantas aumentou significativamente de uma observação à outra, com os maiores aumentos ocorrendo do terceiro para o quarto mês, onde os incrementos foram da ordem de 300% em relação ao período anterior. Foram observadas diferenças entre os tratamentos no quarto mês, quando as plantas do tratamento *G. clarum* apresentaram maior altura que as plantas dos demais tratamentos. As diferenças foram de 4%, 8% e 17%, em relação aos tratamentos Pt, testemunha e Gc+Pt, respectivamente. No quinto mês após a inoculação, apenas as

Tabela 9 - Altura de plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação.

Meses após inoculação	Altura (cm/planta) ¹				Média
	Testemunha	<i>G. clarum</i>	<i>P. tinctorius</i>	<i>G. clarum</i> + <i>P. tinctorius</i>	
		<i>DMS</i> = 3,337 (<i>P</i> = 0,05)			<i>DMS</i> = 1,913 (<i>P</i> = 0,05)
2	11,5	12,5	12,8	11,7	12,1
3	18,9	19,4	19,8	18,8	19,3
4	43,5	47,2	45,4	40,2	44,1
5	49,8	53,6	52,5	52,4	52,1
Média <i>DMS</i> =14,390 (<i>P</i> =0,05)	30,9	33,2	32,6	30,8	

¹ Os valores representam a média de 3 repetições/tratamento(2 plantas/repetição).

plantas do tratamento Gc foram significativamente superiores às do tratamento testemunha.

A maior velocidade de crescimento foi observada no tratamento Gc, onde as plantas cresceram a uma taxa média de $0,394 \text{ cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Seguem-se os tratamentos Gc+Pt ($0,388 \text{ cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), Pt ($0,384 \text{ cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e testemunha ($0,367 \text{ cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$).

O maior aumento de altura das plantas observado do terceiro para o quarto mês pode ter resultado dos efeitos promovidos pela colonização radicular, detectada no período anterior (segundo para o terceiro mês). Contribui para esta dedução o fato de que as plantas do tratamento Gc+Pt, cuja colonização pelo fungo MA foi observada tardiamente (terceiro para o quarto mês), apresentaram maior incremento de altura que os demais tratamentos do quarto para o quinto mês. De acordo com esses resultados, pode-se supor que como a colonização radicular neste tratamento só foi observada no terceiro mês, o efeito promovido pela colonização radicular só foi observado mais tarde, no período subsequente.

A altura das plantas foi correlacionada positivamente com a matéria seca das raízes ($r=0,84$; $P=0,0001$), comprimento radicular total ($r=0,76$; $P=0,0001$) e comprimento radicular infectado ($r=0,36$; $P=0,01$) indicando a contribuição desses parâmetros nos aumentos da altura das plantas. Esse parâmetro foi também correlacionado positivamente com a quantidade de fósforo na parte aérea ($r=0,77$; $P=0,0001$) e com a quantidade de fósforo total ($r=0,71$; $P=0,0001$).

Aumentos de altura em *E. grandis* e *E. tereticornis* promovidos pela inoculação de *G. clarum* foram observados anteriormente por ZAMBOLIM et al. (1982). No caso de *Populus x euramericana*, o efeito da inoculação sobre o crescimento dessa espécie foi constatado somente nos primeiros meses, sendo o crescimento aumentado quando as plantas foram inoculadas com fungo ECM e fungos MA, sugerindo uma interação sinérgica entre os simbiontes (LOPEZ-AGUILLON, 1985).

Benefícios promovidos tardiamente pelos fungos micorrízicos podem proporcionar certas vantagens às plantas. Muitas vezes os fungos micorrízicos podem não produzir aumentos de crescimento na fase de viveiro, por exemplo, mas podem proporcionar uma melhor chance de sobrevivência e crescimento a essas plantas quando transplantadas para o local definitivo, justificando, assim, a inoculação

(CASTELLANO e MOLINA, 1989; GARBAYE, 1990). De acordo com este último, aumentos de altura de plantas podem representar aumentos bem maiores em termos de volume de madeira produzida. Se esses aumentos forem obtidos ainda no estado juvenil dessas plantas, isso acarretará em uma grande importância econômica.

O efeito dos dois fatores estudados sobre o comprimento total do sistema radicular foi observado tanto individualmente, quanto em sua interação (Tabela 10). As diferenças entre os tratamentos foram observadas no terceiro mês após a inoculação, com as plantas testemunha apresentando um maior valor de comprimento radicular total (18932 cm) que as plantas dos tratamentos Pt e Gc+Pt. Não observaram-se diferenças entre o tratamento testemunha e o tratamento Gc, assim como entre este último e os tratamentos Pt e Gc+Pt.

No quarto mês, nenhuma diferença significativa foi observada entre as plantas dos quatro diferentes tratamentos de inoculação. Isso também se faz notar na média geral de cada observação, quando não foram detectadas diferenças entre o quarto e o terceiro mês (14480 e 16179 cm, respectivamente). As diferenças voltaram a se tornar evidentes no quinto mês após a inoculação, quando as plantas do tratamento Gc apresentavam o maior valor médio de comprimento de raiz (29262 cm) que os demais tratamentos, com diferenças claramente significativas. As plantas deste tratamento apresentavam valor de comprimento radicular total correspondendo a cerca de 150% do valor dos demais tratamentos.

O período entre o segundo e o terceiro mês após a inoculação corresponde ao período de maior aumento de comprimento radicular, tanto para o tratamento Gc quanto para o tratamento Gc+Pt, com velocidade média de extensão radicular de 243,8 $\text{cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e 168,4 $\text{cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, respectivamente. Esse incremento foi acompanhado, no mês seguinte, por aumentos de matéria seca da parte aérea e, conseqüentemente, aumentos da matéria seca total.

Esses incrementos, seguindo-se ao período de intenso aumento do comprimento radicular, poderiam indicar uma alocação dos recursos do sistema radicular para a parte aérea. Coincidentemente, foi no período do terceiro para o quarto mês que se observaram, também, os maiores incrementos na quantidade de fósforo na parte aérea e

Tabela 10 - Comprimento do sistema radicular de plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação.

Meses após inoculação	Comprimento do sistema radicular (cm/planta) ¹				Média
	Testemunha	<i>G. clarum</i>	<i>P. tinctorius</i>	<i>G. clarum</i> + <i>P. tinctorius</i>	
		<i>DMS</i> = 5032 (<i>P</i> = 0,05)			<i>DMS</i> = 3128 (<i>P</i> = 0,05)
2	3648	5266	5539	3502	4488
3	18932	14300	12666	12022	14480
4	17643	17753	16487	12834	16179
5	20367	29262	19241	20204	22268
Média <i>DMS</i> = 6149 (<i>P</i> = 0,05)	15147	16645	13483	12141	

¹Os valores representam a média de 3 repetições/tratamento (2 plantas/repetição).

total (Tabela 5 e 7). Somente as plantas apresentando colonização micorrízica (tratamentos Gc e Gc+Pt) apresentaram um incremento significativo entre o quarto e o quinto mês, com um aumento da ordem de 11500 cm no tratamento Gc e 7400 cm no tratamento de inoculação conjunta (Gc+Pt).

O comprimento radicular foi positivamente correlacionado com o comprimento radicular colonizado ($r=0,47$; $P=0,001$), com a matéria seca radicular ($r=0,88$; $P=0,0001$) e com a quantidade de fósforo nos tecidos.

Os aumentos da colonização radicular observados nos tratamentos Gc e Gc+Pt, no período entre o quarto e o quinto mês, foram acompanhados do aumento da matéria seca radicular (Tabela 12), matéria seca total das plantas (Tabela 13) e do maior aumento observado do comprimento radicular (Tabela 10). A matéria seca da parte aérea permaneceu praticamente estável nesse período. A relação R/S, em consequência do aumento da matéria seca radicular, também aumentou.

Além dos benefícios às plantas advindos da colonização micorrízica, um bom desenvolvimento radicular é importante para as plantas. As plantas resolvem seus problemas de absorção de água e minerais produzindo um extenso sistema radicular, investindo normalmente mais de 50% do seu peso nas raízes e em condições de estresse quase 90% do peso total da planta se concentra nas raízes (SALISBURY e ROSS, 1992). Além disso, um grande comprimento radicular é importante para uma maior exploração do solo pelas raízes em qualquer situação. Como já mencionado anteriormente, *Eucalyptus* é uma planta produzida primariamente em viveiros para então ser transplantada, situação na qual um bom desenvolvimento de raiz é muito importante por aumentar as chances de sobrevivência ao transplântio.

Nos parâmetros relativos à produção de matéria seca (Tabelas 11, 12 e 13), o efeito dos fatores variou em função do parâmetro observado (matéria seca da parte aérea, raiz ou total). O peso da matéria seca da parte aérea (Tabela 11) foi o parâmetro menos influenciado pelos tratamentos de inoculação. No quarto mês, as plantas do tratamento testemunha apresentaram peso superior às plantas do tratamento Pt, mas sem diferenças significativas em relação às plantas dos demais tratamentos. Já no quinto mês, foram as plantas inoculadas com o fungo Pt que apresentaram o maior valor de matéria seca da parte aérea apresentando uma velocidade geral de produção de matéria seca de parte aérea de $74,8 \text{ mg.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. De forma semelhante ao observado em

Tabela 11 - Peso da matéria seca da parte aérea de plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação.

Meses após inoculação	Peso da matéria seca da parte aérea (g/planta) ¹				Média
	Testemunha	<i>G. clarum</i>	<i>P. tinctorius</i>	<i>G. clarum</i> + <i>P. tinctorius</i>	
		<i>DMS</i> = 0,59 (<i>P</i> = 0,05)			
					<i>DMS</i> = 0,34 (<i>P</i> = 0,05)
2	1,3	1,4	1,3	1,1	1,3
3	4,6	4,6	4,8	4,3	4,6
4	7,1	6,6	6,2	6,5	6,6
5	9,0	8,9	9,6	8,7	9,1
Média	5,5	5,4	5,5	5,2	
<i>DMS</i> = 2,47 (<i>P</i> = 0,05)					

¹ Os valores representam a média de 3 repetições/tratamento (2 plantas/repetição).

relação à altura das plantas, o fator tempo exerceu efeito significativo sobre este parâmetro sem, contudo, apresentar interação significativa com o fator inoculação.

A matéria seca da parte aérea foi correlacionada positivamente com o comprimento radicular ($r=0,84$; $P=0,0001$) e com a quantidade de fósforo na parte aérea ($r=0,66$; $P=0,0001$), indicando um relacionamento entre essa parte da planta e a exploração do solo pelas raízes e hifas e a absorção de fósforo.

A produção de matéria seca do sistema radicular (Tabela 12), por outro lado, foi afetada significativamente pelos dois fatores estudados (tempo x inoculação). Não foram observadas diferenças significativas entre o terceiro e o quarto mês nas plantas dos tratamentos T, Pt e Gc + Pt. Apenas o tratamento Gc promoveu aumento significativo nesse período. Coincidentemente, esse período (terceiro para quarto mês) representa aquele em que foram observados os maiores incrementos em termos de altura das plantas dentro de cada tratamento. Como já mencionado, a ausência de diferenças na biomassa radicular dentro de três tratamentos, durante esse período, indicaria uma alocação dos recursos para a parte aérea. No tratamento Pt também não observou-se diferença no peso da matéria seca do sistema radicular entre as plantas colhidas no quarto mês e aquelas colhidas no quinto mês.

No período total do experimento, a maior velocidade média de incremento de matéria seca radicular foi observada no tratamento Gc ($60,6 \text{ mg.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), com o período de maior velocidade ocorrendo do quarto para o quinto mês.

Esse parâmetro foi correlacionado positivamente com o comprimento radicular ($r=0,88$; $P=0,0001$), comprimento radicular infectado ($r=0,51$; $P=0,0001$) e com a porcentagem de fósforo ($r=0,75$; $P=0,0001$), sugerindo que aumentos desses parâmetros influenciaram diretamente aumentos da matéria seca radicular e absorção de nutrientes.

Quanto aos valores de matéria seca total (Tabela 13), também evidenciaram-se efeitos significativos dos dois fatores estudados sobre este parâmetro. Da mesma forma como nos parâmetros discutidos anteriormente, o efeito do fator tempo após a inoculação é claramente significativo dentro de todos os tratamentos de inoculação. Quanto ao fator inoculação, evidencia-se mais uma vez que as diferenças são significativas somente a partir do quarto mês. Neste momento, as plantas que foram inoculadas com o fungo MA, *G.clarum*, apresentaram uma maior quantidade de

Tabela 12 - Peso da matéria seca do sistema radicular de plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação.

Meses após inoculação	Peso da matéria seca radicular (g/planta) ¹				Média
	Testemunha	<i>G. clarum</i>	<i>P. tinctorius</i>	<i>G. clarum</i> + <i>P. tinctorius</i>	
		<i>DMS</i> = 1,18 (<i>P</i> = 0,05)			<i>DMS</i> = 0,73 (<i>P</i> = 0,05)
2	1,1	1,2	1,0	0,6	1,0
3	2,8	2,4	2,1	1,8	2,3
4	3,6	4,2	3,3	2,7	3,5
5	5,7	7,2	4,4	5,3	5,7
Média	3,3	3,8	2,7	2,6	
<i>DMS</i> = 1,59 (<i>P</i> = 0,05)					

¹ Os valores representam a média de 3 repetições/tratamento (2 plantas/repetição).

Tabela 13 - Peso da matéria seca total das plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação.

Meses após inoculação	Peso da matéria seca total das plantas (g/planta) ¹				Média
	Testemunha	<i>G. clarum</i>	<i>P. tinctorius</i>	<i>G. clarum</i> + <i>P. tinctorius</i>	
		<i>DMS</i> = 1,46 (<i>P</i> = 0,05)			<i>DMS</i> = 0,81 (<i>P</i> = 0,05)
2	2,4	2,6	2,3	1,7	2,3
3	7,4	7,0	6,9	6,1	6,9
4	10,7	10,8	9,5	9,2	10,1
5	14,7	16,1	14,0	14,0	14,8
Média <i>DMS</i> = 3,97 (<i>P</i> = 0,05)	8,8	9,1	8,2	7,8	

¹ Os valores representam a média de 3 repetições/tratamento (2 plantas/repetição).

matéria seca total que as plantas do tratamento de inoculação conjunta (Gc+Pt), não diferindo significativamente, entretanto, das plantas dos dois outros tratamentos. No quinto mês, Gc foi o tratamento que promoveu o maior valor de matéria seca total, diferindo significativamente de todos os demais tratamentos.

A estimulação do crescimento das plantas neste experimento foi correlacionada positivamente com o comprimento radicular colonizado [altura, $r=0,36$ ($P=0,05$); matéria seca da parte aérea, $r=0,36$ ($P=0,05$); matéria seca das raízes, $r=0,51$ ($P=0,001$); comprimento radicular total, $r=0,47$ ($P=0,001$)]. Contrariamente ao observado por ADJOUND et al. (1996), que constataram uma ausência de correlação entre esses parâmetros e a extensão da colonização de *E. globulus* que não apresentou estimulação de crescimento apesar da alta taxa de colonização radicular (58%). Inversamente, *E. dives* teve um aumento de peso de matéria seca de 49%, com somente 7% de comprimento radicular colonizado por *G. caledonium*.

ZAMBOLIM et al. (1982) constataram que *G. clarum* foi o fungo MA que promoveu os melhores resultados em produção de matéria seca em plantas de *E. grandis* e *E. tereticornis*. Esses efeitos, porém, não foram constatados por outros autores. MACHADO et al. (1988) observaram que a inoculação MA em *E. viminalis* não teve influência sobre a altura, diâmetro e matéria seca das plantas (parte aérea e sistema radicular). Similarmente, AMORIM (1988) observou que a inoculação MA não promoveu diferenças significativas sobre a matéria seca das plantas (parte aérea e raízes) de *E. grandis*, em comparação àquelas não inoculadas.

No que diz respeito à relação raiz/parte aérea (R/S = peso da matéria seca radicular/peso da matéria seca da parte aérea) (Tabela 14), os dois fatores promoveram diferenças significativas. Já no segundo mês após a inoculação, evidenciou-se uma menor relação R/S no tratamento de inoculação conjunta (Gc+Pt), que apresentou uma relação R/S de 0,5, quando os demais tratamentos apresentavam uma relação R/S de 0,8. As diferenças voltaram a ser significativas no quinto mês, quando as plantas inoculadas com *G. clarum* apresentaram uma relação R/S superior às plantas do tratamento Pt. Na média das observações, a maior relação foi obtida no segundo mês após inoculação, com o valor de 0,75, significativamente superior aos obtidos nos terceiro e quarto meses, 0,50 e 0,52, respectivamente. Na média geral dos tratamentos, as

Tabela 14 - Relação R/S (matéria seca de raiz/ matéria seca da parte aérea) de plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação.

Meses após inoculação	Relação R/S ¹				Média
	Testemunha	<i>G. clarum</i>	<i>P. tinctorius</i>	<i>G. clarum</i> + <i>P. tinctorius</i>	
		<i>DMS</i> = 0,26 (<i>P</i> = 0,05)			<i>DMS</i> = 0,14 (<i>P</i> = 0,05)
2	0,82	0,84	0,78	0,55	0,75
3	0,60	0,54	0,45	0,43	0,50
4	0,50	0,63	0,53	0,41	0,52
5	0,63	0,81	0,46	0,61	0,63
Média <i>DMS</i> = 0,150 (<i>P</i> = 0,05)	0,64	0,70	0,56	0,50	

¹ Os valores representam a média de 3 repetições/tratamento (2 plantas/repetição).

plantas inoculadas com Gc apresentaram uma relação R/S superior as do tratamento de inoculação conjunta Gc+Pt. O tratamento de inoculação de maior sucesso no que diz respeito a este parâmetro parece ser assim Gc, que apresentou o maior valor de relação R/S. Aumentos da relação R/S com a inoculação micorrízica em plantas de interesse florestal têm sido observados, também, por outros autores, mas os dados disponíveis na literatura são referentes, em sua maioria, aos fungos ECM (WILSON et al., 1987; MARX et al., 1988). Em todos os casos, observaram-se efeitos positivos da inoculação sobre este parâmetro.

Uma alta relação R/S é de grande importância para plantas, principalmente quando estas devem ser transplantadas. Nesse momento, as plantas estão sujeitas à chamada 'crise do transplante', sofrendo uma mudança brutal de ambiente físico-químico (GARBAYE, 1990). Nesses casos e, principalmente, em plantas de crescimento rápido como *Eucalyptus*, um crescimento máximo da parte aérea deve ser preterido em relação a um maior crescimento do sistema radicular, proporcionando, assim, um melhor suporte e uma mais eficiente absorção de água e nutrientes (CASTELLANO e MOLINA, 1986; BRUNDRETT et al., 1996).

Os trabalhos de inoculação de *Eucalyptus* spp. com fungos MA são escassos e conflitantes. Por um lado, os presentes resultados, assim como os de ZAMBOLIM et al. (1982) indicam aumentos da absorção de fósforo e de biomassa devidos à inoculação MA, contrastando com as observações de AMORIM (1988), MACHADO et al. (1988), ADJOURD et al. (1996) e WU et al. (1996), que observaram efeitos negativos ou não significativos advindos dessa inoculação. AMORIM (1988) observou um efeito depressivo da inoculação MA no crescimento das plantas inoculadas, ao passo que a inoculação com fungos ECM promoveu aumentos de teores de elementos acumulados na parte aérea e o crescimento. Recentemente, ADJOURD et al. (1996) e WU et al. (1996) observaram que *E. globulus* não apresentou resposta significativa à inoculação MA, mesmo com uma alta porcentagem de colonização. Em seu estudo, ADJOURD et al. (1996) verificaram que aumentos na concentração de fósforo foliar, seguindo-se à infecção micorrízica, não foram necessariamente associados ao crescimento das plantas. Segundo esses autores, as espécies de *Eucalyptus* respondem diferentemente à infecção

micorrízica dependendo do fungo inoculado, sendo o funcionamento dessa associação simbiótica controlado por ambos, planta e fungo, como aliás é o caso em toda associação simbiótica, seja ela mutualística ou parasitária. Essa característica foi observada também por HEIDJEN e KUYPER (1996), em *Salix repens*, uma espécie que apresenta, também, os dois tipos de micorrizas, onde as diferenças nos efeitos promovidos dependeram da espécie fúngica utilizada. Quando *Glomus mosseae* foi inoculado, o estímulo da absorção de fósforo e do crescimento foi maior que o promovido pelos fungos ECM. Porém, quando o fungo inoculado foi *Acaulospora laevis*, ocorreu uma diminuição na absorção de fósforo e no crescimento.

A inoculação conjunta (MA+ECM) neste estudo promoveu, quase invariavelmente, resultados inferiores aos obtidos com a inoculação isolada de *G. clarum*. WU et al. (1996), observaram que quando os fungos MA foram inoculados conjuntamente com o fungo ECM *Pisolithus* sp., o fungo MA exerceu um efeito depressivo no crescimento das plantas de *E. globulus*, porém o mesmo não foi observado quando o fungo ECM foi *D. maculata*. SANTOS (1993), observou que quando *G. etunicatum* foi inoculado conjuntamente com *P. tinctorius*, a produção de matéria seca radicular foi inferior à produzida pela inoculação isolada, dependendo da espécie de eucalipto utilizada. AMORIM (1988) observou um efeito intermediário da inoculação conjunta em plantas de *E. grandis*. Esse tipo de inoculação promoveu resultados superiores aos da inoculação MA isolada, mas inferiores aos da inoculação ECM. Contrariamente, LOPEZ-AGUILLON (1985) observou em *Populus x euramericana* que o tratamento de inoculação conjunta proporcionou maior aumento de biomassa tanto em relação à testemunha quanto em relação aos tratamentos de inoculação isolada.

Ao contrário do que ocorre em relação aos estudos sobre os fungos MA, aqueles sobre o efeito dos fungos ECM na absorção de fósforo e no crescimento em *Eucalyptus* spp. são numerosos. Na maior parte dos casos, a inoculação das plantas com esses fungos tem favorecido tanto a absorção de fósforo quanto o crescimento (BOUGHER et al., 1990; BURGESS et al., 1994; THOMSON et al., 1994; AGGANGAN et al., 1996), embora a intensidade desses efeitos dependa da espécie de *Eucalyptus* e do fungo utilizado. Além disso, o momento/tempo da inoculação pode ser um fator relevante no resultado das inoculações.

Diversos estudos têm demonstrado que em substratos de baixa fertilidade as plantas inoculadas com fungos micorrízicos apresentam uma série de vantagens sobre as plantas não inoculadas. As primeiras são geralmente maiores e mais uniformes que as plantas não inoculadas. Entretanto, essas vantagens variam em função do fungo utilizado ou das diferentes combinações fungo-hospedeiro (KROPP e LANGLOIS, 1990). É sugerido, então, que a seleção dos isolados, sejam eles MA ou ECM, a ser utilizados em programas de micorrização controlada deva ser feita previamente e deva ser testada a eficiência dos isolados a fim de selecionar os mais efetivos (DODD e THOMSON, 1994).

Como mencionado anteriormente, não foi observada a colonização ectomicorrízica em nenhuma das avaliações. As razões desse fato não estão completamente explicadas, alguns dos principais fatores que podem ter limitado o crescimento do fungo são a forma de inóculo e o substrato (fertilidade), embora outros fatores como pH, temperatura e umidade do solo possam também ter influenciado.

Quanto à forma de inóculo utilizada, a inoculação das plantas com inóculo líquido é considerada vantajosa para operações de larga escala quando comparada ao inóculo sólido, uma vez que ela pode ser feita com baixos custos além de eliminar problemas de estocagem com grandes volumes de inóculo (GAGNON et al., 1988). Segundo alguns autores a viabilidade desse tipo de inóculo poderia ser afetada pelo tempo de homogeneização do micélio (LAPEYRIE e BRUCHETT, 1985; BOYLE et al., 1987).

Neste experimento, o tempo de homogeneização foi de 5 segundos. LAPEYRIE e BRUCHETT (1985), em seu estudo, testaram o efeito de três tempos de homogeneização (2 s, 10 s e 1 min) sobre a viabilidade do inóculo, utilizando para isso o aparelho Ultraturrax. Esses autores observaram, por meio de análise microscópica, que com o tempo de 2 s, o tamanho aproximado das hifas era de 0,8 mm e a 10 s de 0,4 mm e 1 min de >0,2mm. A viabilidade foi testada em cultura de placas pela contagem de colônias, de forma semelhante à utilizada nesse experimento. Foi sugerido por esses autores, que nas condições utilizadas o tempo de 2 s foi o ideal. Além disso, ROBINOW (1963), citado por LAPEYRIE e BRUCHETT (1985), afirma que o fragmento de hifa necessita de um volume mínimo de citoplasma antes de ser capaz de iniciar nova ramificação, sugerindo então que um tempo curto de homogeneização seria

o ideal, evitando assim o grande rompimento das hifas e aumentando com isso a viabilidade do inóculo. Por outro lado, BOYLE et al. (1987) que também testaram três tempos de homogeneização (5s, 30s e 2 min) concluíram que o tempo de homogeneização não seria crítico para fungos que suportem esse processo. O homogeneizador utilizado por eles foi um liquidificador, semelhante ao utilizado neste estudo. A viabilidade também foi feita em contagem de colônias em placas de Petri. De acordo com esses autores, *Pisolithus tinctorius* e *Paxillus involutus* são espécies sensíveis à fragmentação miceliana que ocorre durante o processo de homogeneização. Outras espécies como *Hebeloma longicaudum* e *Boletinus paluster* respondem melhor ao processo. No caso presente, entretanto, a viabilidade do inóculo foi testada antes da inoculação, demonstrando-se que os propágulos produzidos pela fragmentação encontravam-se viáveis se não em sua totalidade, pelo menos parte deles, já que neste estudo não foram quantificados o número de propágulos viáveis.

Em substratos com alta fertilidade, as plantas inoculadas são freqüentemente iguais em tamanho ou até menores que as plantas não inoculadas, isso pode ser explicado uma vez que as últimas, não possuindo impedimentos nutricionais, podem desenvolver-se mais rapidamente sem as micorrizas (KROPP e LANGLOIS, 1990). A produção de plantas ECM requer um cuidado extra na formulação dos regimes e das taxas de fertilização. Níveis inapropriados de fertilização ou desequilíbrios nesta podem ter efeitos prejudiciais no desenvolvimento das ECM (BRUNDRETT et al., 1996). De acordo com SOARES et al. (1990), uma moderada deficiência de nutrientes no solo, principalmente N e P, é considerada a maior importância para formação das ECM. Esses autores verificaram que a colonização das raízes de *E. grandis* por *P. tinctorius* foi totalmente inibida quando as concentrações de fósforo disponível no solo excederam a 13 ppm. Os efeitos positivos das micorrizas sobre o crescimento e absorção de nutrientes foram detectados somente quando a concentração de fósforo disponível no solo foi inferior a 8,6 ppm (SOARES et al., 1989, 1990).

Embora as concentrações de fósforo no substrato utilizado neste estudo possam parecer superiores àquelas empregadas por Soares e colaboradores (SOARES et al., 1989; 1990), deve-se considerar que a natureza dos substratos nos dois estudos era bastante distinta e que isso representa uma grande diferença em termos de disponibilidade de fósforo para as plantas. Neste estudo, a areia empregada como

substrato apresentava originalmente 9,0 ppm de fósforo (extrator Mehlich -1) aos quais foram adicionados 7,5 ppm na forma de $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]$, representando um total de 16,5 ppm imediatamente disponíveis. Trata-se aqui de areia quartzosa onde as possibilidades de adsorção dos elementos são muito baixas ou nulas. Já no substrato de SOARES et al. (1989; 1990), um Latossolo Vermelho escuro + areia de rio lavada, apesar do menor teor de fósforo disponível, o fósforo adsorvido aos colóides do solo contribuiriam para um teor total deste elemento muito maior que o medido pelas técnicas de análise.

É recomendado, por alguns autores, que tanto a planta como o solo devam ser monitorados pelas análises químicas para garantir que os níveis de fertilidade do solo sejam apropriados para a colonização ectomicorrízica (BRUNDRETT et al., 1996). Outra forma de controle, sugerida por BOUGHER et al. (1990), é o uso de curvas de resposta ao fósforo para comparar o desempenho de diferentes fungos ECM, permitindo uma previsão mais acurada de seus potenciais de aplicação e eficiência para práticas de viveiro e florestas.

A inoculação do fungo MA, *G. clarum*, de uma maneira geral, estimulou o crescimento das plantas de *E. globulus*. A inoculação de forma isolada desse fungo foi a mais efetiva, porém, a forma conjunta também promoveu incrementos na planta. Foi observado que esses incrementos ocorreram principalmente em duas etapas do experimento, do segundo para o terceiro mês e do quarto para o quinto mês. O fato de não ter sido constatada a colonização ECM pelo fungo *P. tinctorius* dificultou as comparações dos resultados obtidos com os de outros autores. Estas comparações, tanto da colonização isolada quanto da dupla associação desses fungos, auxiliariam a entender como ambos os tipos de fungos micorrízicos atuam isoladamente nos sistemas radiculares ou conjuntamente dentro do mesmo sistema radicular.

2. Efeito da seqüência de inoculação de fungos micorrízico arbuscular e ectomicorrízico na colonização radicular, absorção de fósforo e produção de matéria seca em plantas de *Eucalyptus globulus*

Contrastando com os resultados do experimento anterior, onde os efeitos dos tratamentos foram mais nítidos e fáceis de separar, os resultados deste experimento não apresentaram efeitos ou tendências muito bem definidas.

2.1. Colonização Radicular

A colonização radicular foi constatada apenas nos tratamentos com inoculação MA (Ni-Gc; Gc-Pt, Pt-Gc), somente a partir do terceiro mês após a inoculação (Tabela 15). Como observado no experimento anterior, as raízes colonizadas apresentavam no córtex radicular vesículas, esporos e hifas não septadas, como já ilustrado nas Figuras 9 e 10. Não tendo sido, também, observada a presença de arbúsculos. Não foi detectada colonização pelo fungo ECM, *P. tinctorius*, em nenhum dos tratamentos que receberam inóculo desse fungo.

A colonização radicular foi evidenciada no terceiro mês após a inoculação em dois tratamentos Ni-Gc e Pt-Gc, com 6 e 7% do comprimento radicular colonizados, respectivamente. Esse fato se assemelha ao observado no experimento anterior, onde os tratamentos em que as plantas receberam inoculação com *G. clarum* (Gc e Gc+Pt) (Tabela 4), apresentaram colonização somente 60 dias após a inoculação. Neste experimento, as porcentagens de colonização foram um pouco superiores às do experimento anterior, embora os valores de comprimento radicular infectado sejam muitos próximos nos dois casos. No caso do tratamento Gc-Pt, onde as plantas foram inoculadas inicialmente com *G. clarum* e, ao transplantio, com *P. tinctorius*, a colonização foi observada mais tarde, aos 90 dias após o plantio, ou 90 dias após a inoculação com o primeiro fungo (*G. clarum*). Tal atraso na colonização pode ser atribuído à ruptura do micélio dos fungos no momento do transplantio. Segundo MARTINS e READ (1997), essa quebra do contato do micélio (propágulos) no solo e a raiz, causando uma ruptura ou destacamento do micélio da planta diminui o seu potencial para iniciar uma nova infecção, não eliminando porém sua infectividade. A colonização prosseguiria então, apenas a partir dos pontos já infectados.

Tabela 15 - Comprimento colonizado e porcentagem de colonização radicular de plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, isoladamente ou em conjunto, em função do tempo após, sob condições de casa-de-vegetação.

Meses após inoculação	Tipo de colonização ²	Comprimento colonizado (cm) e porcentagem de colonização radicular ¹				
		Não inoculado	Não inoculado	Não inoculado	<i>P. tinctorius</i>	<i>G. clarum</i>
		↓ Não inoculado	↓ <i>G. clarum</i>	↓ <i>P. tinctorius</i>	↓ <i>G. clarum</i>	↓ <i>P. tinctorius</i>
2	MA	0	0	0	0	0
	ECM	0	0	0	0	0
	MA+ECM	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3	MA	0	1047	0	0	0
	ECM	0	0	0	0	0
	MA+ECM	0 (0%)	1047 (6%)	0 (0%)	0 (7%)	0 (0%)
4	MA	0	1087	0	1806	426
	ECM	0	0	0	0	0
	MA+ECM	0 (0%)	1087 (7,5%)	0 (0%)	1806 (14%)	426 (3%)
5	MA	0	2400	0	2612	3063
	ECM	0	0	0	0	0
	MA+ECM	0 (0%)	2400 (9%)	0 (0%)	2612 (12%)	3063 (14%)

¹ Os valores representam a média de 3 repetições/tratamento (2 plantas/repetição). ² MA = micorrízica arbuscular e ECM = ectomicorrízica.

Por outro lado, nos tratamentos onde o fungo *G. clarum* foi inoculado ao transplântio a colonização mais cedo poderia ser explicada pelo maior volume de raízes já presentes, junto com o maior potencial de inóculo do substrato que aumentaria a probabilidade de contato fungo-raiz e proporcionaria, assim, maior número de pontos de entrada, resultando em maior porcentagem de colonização.

Foram observadas poucas variações na intensidade de colonização entre os tratamentos, os valores variaram de 0 a 9% (Ni-Gc) e 0 a 14% (Gc-Pt, Pt-Gc). As plantas do tratamento Gc-Pt tiveram seus valores quadruplicados do quarto para o quinto mês de avaliação, enquanto que as do tratamento Pt-Gc, apenas duplicaram sua porcentagem de colonização do terceiro para o quarto mês.

Em termos de comprimento radicular infectado, as plantas do tratamento Gc-Pt tiveram um aumento de 426 para 3063 cm, representando um aumento de 2630 vezes no intervalo de um mês. Nos outros dois tratamentos com colonização, esse aumento foi menor 1646 e 1350 vezes, nos tratamentos Pt-Gc e Ni-Gc, respectivamente.

Os resultados demonstram que apenas *G. clarum* foi capaz de colonizar as plantas nas condições experimentais, o que vem ao encontro do já observado no experimento descrito anteriormente.

A ausência de colonização por parte do fungo *P. tinctorius* (ECM) pode estar relacionada à incapacidade do isolado testado em infectar o sistema radicular dessas plantas nas condições testadas, conforme foi discutido também no item 1.1, relativo ao experimento precedente. Embora não se tenha uma explicação convincente para esse fato, algumas das possíveis explicações para isso foram discutidas no item anterior, como a sensibilidade do isolado à fragmentação do micélio, a fertilidade do substrato e a baixa compatibilidade do isolado com a planta. São hipóteses que restam a ser testadas.

2.2. Absorção de fósforo

Não foi observado um efeito claro dos tratamentos de inoculação sobre a quantidade de fósforo presente na parte aérea das plantas (Tabela 16). O efeito geral observado foi relacionado à colheita (tempo), com um maior valor médio constatado na

Tabela 16 - Quantidade de fósforo na parte aérea em plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, em diferentes seqüências, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação.

Meses após inoculação	Fósforo na parte aérea (mg/planta) ¹					Média
	Não inoculado	Não inoculado	Não inoculado	<i>P. tinctorius</i>	<i>G. clarum</i>	
	↓ Não inoculado	↓ <i>G. clarum</i>	↓ <i>P. tinctorius</i>	↓ <i>G. clarum</i>	↓ <i>P. tinctorius</i>	
			<i>DMS=1,628</i> <i>(P=0,05)</i>			<i>DMS=0,792</i> <i>(P=0,05)</i>
2	4,79	4,17	4,23	4,08	4,08	4,27
3	4,43	4,34	5,81	5,17	4,19	4,79
4	3,27	3,24	3,76	3,80	3,30	3,48
5	6,31	4,71	6,26	8,12	7,12	6,51
Média	4,70	4,11	5,02	5,29	4,67	
<i>DMS=1,260</i> <i>(P=0,05)</i>						

¹ Os valores representam a média de 3 repetições/tratamento (2 plantas/repetição).

última observação (6,51 mg.planta⁻¹), tendo permanecido praticamente estável nas observações anteriores.

Dentro de cada tratamento, a resposta das plantas foi semelhante, a quantidade de fósforo permaneceu constante do segundo ao quarto mês após o início do experimento, com um aumento significativo somente no quinto mês.

A nível de tratamentos, não foram observadas diferenças significativas entre eles nas observações do segundo, terceiro e quarto mês. No quinto mês, porém, os tratamentos apresentaram diferenças significativas entre si, tendo sido observada a seguinte ordem de importância: Pt-Gc (8,12 mg.planta⁻¹) / Gc-Pt (7,12 mg.planta⁻¹), Ni-Ni (6,31 mg.planta⁻¹)/Ni-Pt (6,26 mg.planta⁻¹) e Ni-Gc (4,70 mg.planta⁻¹). Não ficando claro, portanto, como a inoculação teve efeito sobre este parâmetro.

Ainda neste caso, no que concerne à evolução no decorrer do experimento, encontraram-se semelhanças entre os resultados aqui descritos e aqueles do experimento precedente. Nos dois experimentos, foi observado que no período entre o segundo e o terceiro mês, as quantidades de fósforo na parte aérea permaneceram praticamente constantes, enquanto que no período entre o quarto e o quinto mês, sofreram aumento, sendo esse aumento superior ao observado no segundo experimento, no mesmo período. Neste experimento, entretanto, foi constatada uma queda na quantidade de fósforo do terceiro para o quarto mês.

Em termos de velocidade de aquisição de fósforo, os maiores aumentos foram observados no período entre o quarto e o quinto mês e os tratamentos Pt-Gc, Gc-Pt e Ni-Ni foram aqueles que apresentaram as maiores velocidades 0,143, 0,127 e 0,101 mg.planta⁻¹.dia⁻¹, respectivamente

Em relação ao fósforo na raiz (Tabela 17), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

O tratamento Ni-Ni não apresentou aumentos na quantidade de fósforo radicular com o aumento da idade, enquanto que nos tratamentos Pt-Gc e Gc-Pt ocorreu um aumento da segunda para a terceira observação. E nos tratamentos Ni-Gc e Ni-Pt esse aumento foi observado do segundo para o quinto mês. Os maiores valores médios foram observados nos tratamentos que receberam inoculação com *G. clarum* ao transplântio (tratamentos Ni-Gc e Pt-Gc), mas sem alcançar diferenças significativas.

Na média geral das observações as diferenças só foram observadas no período do segundo para o terceiro mês, nos demais períodos não foram observadas diferenças.

No caso do tratamento Ni-Gc, este foi o tratamento que acumulou, juntamente com o tratamento Pt-Gc, as maiores quantidades de fósforo no sistema radicular, porém foi o tratamento que resultou em menor valor de quantidade de fósforo na parte aérea.

As maiores velocidades de aquisição de fósforo pelas raízes foram observadas dos 60 para os 90 dias. O tratamento que se destacou foi Pt-Gc, com $0,13 \text{ mg. planta}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$. Os demais tratamentos apresentaram praticamente as mesmas velocidades, em torno de $0,06 \text{ mg. planta}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$.

No que diz respeito ao fósforo total (Tabela 18), não foram observadas diferenças entre os tratamentos nos primeiros três meses de observação. No quinto mês as maiores quantidades foram observadas nas plantas dos tratamentos Pt-Gc e Gc-Pt, com $14,18 \text{ mg. planta}^{-1}$ e $13,43 \text{ mg. planta}^{-1}$, respectivamente.

Com o aumento da idade das plantas essa quantidade tendeu a aumentar, com aumentos significativos do segundo para o quinto mês, porém, sem diferenças entre o terceiro e quarto mês, o que também foi observado dentro de cada tratamento. Neste caso, observa-se um comportamento diferente daquele visto no experimento anterior, quando a quantidade total de fósforo (mg. planta^{-1}) permaneceu constante do segundo para o terceiro mês (Tabela 7). Na média geral, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

A concentração de fósforo (%) (Tabela 19) nos tecidos sofreu uma redução com o aumento da idade das plantas, refletindo a maior biomassa (diluição do fósforo). As quedas foram maiores do segundo para o terceiro mês e do terceiro para o quarto mês, com uma redução para a metade do valor observado. O tratamento Gc-Pt tendeu a apresentar os maiores valores gerais, sem porém apresentar diferenças significativas.

2.3. Crescimento

Com relação à altura das plantas (Tabela 20), as diferenças significativas entre os tratamentos só foram observadas no quarto mês. Neste momento, as plantas do tratamento Ni-Ni foram aquelas que apresentaram a maior altura média (51,2 cm),

diferindo significativamente das plantas dos tratamentos Pt-Gc, Ni-Gc e Ni-Pt. No final do experimento (quinto mês) as plantas dos tratamentos Ni-Gc e Ni-Pt foram significativamente maiores que as dos demais tratamentos, com 53,3 e 54,1 cm, respectivamente. Os maiores incrementos em altura foram observados do terceiro para o quarto mês, à semelhança do experimento anterior, com um aumento médio de 50% em todos os tratamentos. O maior incremento foi observado nas plantas do tratamento Ni-Ni com 30,8 cm e o menor nas plantas do tratamento Ni-Gc. Na média geral, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

As maiores velocidades de aumento de altura foram observadas do terceiro para o quarto mês. O tratamento Ni-Ni foi o que apresentou a maior velocidade com $1,03 \text{ cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, seguido dos tratamentos Gc-Pt, Pt-Gc, Ni-Pt e Ni-Gc, com 0,91, 0,88, 0,76 e $0,69 \text{ cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, respectivamente.

No que diz respeito ao comprimento radicular (Tabela 21), as diferenças significativas foram observadas no quinto mês de observação, quando as plantas do tratamento Ni-Gc apresentaram maior comprimento radicular (26964 cm) que as plantas dos tratamentos Gc-Pt (21249 cm) e Ni-Pt (18126 cm). As diferenças entre o tratamento Ni-Gc e os dois outros, Ni-Ni (22130 cm) e Pt-Gc (22328 cm), embora grandes, não chegaram a ultrapassar o limite de significância.

O comprimento radicular triplicou seu valor do segundo para o terceiro mês de avaliação. No caso das plantas do tratamento Ni-Ni, entretanto o maior incremento foi observado no período do quarto para o quinto mês. Nesse período, foram observados os maiores valores de velocidade de crescimento radicular, o tratamento Gc-Pt sendo aquele que proporcionou a maior velocidade, com $356 \text{ cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ seguido dos tratamentos Pt-Gc ($333 \text{ cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), Ni-Pt ($332 \text{ cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), Ni-Gc ($306 \text{ cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e Ni-Ni ($252 \text{ cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$). No período entre o quarto e quinto mês, o tratamento Ni-Gc se destacou apresentando uma velocidade de extensão radicular de $405 \text{ cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. No período total do experimento, esse tratamento foi o que apresentou a maior velocidade de crescimento do sistema radicular ($202 \text{ cm.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$).

Fato interessante a salientar é a ausência de diferenças entre os valores de comprimento radicular observada no terceiro e quarto mês após o transplântio, dentro de

Tabela 21 - Comprimento do sistema radicular de plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, em diferentes seqüências, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação.

Meses após inoculação	Comprimento do sistema radicular (cm/planta) ¹					Média
	Não inoculado	Não inoculado	Não inoculado	<i>P.tinctorius</i>	<i>G.clarum</i>	
	↓ Não inoculado	↓ <i>G.clarum</i>	↓ <i>P.tinctorius</i>	↓ <i>G.clarum</i>	↓ <i>P.tinctorius</i>	
			<i>DMS=4905</i> (<i>P=0,05</i>)			<i>DMS=2301</i> (<i>P=0,05</i>)
2	3764	5497	3086	4030	4447	4165
3	11336	14697	13059	14014	15143	13650
4	10370	14807	14123	12720	14842	13373
5	22130	26964	18126	22328	21249	22159
Média	11900	15491	12098	13273	13920	
<i>DMS=5923</i> (<i>P=0,05</i>)						

¹ Os valores representam a média de 3 repetições/tratamento (2 plantas/repetição).

cada tratamento, o que coincide com o período de maior incremento de altura e de colonização radicular (cf. Tabelas 20 e 15).

Mais uma vez, foi possível detectar uma tendência da colonização MA a promover aumentos do comprimento radicular, embora, no caso presente, a inoculação com o outro tipo de fungo (ECM) e/ou o transplântio possam ter interferido nesse processo.

Até os 4 meses, nenhum dos tratamentos apresentou diferenças em termos de produção de matéria seca da parte aérea (Tabela 22). As diferenças ocorreram somente entre observações sendo resultado, apenas, do crescimento das plantas. Ao final do período experimental, no quinto mês, somente as plantas do tratamento Ni-Pt ($9,16 \text{ g.planta}^{-1}$) apresentaram peso de matéria seca significativamente superior às plantas do tratamento Pt-Gc.

No período do terceiro para o quinto mês, as plantas de todos os tratamentos apresentaram valores de matéria seca da parte aérea muito semelhantes aos observados no experimento anterior (Tabela 11). Os menores valores observados no segundo mês de avaliação neste experimento foram provavelmente devidos ao transplântio, que pode ter influenciado o crescimento inicial das plantas.

As plantas apresentaram a maior velocidade de produção de matéria seca no período entre o segundo e o terceiro mês. As maiores velocidades foram observadas nos tratamentos Ni-Ni e Ni-Pt, com $108,05$ e $106,17 \text{ mg.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, respectivamente. Esses tratamentos foram seguidos dos tratamentos Ni-Gc, Pt-Gc e Gc-Pt com velocidades de 104 , $100,94$ e $89,39 \text{ mg.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, respectivamente.

No que concerne ao peso de matéria seca do sistema radicular (Tabela 23), os resultados demonstram uma nítida tendência de superioridade nas plantas dos tratamentos Pt-Gc e Ni-Gc em relação às plantas dos demais tratamentos, mas tal diferença só foi detectada na última observação. Nesse momento, as plantas dos tratamentos citados, onde *G. clarum* foi inoculado ao transplântio, apresentaram peso de matéria seca de $5,53\text{g}$ e $5,10\text{g}$, respectivamente, quando nos demais tratamentos o maior valor observado foi de $4,4 \text{ g}$, no tratamento Gc-Pt. Neste caso, é clara a tendência dos tratamentos com *G. clarum* induzir uma maior extensão do sistema radicular, fato observado também no experimento anterior.

Quanto à velocidade de produção de matéria seca radicular, os maiores valores foram observados do terceiro para o quarto mês, onde o tratamento que mais se destacou foi o Ni-Gc com $55,52 \text{ mg.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. No período do quarto para o quinto mês, o tratamento que se destacou foi o Pt-Gc com $78,84 \text{ mg.planta}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

Como observado nos parâmetros de colonização, altura e matéria seca da parte aérea, os valores de matéria seca radicular deste experimento também foram comparáveis aos observados no experimento anterior.

O peso de matéria seca total (Tabela 24) foi influenciado pelos tratamentos de inoculação somente no último mês de observações com as plantas dos tratamentos Pt-Gc, Ni-Gc e Ni-Pt apresentando os seguintes valores: 13,86, 13,85 e 13,31 g, respectivamente. Esses valores foram superiores aos observados nas plantas dos tratamentos Ni-Ni (12,9 g) e Gc-Pt (12,91g).

A relação R/S (Tabela 25) diminuiu com o tempo após a inoculação passando de 1,19 na média geral da primeira observação para 0,54 ao final das observações (quinto mês). O maior decréscimo ocorreu do segundo para o terceiro mês (primeira e segunda observações). Após esse período, essa relação permanece constante.

As diminuições nos valores de R/S foram reflexo dos aumentos observados no peso de matéria seca da parte aérea a partir do terceiro mês, quando este praticamente quadruplicou.

Quando se comparam os tratamentos, as diferenças foram encontradas somente na primeira observação, com uma maior relação R/S nos tratamentos Ni-Ni e Ni-Pt. No quinto mês, a R/S dos diferentes tratamentos foi semelhante, mas observou-se uma tendência de maiores valores nos tratamentos que receberam inoculação com *G. clarum*.

Como mencionado anteriormente, não ficou muito claro o efeito da inoculação neste experimento. O transplantio deve provavelmente ter influenciado tanto fisiologicamente (as plantas na primeira avaliação eram menores que as do primeiro experimento no mesmo período), quanto na colonização das raízes. As plantas, possivelmente, tiveram que passar por uma fase de adaptação às novas condições (novos vasos). A ruptura no micélio no momento do transplantio, pode ter sido

Tabela 24 - Peso de matéria seca total das plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, em diferentes seqüências, em função do tempo após a inoculação, sob condições de casa-de-vegetação.

Meses após inoculação	Peso da matéria seca total (g/planta) ¹					Média
	Não inoculado	Não inoculado	Não inoculado	<i>P. tinctorius</i>	<i>G. clarum</i>	
	↓ Não inoculado	↓ <i>G. clarum</i>	↓ <i>P. tinctorius</i>	↓ <i>G. clarum</i>	↓ <i>P. tinctorius</i>	
			<i>DMS=0,942</i> (<i>P=0,05</i>)			<i>DMS=0,421</i> (<i>P=0,05</i>)
2	2,34	2,34	2,32	1,89	1,83	2,14
3	6,22	6,34	5,89	5,70	5,55	5,94
4	9,84	10,11	9,53	9,84	9,57	9,78
5	12,9	13,85	13,31	13,86	12,91	13,37
Média <i>DMS=3,610</i> (<i>P=0,05</i>)	7,83	8,16	7,76	7,82	7,47	

¹ Os valores representam a média de 3 repetições/tratamento (2 plantas/repetição).

responsável pela observação tardia da colonização radicular nos tratamentos que receberam inóculo no momento da sementeira.

Mais uma vez, como não foi observada a colonização pelo fungo *P. tinctorius*, ficou difícil relacionar os resultados obtidos com os de outros autores principalmente por que a maioria dos trabalhos sobre o efeito de inoculação em *Eucalyptus* se refere à inoculação com fungos ectomicorrízicos.

CONCLUSÕES

Somente o fungo micorrízico arbuscular (MA), *Glomus clarum*, foi capaz de colonizar as raízes de *Eucalyptus globulus* nas condições experimentais deste estudo. A colonização por parte desse fungo foi retardada nas plantas que receberam inoculação conjunta com o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, significando que este último, embora incapaz de colonizar as plantas, teve efeito sobre o outro fungo, provavelmente por algum tipo de antagonismo na rizosfera antes do estabelecimento da infecção.

Como resultado dessa dinâmica de colonização, as plantas que receberam inoculação com *G. clarum*, de forma isolada, e no experimento 1, foram aquelas que apresentaram os maiores valores na maioria dos parâmetros avaliados. A inoculação com *G. clarum* isoladamente promoveu assim:

- maior altura de plantas e maior velocidade de crescimento;
- maior comprimento do sistema radicular e maior velocidade de crescimento deste;
- maior peso de matéria seca do sistema radicular e maior velocidade de ganhos de matéria seca radicular;

assim como:

- maior peso de matéria seca total no final do período experimental;
- e maiores valores de relação raiz/parte aérea (R/S);

houve também:

- efeito positivo desse tratamento na absorção de fósforo pelas plantas.

No experimento de inoculação seqüencial (cf. item 2/Resultados e Discussão), os efeitos dos tratamentos foram menos discerníveis, sendo possível, entretanto, destacar:

- colonização somente pelo fungo MA, *Glomus clarum*;
- colonização retardada pelo transplantio e pela presença do fungo ectomicorrízico *P. tinctorius*.

Os tratamentos nos quais as plantas receberam inoculação MA, e apresentaram colonização deste tipo, foram aqueles que apresentaram em termos gerais:

- maior altura de plantas;
- maior comprimento radicular;
- maior peso da matéria seca radicular;
- maior relação R/S;
- maior quantidade de fósforo na raiz.

Com base nesses resultados pode-se concluir que:

- a) o fungo micorrízico arbuscular, *Glomus clarum*, foi mais compatível com *E. globulus* que o fungo ectomicorrízico *P. tinctorius*;
- b) este fungo colonizou as plantas jovens demonstrando que o estágio micorrízico arbuscular é efetivamente precoce em *Eucalyptus* spp.;
- c) *Glomus clarum* foi, assim, mais eficiente na colonização, promovendo maior absorção de fósforo e crescimento por essas plantas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A confrontação planejada entre os dois diferentes fungos micorrízicos, *Glomus clarum* (MA) e *Pisolithus tinctorius* (ECM), no que diz respeito aos efeitos sobre o crescimento e nutrição de *Eucalyptus globulus*, não ocorreu como previsto em virtude da falta de poder infeccioso do último fungo nas condições experimentais.

Diferentes fatores podem ter contribuído para isso, desde fatores ligados à compatibilidade desse fungo com a planta hospedeira, a fatores relacionados à fertilidade do solo. É conhecido que certos fungos ectomicorrízicos apresentam especificidade em relação a seus hospedeiros. Na maioria dos casos, essa especificidade se manifesta a nível gênero de fungo-gênero de planta, mas exemplos de especificidade a nível espécie-espécie têm sido relatados (GARBAYE, 1990; OLIVEIRA et al., 1994).

No caso do isolado de *P. tinctorius* utilizado neste estudo, este foi obtido de plantações de *Eucalyptus*, onde a espécie não foi determinada. Esse fungo foi um dos mais infectivos em relação a *E. dunnii* de acordo com os resultados de OLIVEIRA et al. (1994). Nesse mesmo estudo, este isolado apresentou baixa intensidade de colonização em relação a *E. viminalis*. As três espécies em questão são taxonomicamente muito próximas, pertencendo todas ao sub-gênero *Symphyomyrtus*, à mesma secção: *Maidenaria*, e à mesma série: *Viminales*. Mas, *E. dunnii* e *E. globulus* são ainda mais próximos pois pertencem à mesma sub-série: *Globulinae*, enquanto que *E. viminalis* pertence à sub-série *Viminalinae* (PRYOR e JOHNSON, 1971). Seria pouco provável que a especificidade se manifestasse a esse nível. Não se pode, no entanto, descartar a possibilidade de sua ocorrência no presente caso.

Ainda no que diz respeito ao poder infeccioso desse fungo ectomicorrízico, há a considerar a duração do período experimental. Dados experimentais demonstram que a colonização das raízes de algumas espécies de *Eucalyptus*, é um processo mais lento do que em espécies do gênero *Pinus*, por exemplo. Em *E. dunnii* e *E. viminalis*, OLIVEIRA et al. (1994), observaram que as micorrizas só eram detectadas 101 dias após a inoculação. No estudo atual, no entanto, a última observação foi aos 150 dias, tempo suficiente para aparecimento das ectomicorrizas se considerarmos os resultados

de OLIVEIRA et al. (1994), lembrando-se porém que, além das espécies hospedeiras, as condições de crescimento foram diferentes nos dois estudos.

Faltaram neste estudo, portanto, experimentos preliminares utilizando um maior número de isolados ectomicorrízicos para seleção daquele mais infectivo.

Outro fator já discutido, refere-se à fertilidade do substrato de crescimento das plantas (cf. item 1.c/Resultados e Discussão). Há no entanto, um fato novo a considerar relacionado à lavagem da areia e à diminuição dos teores de fósforo. Recentemente, dados de análise físico-química de areia coletada no mesmo local, demonstram que o procedimento de lavagem é capaz de reduzir o teor de P de 7,4 ppm, teor original, para apenas 3,5 ppm. Tomando-se como base essa informação, chega-se à conclusão que a areia utilizada neste estudo, mesmo após a fertilização aplicada (7,5 ppm), não apresentava níveis de P inibidores da colonização ectomicorrízica.

Finalmente, deve-se considerar, ainda, o tamanho do recipiente utilizado para crescimento das plantas e suas implicações na formação e arquitetura das raízes. Efetivamente, foi verificado que no final do período experimental as raízes apresentavam-se muito grossas e enoveladas no fundo do recipiente. Diversos pesquisadores, dentre eles CASTELLANO e MOLINA (1989), têm chamado a atenção para o tipo de raiz, e seu efeito sobre a colonização ECM, afirmando que raízes grossas não são passíveis de colonização por fungos ECM. Estes colonizando preferencialmente raízes finas e curtas. O volume do recipiente, pode ter, desta forma, contribuído para a produção de menor número de raízes curtas receptivas à colonização ectomicorrízica.

Na segunda parte experimental, onde a inoculação com os diferentes fungos foi feita de forma seqüencial, pode-se conjecturar um provável efeito do transplântio não somente na fisiologia da planta, como também na colonização micorrízica, notadamente a colonização MA, onde o principal tipo de infecção é o primário, que se estabelece a partir dos propágulos presentes no solo e a raiz. A quebra das hifas quando da retirada das plantas pode ter provocado redução na colonização MA. Desta forma, é preciso que novas estratégias experimentais sejam delineadas para se testar a influência da inoculação seqüencial desses dois tipos de fungos micorrízicos no crescimento e nutrição de plantas. Tais estudos são, no entanto, importantes considerando-se que o contato fungo micorrízico-raiz não ocorre numa seqüência determinada em condições naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADJOUND, D.; PLENCHETTE, C.; HALLI-HAGA, R.; LAPEYRIE, F. Response of 11 eucalyptus to inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6: 129-135. 1996.
- AGERER, R. Characterization of Ectomycorrhiza. In: NORRIS, J.R., READ, D.J., VARMA, A.K. (eds.). *Techniques for Mycorrhizal Research - Methods in Microbiology*. London: Academic Press, 1994. p. 25-73.
- AGGANGAN, N.S.; DELL, B.; MALAJCZUK, N.; de la CRUZ, R.E. Soil fumigation and phosphorus supply affect the formation of *Pisolithus - Eucalyptus urophylla* ectomycorrhizas in two acid Philippine soils. *Plant and Soil* 180: 259-266. 1996.
- ALEXANDER, I.; AHMAD, N.; SEE, L.S. The role of mycorrhizas in the regeneration of some Malaysian forest trees. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 335: 379-388. 1992.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996. 869 p.
- AMARANTHUS, M.P.; LUOMA, D.L. Diversity of ectomycorrhizal fungi in forest ecosystems: importance and conservation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7, 1995, Santos.
- AMORIM, E.F.C. *Comportamento de mudas de Eucalyptus grandis na presença de fungos endo e ectomicorrízicos*. Viçosa: UFV, 1988. 56 p. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- ASAI, T. Über das Vorkommen und die Bedeutung der Wurzelpilze in den Landpflanzen. *Japanese Journal of Botany* 7: 107-150. 1934.
- ASHTON, D.H. Studies on the mycorrhizae of *Eucalyptus regnans* F. Muell. *Australian Journal of Botany* 24: 723-741. 1976.
- AUSTRALIAN CENTRE FOR INTERNATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH. *Eucalyptus: curse or cure?* Canberra: Australian Centre for Agricultural Research, 1992.
- BARROS, N.F.; BRANDI, R.M.; REIS, M.S. Micorriza em eucalipto. *Revista Árvore* 2: 130-140. 1978.
- BELLEI, M. M.; GARBAYE, J.; GIL, M. Mycorrhizal succession in young *Eucalyptus viminalis* plantations in Santa Catarina (South Brazil). *Forest Ecology and Management* 54: 205-213. 1992.

- BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Tansley Review no. 82 - Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* 130: 3-21. 1995.
- BOUDARGA, K.; LAPEYRIE, F.; DEXHEIMER, J. A technique for dual vesicular-arbuscular endomycorrhizal/ectomycorrhizal infection of *Eucalyptus in vitro*. *New Phytologist* 114: 73-76. 1990.
- BOUGHER, N.L.; GROVE, T.S.; MALAJCZUK, N. Growth and phosphorus acquisition of karri (*Eucalyptus diversicolor* F. Muell.) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. *New Phytologist* 114: 77-85. 1990.
- BOUGHER, N.L.; MALAJCZUK, N. Effects of high soil moisture on formation of ectomycorrhizas and growth of karri (*Eucalyptus diversicolor*) seedlings inoculated with *Descolea maculata*, *Pisolithus tinctorius* and *Laccaria laccata*. *New Phytologist* 114: 87-91. 1990.
- BOYLE, C.D.; ROBERTSON, W.J.; SALONIUS, P.O. Use of mycelial slurries of mycorrhizal fungi as inoculum for commercial tree seedlings nurseries. *Canadian Journal Forest Research* 17: 1480-1486. 1987.
- BRUNDRETT, M. Spores of Glomales Fungi. In: BRUNDRETT, M.; MELVILLE, L.; PETERSON, L. (eds.). *Practical Methods in Mycorrhiza Research*. Guelph: Mycologue Publications, 1994. p. 35-41.
- BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T.; MALAJCZUK, N. *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. Canberra: ACIAR Monograph 32, 1996. 374 p.
- BRUNDRETT, M.C.; ABBOTT, L.K. Roots of jarrah forest plants. I. Mycorrhizal associations of shrubs and herbaceous plants. *Australian Journal of Botany* 39: 445-457. 1991.
- BURGESS, T.; DELL, B.; MALAJCZUK, N. Variation in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *New Phytologist* 127: 731-739. 1994.
- BURGESS, T.I.; MALAJCZUK, N.; GROVE, T.S. The ability of 16 ectomycorrhizal fungi to increase growth and phosphorus uptake of *Eucalyptus globulus* Labill. and *E. diversicolor* F. Muell. *Plant and Soil* 153: 155-164. 1993
- CARRERE, R. Pulping the South: Brazil's Pulp and Paper Plantations. *The Ecologist* 26: 206-214. 1996.
- CASTELLANO, M. A.; MOLINA, R. Mycorrhizae. In: LANDIS, T.D.; TINUS, R.W.; MCDONALD, S.E.; BARNETT, J.P. (eds.) *The Biological Component: Nursery Pests and Mycorrhizae*. Washington : U. S. Department of Agriculture, 1989. p. 101-167.

- CHILVERS, G.A.; LAPEYRIE, F.F.; HORAN, D.P. Ectomycorrhizal vs. endomycorrhizal fungi within the same root system. *New Phytologist* 107: 441-448. 1987.
- CHILVERS, G.A.; PRYOR, L.D. The structure of eucalypt mycorrhizas. *Australian Journal of Botany* 13:245-259. 1965.
- COELHO, F.C.; BORGES, A.C.; NEVES, J.C.L.; BARROS, N.F.; MUCHOVEJ, R. Caracterização e incidência de fungos micorrízicos em povoamentos de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., nos municípios de Paraopeba, Bocaiúva e João Pinheiro, Minas Gerais. *Revista Árvore* 21: 393-404. 1997.
- DELL, B.; MALAJCZUK, N. A role for Australian ectomycorrhizal fungi in the rehabilitation of denuded landscapes in Asia. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 1, 1996, Berkeley. *Program and Abstracts...* Berkeley: University of California 1996. p. 41.
- DIXON, R.K.; HIOL-HIOL, F. Mineral nutrition of *Pinus caribaea* and *Eucalyptus camaldulensis* seedlings inoculated with *Pisolithus tinctorius* and *Thelephora terrestris*. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 23: 1387-1396. 1992.
- DODD, J.C.; THOMSON, B.D. The screening and selection of inoculant arbuscular-mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K.; MALAJCZUK, N. (eds.). *Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p.149-158.
- DUDDRIDGE, J.A.; MALIBARI, A.; READ, D.J. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* 287: 843-836. 1991.
- ESTRADA, K.R.F.S.; BELLEI, M.M.; SILVA, E.A.M. Incidence of mycorrhiza in nursery and *Eucalyptus* spp. forests, in Viçosa, Minas Gerais. *Revista de Microbiologia* 24: 232-238. 1993.
- FAO. *The Eucalypt Dilemma*. Rome: FAO, 1985. 26 p.
- FITTER, A.H.; MOYERSON, B. Evolutionary trends in root-microbe symbioses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London -Series B- Biological Sciences* 351: 1367-1375. 1996.
- FLORENCE, R.G. Cultural problems of *Eucalyptus* as exotics. *Commonwealth Forest Review* 65: 141-163. 1986.
- FRAGA-BEDDIAR, A. *Interactions entre les symbiotes mycorrhiziens et les symbiotes fixateurs d'azote chez l' Aulne glutineux (Alnus glutinosa (L.) Gaertn.)*. Nancy: Université de Nancy I, 1987. 99 p. Tese (Docteur de 3^e cycle) - Université de Nancy I, 1987.

- FRANCIS, R.; READ, D.J. The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K.; MALAJCZUK, N. (eds.). *Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 11-25.
- FRANK, B. On the root – symbiosis – depending nutrition through hypogeous fungi of certain trees. (translated by J.M. Trappe from *Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft* 3: 128-145, 1885). In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 6, 1985, Bend: *Proceedings...* Bend 1985. p. 18-25.
- GAGNON, J.; LANGLOIS, C.G.; FORTIN, J.A. Growth and ectomycorrhizal formation of containerized black spruce seedlings as affected by nitrogen fertilization, inoculum type, and symbiont. *Canadian Journal Forest Research* 18: 922-929. 1988.
- GARBAYE, J. Utilisation des mycorrhizes en sylviculture. In: STRULLU, D.G. (ed.). *Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées*. Paris: Lavoisier, 1990. p 197-248.
- GARDNER, J.H.; MALAJCZUK, N. Recolonisation of rehabilitated bauxite mine sites in Western Australia by mycorrhizal fungi. *Forest Ecology and Management* 24: 27-42. 1988.
- GIACHINI, A. J.; OLIVEIRA, V.L. Fungos ectomicorrízicos (ECM) de plantações de *Eucalyptus dunnii* Maiden e *Pinus taeda* L. em Santa Catarina (SC). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19, Rio de Janeiro. *Resumos...* Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia 1997. p. 137.
- GIANINAZZI, S. Vesicular-arbuscular (endo-) mycorrhizas: cellular, biochemical and genetic aspects. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 35: 105-119. 1991.
- GIANINAZZI-PEARSON, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *The Plant Cell* 8: 1871-1883. 1996.
- GOMES, T.C.R.; FARIA, L.P.; LIN, M.T. Mycorrhization of eight species of eucalypts with VAM fungi. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 7, 1987, Gainesville. *Abstracts...* Gainesville: University of Florida 1987. p. 125.
- HARLEY, J.J.; SMITH, S.E. *Mycorrhizal symbiosis*. London: Academic Press, 1983. 483 p.
- HASELWANDTER, K.; BOWEN, G.D. Mycorrhizal relations in trees for agroforestry and rehabilitation. *Forest Ecology and Management* 81: 1-17. 1996.
- HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95: 641-655. 1991.
- HEIDJEN, E. W. van der; KUYPER, T.W. Dual mycorrhizal infection, a matter of priority or selection? In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON

- MYCORRHIZAE, 1, 1996, Berkeley. *Program and Abstracts...* Berkeley, University of California 1996. p. 61
- HEINRICH, P.A.; MULLIGAN, D.R.; PATRICK, J.W. The effect of ectomycorrhizas on the phosphorus and dry weight acquisition of *Eucalyptus* seedlings. *Plant and Soil* 109: 147-149. 1988.
- HIGA, A.R. Eucalipto sua evolução e contribuição no Brasil. *Silvicultura* 63: 39-44. 1995.
- HONRUBIA, M.; TORRES, P.; DÍAZ, G.; MORTE, A. *Biotecnología Forestal, técnicas de micorrización y micropropagación de plantas*. Murcia: Secretariado de Publicaciones, 1994. 83 p.
- HOOKE, J.E.; MUNRO, M.; ATKINSON, D. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi induced alteration in poplar root system morphology. *Plant and Soil* 145: 207-214. 1992.
- JANERETTE, C.A. An introduction to mycorrhizae. *The American Biology Teacher* 53:13-19. 1991.
- JONES, C.G.; LAST, F.T. Ectomycorrhizae and trees: implications for aboveground herbivory. In: BARBOSA, P.; KRISCHIK, V.A.; JONES, C.G. (eds.). *Microbial Mediation of Plant-Herbivore Interactions*. John Wiley & Sons, Inc., 1991. p. 65-103
- KAUFMANN, L. Setor não aproveita seu potencial. *Silvicultura* 69: 7-11. 1997.
- KHAN, A.G. Vesicular-arbuscular mycorrhizas in plants colonizing black wastes from bituminous coal mining in the Illawarra region of New South Wales. *New Phytologist* 81: 53-63. 1978.
- KOPE, H.H.; FORTIN, A. Inhibition of phytopathogenic fungi *in vitro* by cell free culture media of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 113: 57-63. 1989.
- KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect V.A. mycorrhizas. *Mycological Research* 92: 486-505. 1989.
- KOTHARI, S.K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Direct and indirect effects of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on acquisition of mineral nutrients by maize (*Zea mays* L.) in a calcareous soil. *New Phytologist* 116: 637-645. 1990.
- KROPP, B.R.; LANGLOIS, C.-G. Ectomycorrhizae in reforestation. *Canadian Journal of Forest Research* 20: 438-451. 1990.
- KUEK, C.; TOMMERUP, I.C.; MALAJCZUK, N. Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalypts for plantations. *Mycological Research* 96: 273-277. 1992.

- LAMBAIS, M.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. In: SIQUEIRA, J.O. (ed.). *Avanços em Fundamentos e Aplicação de Micorrizas*. Lavras: UFLA-DCS e DCF, 1996. p. 5-38.
- LAPEYRIE, F.F.; BRUCHETT, G. Some factors influencing viability of ectomycorrhizal fungal inoculum. *New Phytologist* 100: 585-593. 1985.
- LAPEYRIE, F.F.; CHILVERS, G. A . An endomycorrhizae-ectomycorrhizae succession associated with enhanced growth of *Eucalyptus dumosa* seedlings planted in a calcareous soil. *New Phytologist* 100: 93-104. 1985.
- LE TACON, F. Les mycorhizes: une coopération entre plantes et champignons. *La Recherche* 166: 624-632. 1985.
- LE TACON, F.; GARBAYE, J.; CARR, G. The use of mycorrhizas in temperate and tropical forests. *Symbiosis* 3: 179-206. 1987.
- LIMA, W.P. *Impacto ambiental do Eucalipto*. 2. ed. São Paulo: Ed. da Univ. de São Paulo, 1993. 301 p.
- LODGE, D.J. The influence of soil moisture and flooding on formation of VA- endo and ectomycorrhizae in *Populus* and *Salix*. *Plant and Soil* 117: 243-253. 1989.
- LODGE, D.J.; WENTWORTH, T.R. Negative associations among VA-mycorrhizal fungi and some ectomycorrhizal fungi inhabiting the same root system. *OIKOS* 57: 347-356. 1990.
- LOPEZ, G.; TRAVERSO, J.R.; ESPARRACH, C.; GALETTI, M. Análisis preliminar de 250 progenies de *E. globulus* sp. *globulus* en dos localidades de la provincia de Buenos Aires, Argentina. In: CONFERÊNCIA IUFRO SOBRE SILVICULTURA E MELHORAMENTO DE EUCALIPTOS, 1, Salvador. *Anais...* Colombo: EMBRAPA 1997. v.1. p. 77.
- LOPEZ-AGUILLON, R. *Les complexes mycorhiziens: interactions entre champignons et effet sur la croissance de la planta*. Nancy : Université de Nancy I, 1985. 127 p. Tese (Doctorat) - Université de Nancy I, 1985.
- MACHADO, J.O.; AGUIAR, I.B.; BANZATTO, D.A.; VALERI, S.V.; MIRANDA, R.; SILVA, E.F. Efeitos de inóculos de fungos endomicorrízicos sobre o desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus citriodora* Hook em diferentes substratos. *Brasil Florestal* 63: 25-31. 1988.
- MALAJCZUK, N.; LINDERMAN, R.G.; KOUGH, J.; TRAPPE, J.M. Presence of vesicular-arbuscular mycorrhizae in *Eucalyptus* spp. and *Acacia* sp., and their absence in *Banksia* sp. after inoculation with *Glomus fasciculatus*. *New Phytologist* 87: 567-572. 1981.

- MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K.; MALAJCZUK, N. (eds.). *Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 89-102.
- MARTINS, M.A.; READ, D.J. The effects of disturbance on the external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32: 1183-1189. 1997.
- 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* 59: 153-163. 1969.
- MARX, D.H.; CORDELL, C.E.; CLARK III, A. Eight-year performance of loblolly pine with *Pisolithus* ectomycorrhizae on a good-quality forest site. *Southern Journal of Applied Forestry* 12: 275-280. 1988.
- MARX, D.H.; MAUL, S.B.; CORDELL, C.E. Application of specific ectomycorrhizal fungi in world forestry. In: LEATHAM, G.F. (ed.). *Frontiers in Industrial Mycology*. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 78-98.
- MEJSTRÍK, V.K.; CUDLÍN, P. Mycorrhiza in some plant desert species in Algeria. *Plant and Soil* 71: 363-366. 1983.
- MENDONZA, L.A. *Eucalyptus kartzoffiana* L Johnson Et. D. Blaxell y *E. globulus* Labill subsp. *bicostata* (Maiden, Blakeley & Simonds) Kirkpatric., dos eucaliptos com amplias posibilidades para la Argentina. *Silvicultura* 8: 471-472. 1983.
- MEYER, F.H. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In: MARKS, G.C.; KOZLOWSKI, T.T. (eds.). *Ectomycorrhizae - Their Ecology and Physiology*. London: Academic Press, 1973. p. 79-105.
- MILLER, S.L.; ALLEN, E.B. Mycorrhizae, nutrient translocation, and interactions between plants. In: ALLEN M.F. (ed.). *Mycorrhizal Functioning - An integrative Plant-Fungal Process*. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 301-332.
- MOLINA, R.; MASSICOTTE, H.; TRAPPE, J.M. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community - ecological consequences and practical implications. In: ALLEN, M.F. (ed.). *Mycorrhizal Functioning - An integrative Plant-Fungal Process*. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 357-423.
- MOLINA, R.; TRAPPE, J.M. Mycorrhiza management in bareroot nurseries. In: DURYEA, M.L.; LANDIS, T.D. (eds.) *Forestry Nursery Manual: production of bareroot seedlings*. Lancaster: Martinus Nijhoff, 1984. p. 211-223.
- MORTON, J.B.; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and

Gigasporineae, and two new families, Acaulosparaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491. 1990.

MORTON, J.B.; BENTIVENGA, S.P. Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes) and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups. In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K.; MALAJCZUK, N. (eds.). *Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 47-59.

MULLETTE, K.J. Studies of eucalypt mycorrhizas. I-A method of mycorrhiza induction in *Eucalyptus gummifera* (Gaertn. & Hochr.) by *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch. *Australian Journal of Botany* 24: 193-200. 1976.

NEWMAN, E.I. A method of estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology* 3: 139-145. 1966.

NEWSHAM, K.K.; FITTER, A. H.; WATKINSON, A. R. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Tree* 10: 407-411. 1995.

OLIVEIRA, V.L.; LAST, F.T.; MOHAN, V. Analyses of effects of mycorrhizal associations on growth of tree seedlings. In: AZCON-AGUILAR, C.; BAREA, J.M.(eds.). *Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development*. Luxembourg: European Commission, 1996. p. 357-360.

OLIVEIRA, V.L.; SCHMIDT, V.D.B.; BELLEI, M.M. Patterns of arbuscular- and ecto- mycorrhizal colonization of *Eucalyptus dunnii* in southern Brazil. *Annales des Sciences Forestières*. 54: 473-481. 1997.

OLIVEIRA, V.L.; SCHMIDT, V.D.B.; GOMES, N.C.; MAIA, D.C. Spécificité de champignons ectomycorrhiziens vis-à-vis d'*Eucalyptus viminalis* Labill et *E. dunnii* Maiden. *Agronomie* 14: 57-62. 1994.

ORME, R.K. Progress with *Eucalyptus globulus* provenance research. *Silvicultura* 8: 483-486. 1983.

OSONUBI, O.; MULONGOY, K.; AWATOYE, O.O.; ATAYESE, M.O.; OKALI, D.V.V. Effects of ectomycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on drought tolerance of four leguminous woody seedlings. *Plant and Soil* 136: 131-143. 1991.

PARLADÉ, J.; ÁLVAREZ, I.F.; PERA, J. Ability of native ectomycorrhizal fungi from northern Spain to colonize Douglas-fir and other introduced conifers. *Mycorrhiza* 6: 237-245. 1996.

PETERSON, R.L.; FARQUHAR, M.L. Mycorrhizas – Integrated development between roots and fungi. *Mycologia* 86: 311-326. 1994.

- PETERSON, R.L.; PICHÉ, Y.; PLENCHETTE, C. Mycorrhizae and their potential use in the agricultural and forestry industries. *Biotechnology Advances* 2: 101-120. 1984.
- PHILLIPS, J.M. AND HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-160. 1970.
- POGGIANI, F. Aspectos ambientais da exploração de florestas naturais de plantação de Eucaliptos. *Silvicultura* 62: 10-15. 1995.
- POORE, M.E.D.; FRIES, C. *The ecological effects of eucalypts*. Rome: FAO Forestry Paper n 59, 1985.
- PRYOR, L.D. *Biology of Eucalyptus*. London: Edward University, 1976. 192 p.
- PRYOR, L.D.; JOHNSON, D. *A classification of the Eucalypts*. Canberra: The Australian National University, 1971. 102 p.
- RASANAYAGAM, S.; JEFFRIES, P. Production of acid is responsible for antibiosis by some ectomycorrhizal fungi. *Mycological Research* 96: 971-976. 1992.
- READ, D.J. Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* 47: 376-391. 1991.
- REDDELL, P.; MALAJCZUK, N. Formation of mycorrhizae by jarrah (*Eucalyptus marginata* Donn ex Smith) in litter and soil. *Australian Journal of Botany* 32: 511-520. 1984.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. *Plant Physiology*. 4. ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992. 682 p.
- SANSÍGOLO, C.A.; CURVELLO, A.A.S. Deslignificação em etanol-água de *Eucalyptus globulus*: características da lignina e da polpa. *O Papel* 55:23-29. 1994.
- SANTOS, P.E.T.; SCANAVACA JR., L. A importância da hibridação na silvicultura brasileira. *Silvicultura* 51: 16-18. 1993.
- SANTOS, V.L. *Sucessão de Glomus etunicatum e Pisolithus tinctorius e Crescimento de Mudras de Eucalyptus spp.* Viçosa: UFV, 1993. 71 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 1993.
- SCHULTZ, A. *Introdução à Botânica Sistemática*. 6.ed. Porto Alegre : SAGRA - Ed. da Universidade RS, 1991. v.2
- SHARMA, P.M.; GAUR, A.; BHATIA, N.P.; ADHOLEYA, A. Growth responses and dependence of *Acacia nilotica* var. cupriciformis on the indigenous arbuscular mycorrhizal consortium of a marginal wasteland soil. *Mycorrhiza* 6: 441-446. 1996.

- SOARES, I.; BORGES, A.C.; BARROS, N.F.; BELLEI, M.M. Níveis de fósforo na formação de ectomicorrizas em mudas de eucalipto. *Revista brasileira de Ciência do Solo* 14: 327-332, 1990.
- SOARES, I.; BORGES, A.C.; BARROS, N.F.; NEVES, J.C.L.; BELLEI, M.M. Teor de fósforo no solo influenciando o desenvolvimento de ectomicorrizas e nutrição e crescimento de mudas de eucalipto. *Revista Árvore* 13: 140-151, 1989.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. A-contribuição social da área florestal. *Silvicultura* 63: 15-17. 1995.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. Seminário discute monocultura do Eucalipto. *Silvicultura* 71: 8-13. 1997.
- SUH, H.-W.; CRAWFORD, D.L.; KORUS, R.A.; SHETTY, K. Production of antifungal metabolites by ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF. *Journal of Industrial Microbiology* 8: 29-36. 1991.
- SYLVIA, D.M. Mycorrhizal associations. In: SYLVIA, D.M.; FUHRMANN, J.F.; HARTEL, P.G.; ZUBERER, D.A. (eds.). *Principles and Applications of Soil Microbiology*. New Jersey: Prentice Hall, 1998. p. 408-426.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. *Análise de solo, plantas e outros materiais*. 2. ed ver. ampl. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995. 174 p.
- THOMSON, B.D.; GROVE, T.S.; MALAJCZUK, N.; HARDY, G.E.StJ. The effectiveness of ectomycorrhizal fungi in increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labill. in relation to root colonization and hyphal development in soil. *New Phytologist* 126: 517-524. 1994.
- TISDALL, J.M. Possible role of microorganisms in aggregation in soils. In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K.; MALAJCZUK, N. (eds.). *Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p.115-121.
- TRAPPE, J.M. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *The Botanical Review* 28: 538-606. 1962.
- TRAPPE, J.M. Phylogenetic and ecological aspects of mycotrophic in the Angiosperms from an evolutionary standpoint. In: SAFIR, G.R. (ed.). *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. Boca Raton: CRC Press, 1987. p. 5-25.
- UNGARETTI, G. O versátil eucalipto. *NovaCiência* 26: 54-56. 1995.
- VOZZO, J.A.; HACSKAYLO, E. Endo- and ectomycorrhizal associations in five *Populus* species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 101: 182-186. 1974.

- WILCOX, H.E. Mycorrhizal Associations. In: NAKAS, J.P.; HAGEDORN, C. (eds.). *Biotechnology of Plant-Microbe Interactions*. New York: McGraw-Hill Publishing Company, 1990. p. 227-255.
- WILKINS, D. A. The influence of sheathing (ecto) mycorrhizas of trees on the uptake and toxicity of metals. *Agricultural Ecosystems and Environment* 35: 245-260. 1991.
- WILSON, J.; MASON, P.A.; LAST, F.T.; INGLEBY, K.; MUNRO, R.C. Ectomycorrhiza formation and growth of Sitka spruce seedlings on first-rotation forest sites in northern Britain. *Canadian Journal of Forest Research* 17: 957-963. 1987.
- WU, T.; MALAJCZUK, N.; BRUNDRETT, M. Competition and effectiveness of arbuscular and/or ectomycorrhizal fungi on seedlings of bluegum/ (*Eucalyptus globulus*). In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 1, 1996, Berkeley. *Program and Abstracts...* Berkeley: University of California 1996. p. 130.
- ZAMBOLIM, L.; BARROS, N.F. Constatação de micorriza vesicular arbuscular em *Eucalyptus* spp. na região de Viçosa, MG. *Revista Árvore* 6: 95-97. 1982.
- ZAMBOLIM, L.; BARROS, N.F.; COSTA, L.M. Influência de micorrizas do tipo vesicular-arbuscular no crescimento e absorção de nutrientes por mudas de *Eucalyptus* spp. *Revista Árvore* 6: 64-73. 1982.

ANEXOS

Anexo 1- Características físico-químicas do substrato constituído de uma mistura de solo Terra Roxa Estruturada (TR) e areia (1:3 v/v).*

Características	Valor	Unidade
pH (H ₂ O)	5,5	_____
Índice SMP	6,0	_____
Fósforo	5,5	ppm
Potássio	34	ppm
Matéria Orgânica	1,8	%
Alumínio	0,20	me / %
Cálcio	2,4	me / %
Magnésio	1,6	me / %
Cálcio + Magnésio	3,9	me / %

*Análises realizadas no Laboratório Físico Químico e Biológico da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC) - Florianópolis (SC).

Anexo 2- Características físico-químicas do substrato (areia quartzosa) utilizado nos experimentos *.

Características	Valor	Unidade
pH (H ₂ O)	6,4	_____
Índice SMP	7,6	_____
Fósforo	9,5	ppm
Potássio	19	ppm
Matéria Orgânica	1,1	%
Alumínio	---	me / %
Cálcio	0,7	me / %
Magnésio	1,1	me / %

*Análises realizadas no Laboratório Físico Químico e Biológico da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC)-Florianópolis (SC).

Anexo 3—Valores das temperaturas máximas e mínimas da casa-de-vegetação durante o período do experimento.

Mês/Ano	Médias da Temperatura Máxima	Médias da temperaturas Mínimas	Temperatura Máxima Absoluta	Temperatura Mínima Absoluta
Julho/97	24.0	15.0	31	7.0
Agosto/97	26.0	15.0	33.5	9.0
Setembro/97	26.0	17.0	30.5	9.5
Outubro/97	27.0	19.0	34.0	15.0
Novembro/97	31.0	21.0	37.0	18.0
Dezembro/97	36.0	23.0	43.0	19.0
Janeiro/97	37.0	24.0	48.0	21.0

Anexo 4 - Preparo de 1 L da solução P-B (molibdato de amônio)

- a - Dissolver 3,8 g de molibdato de amônio $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ em 150 mL de água destilada previamente aquecida a 60°C , em copo de becker de 200 mL;
- b - Deixar esfriar, transferir para um balão volumétrico de 200 mL e completar o volume com água destilada;
- c - Transferir para um tambor com capacidade de 1 L;
- d - Em outro balão, colocar 80 mL de água destilada;
- e - Adicionar 70,7 ml de HCl concentrado ($d=1,191$; 37,7% e 12,31N) e agitar;
- f - Completar o volume com água destilada e agitar;
- g - Transferir para o tambor de 1 L, onde já se encontra a solução de molibdato de amônio, e agitar;
- h - Adicionar 600 mL de água destilada, utilizando balão volumétrico de 200 mL, e agitar bem para perfeita homogeneização.

Anexo 5 - Preparo da Solução P-C (ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico)

- a - Preparar um estoque de pó redutor, misturando e triturando em almofariz os seguintes reagentes:
- 2,50g de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico,
 - 5,00g de sulfito de sódio (Na_2SO_3),
 - 146,00g de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$);
- b - Guardar o pó redutor em vidro fosco, envolto com folha de papel alumínio (no máximo por 40 dias);
- c - Dissolver 32,0g do pó redutor em 200 ml de água destilada morna (50 - 60°C), em copo de becker de 1000mL;
- d - Transferir para um vidro fosco escuro e deixar em repouso até cristalizar (3 a 6 dias);
- e - Filtrar o cristalizado e guardar a solução (no máximo por 3 semanas).

Anexo 6 – Curva e equação de regressão entre o teor de fósforo (ppm) na solução e a densidade óptica (absorbância) a 660 nm.

